



Pathogénicité des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) des produits laitiers : diversité génétique et impact des globules gras du lait

Thomas Douellou

► To cite this version:

Thomas Douellou. Pathogénicité des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) des produits laitiers : diversité génétique et impact des globules gras du lait. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2016. Français. NNT : 2016CLF22712 . tel-01477170

HAL Id: tel-01477170

<https://theses.hal.science/tel-01477170>

Submitted on 27 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.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

UNIVERSITE D'AUVERGNE

N° D. U. : 2712

ANNEE : 2016

ECOLE DOCTORALE

SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

N° d'ordre : 692

T h è s e

Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de

D O C T E U R D ' U N I V E R S I T E

Spécialité : ECOLOGIE

Par Thomas DOUËLLOU

Pathogénicité des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines
(STEC) des produits laitiers : diversité génétique et impact des globules
gras du lait

Thèse dirigée par : Dr. Delphine THEVENOT-SERGENTET

Soutenue le 1^{er} juillet 2016

Président : M. Frédéric DELBAC, Professeur, Université Blaise Pascale, Clermont Fd

Rapporteurs : M. Michel GAUTIER, Professeur, AGROCAMPUS OUEST, Rennes

M. Hubert BRUGERE, Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse

Membres : M. Jean FRENEY, Professeur, Université Claude Bernard, Lyon

Mme Marie-Christine MONTEL, Directrice de Recherche, INRA, Aurillac

Mme Delphine THEVENOT-SERGENTET, Maître de Conférences, VetAgro Sup, Lyon

Unité de Recherche Fromagère (URF), INRA, Aurillac
UMR 5557, équipe Bactéries Pathogènes Opportunistes de l'Environnement (BPOE), VetAgro Sup, Campus
Vétérinaire de Lyon

RESUME :

Mots clés : *Escherichia coli* producteur de shiga-toxine, Fromages au lait cru, Pathogénicité, Physiologie, Génomique, Adhésion

La pathogénicité des souches d'*Escherichia coli* producteurs de Shiga-Toxines (STEC) dans les fromages est peu connue à ce jour et bien que la prévalence des STEC dans les matrices au lait cru soit élevée, le nombre de cas épidémiologiques liés à leur consommation reste rare. L'objectif de la thèse est d'apporter des éléments de compréhension de cette pathogénicité en axant nos travaux sur (i) la caractérisation génétique de souches isolées de produits laitiers, (ii) l'étude de l'inhibition de l'adhésion des EHEC grâce aux globules gras du lait et des fromages au lait cru. Les données de l'étude sur la diversité génétique par PFGE d'une collection de souches de STEC isolées de produits au lait cru présentent une grande diversité de profils de macrorestriction révélés par électrophorèse en champ pulsé (PFGE). L'analyse de leur profil de virulence par approche rt-qPCR a montré que, à l'exception de quelques gènes (*stx1/2* chez les STEC O26:H11 et les gènes *stx1*, *nleF* et *Z6065* chez les STEC O157:H7), ces souches isolées de produits laitiers possèdent le patrimoine génétique propre à déclencher les pathologies à EHEC. Des associations entre les globules gras et les EHEC ont été mise en évidence par microscopie à épi fluorescence. Nos travaux ont également montré une inhibition de l'adhésion de deux souches EHEC à des entérocytes en culture (modèle *in vitro*). Enfin, des tests d'adhésion des EHEC dans une matrice fromagère appauvrie ou non en globules gras, en modèle souris ont été réalisés. Les données ont montré que la présence de globules gras induit un retard d'excrétion des EHEC d'un jour. Les globules gras induisent également une variation du site d'implantation (de 6 cm) au niveau du colon. Nos travaux apportent des connaissances sur la pathogénicité des STEC issus de produits laitiers. Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires pour statuer sur la pathogénicité des STEC isolés de fromages au lait cru et apporter des réponses concrètes aux industriels de cette filière et aux instances décisionnelles pour l'établissement d'une éventuelle réglementation.

Laboratoires d'accueils :

Unité de Recherche Fromagère (URF), INRA, 20 côte de Reyne, 15000 AURILLAC.

Unité Mixte de Recherche (UMR), INRA, CNRS, VetAgro Sup, Equipe Bactéries Pathogènes Opportunistes de l'Environnement (BPOE), Campus Vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy L'Etoile.

ABSTRACT

Key words: STEC, Raw milk cheeses, Pathogenicity, Physiology, Genomic, Adhesion

Pathogenic Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) are foodborn pathogens worldwide and their pathogenicity in dairy products are yet not well define. Despite their presence in such foodstuff, STEC outbreaks or isolated infectious cases due to consumption of dairy products remain rare. The main objectif of this thesis was to evaluate the potential pathogenicity of STEC in dairy products. This work was divided into two main axes: (i) the genetic characterization of STEC isolated from dairy products and (ii) the inhibition of EHEC adhesion to intestinal tract due to Milk Fat Globule (MFG) of milk and raw milk cheeses. A collection of STEC strains from dairy products showed a high genetic diversity by PFGE analysis. Virulence profil analysis by rt-qPCR showed that dairy STEC strains present genes implicated into disease enhancement, exception of *stx1/2* genes for O26:H11 STEC and *stx1*, *nleF* et *Z6065* genes for O157:H7 STEC. Interactions between STEC cells and MFG, in raw milk, were confirmed by epifluorescence microscopy. EHEC adherence inhibition property of MFG to enterocytes was demonstrated by an *in vitro* approach. EHEC adhesion test managed in streptomycin treated CD1 mice demonstrated that the presence of MFG in cheese matrices used to feed animals induced a lag of excretion of EHEC cells one day post-feeding. Moreover, MFG induced a shift of 6 cm of the primo-implantation site of EHEC. Our study provides knowledge about pathogenicity of STEC isolated from dairy products. However, further studies are needed to determine the pathogenicity of the isolated products STEC in raw milk cheeses and provide practical solutions to industrial and risk assessment managers to developed potential reglementations.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
CHAPITRE 1. ETAT DE L'ART SUR LES <i>E. COLI</i> PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES (STEC)	5
1. Généralités relatives aux <i>E. coli</i> producteurs de shiga-toxines (STEC).....	5
1.1. Données taxonomiques et phylogénétiques.....	5
1.1.1. Le genre <i>Escherichia</i>	5
1.1.2. Classification des <i>E. coli</i>	7
1.1.2.1. La classification sérologique	7
1.1.2.2. Les différents pathovars d' <i>E. coli</i>	7
1.1.2.3. Phylogénie des <i>E. coli</i>	13
1.2. Les <i>E. coli</i> producteurs de shiga toxine (STEC)	14
1.2.1. Définitions.....	14
1.2.2. Manifestations cliniques liées à l'infection à EHEC	15
1.2.2.1. Colites et colites hémolytiques.....	16
1.2.2.2. Le syndrome hémolytique et urémique (SHU).....	17
1.2.2.3. Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PPT)	18
Points clés n°1 :	19
2. Epidémiologie des STEC	21
2.1. Surveillance des cas de contaminations à STEC en France	21
2.2. Le cycle épidémique.....	21
2.3. Epidémiologie à STEC dans la filière lait	26
2.3.1. Les STEC dans l'environnement de ferme laitière.....	26
2.3.1.1. Les réservoirs animaux et l'excrétion de STEC par le bétail	26
2.3.1.2. Persistance des STEC dans l'environnement de ferme laitière	27
2.3.2. Les voies de contamination des produits laitiers par les STEC.....	28
2.3.3. Détection des STEC dans les aliments et prévalence dans les produits au lait cru	29
2.3.4. Les principales épidémies liées aux EHEC	33
Points clés n°2 :	39

3. Facteurs influençant le comportement des STEC dans les produits laitiers	41
3.1. Croissance des STEC en fromages.....	41
3.1.1. Comportement des STEC en fromages	41
3.1.2. La compétition métabolique	43
3.2. Facteurs biotiques.....	45
3.2.1. Nature de l'antagonisme.....	46
3.2.1.1. Acides organiques	46
3.2.1.2. Effet des composés oxygénés réactifs	47
3.2.1.3. Les bactériocines	48
3.3. Facteurs abiotiques	48
3.3.1. Température.....	49
3.3.2. pH.....	50
3.3.3. Le salage et l'activité de l'eau (aw).....	50
Points clés n°3 :	51
4. La pathogénicité et facteurs de virulence des STEC	53
4.1. Virulence et pathogénicité : retour aux bases.....	53
4.2. Pathogénie des STEC	56
4.2.1. Les facteurs d'adhésion	57
4.2.2. Le locus d'effacement des entérocytes.....	57
4.2.3. Les Shiga-toxines (Stx)	64
4.2.4. Autres facteurs de pathogénicité	72
4.2.5. Les réponses aux stress des STEC.....	75
4.2.5.1. Réponses globales aux stress et système SOS.....	76
4.2.5.2. Les réponses spécifiques aux stress.....	77
4.2.5.2.1. La réponse au stress acide	77
4.2.5.2.2. La réponse au stress thermique.....	80
4.2.5.2.3. La réponse au stress oxydatif	80
4.2.5.2.4. La réponse au stress osmotique	81
Points clés n°4 :	83
5. Interactions des bactéries pathogènes avec la matrices laitière	85
5.1. Article scientifique de synthèse n°1 (Soumis dans <i>Journal of Dairy Science</i>)	86

QUESTIONS ET HYPOTHESES DE TRAVAIL.....	111
ETUDE EXPERIMENTALE.....	113
CHAPITRE 2. VARIABILITE GENETIQUE DES STEC ISOLEES DE PRODUITS LAITIERS	113
1. Etude de la biodiversité génétique des STEC isolés de produits laitiers.....	113
1.1. Introduction	113
1.2. Matériels et Méthodes	115
1.2.1. Souches de STEC utilisées	115
1.2.2. Identification du profil génétique par la méthode PFGE.....	115
1.2.3. Identification des profils de virulence par rt-qPCR.....	116
1.3. Résultats	118
1.4. Discussions et Conclusions	119
Article scientifique n°2 (Douellou et al, 2016, <i>International Journal of Food Microbiology</i> , 232, 52-62).....	121
Article scientifique n°3 (<i>Soumis dans Food Microbiology</i>)	147
CHAPITRE 3. INTERACTIONS STEC-MATRICE LAITIERE : GLOBULES GRAS ET OLIGOSACCHARIDES ASSOCIES	171
1. Inhibition de l'adhésion des EHEC à la barrière intestinale liée aux interactions bactéries-glycoconjugués associés à la membrane des globules gras du lait.....	171
1.1. Introduction	171
1.2. Matériels et méthodes.....	173
1.2.1. Souches bactériennes utilisées.....	173
1.2.2. Localisation des EHEC dans les phases de lait	173
1.2.3. Effet des GG du lait sur les capacités d'adhésion des EHEC à des cellules intestinales Caco-2 et HT29-MTX (9.1) co-cultivées <i>in vitro</i>	174
1.2.4. Effet des GG du fromage sur les capacités d'adhésion des EHEC au tractus digestif de souris traitées à la streptomycine	174
1.2.5. Analyses	175
1.3. Résultats et discussions	176
1.3.1. Localisation des EHEC dans les phases de lait	176
1.3.2. Effet des GG du lait sur les capacités d'adhésion des EHEC à des cellules intestinales Caco-2 et HT29-MTX (9.1) co-cultivées <i>in vitro</i>	177

1.3.3. Effet des GG du fromage sur les capacités d'adhésion des EHEC au tractus digestif de souris traitées à la streptomycine	177
1.4. Conclusions	178
Article scientifique n°4 (En préparation)	179
 DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS	 183
1- Variabilité génétique et profils de virulence des STEC isolés de produits laitiers.....	183
2- Interactions EHEC-globules gras du lait	186
3- Impact des conditions physico-chimiques des technologies de fabrication fromagère sur la réponse aux stress des EHEC.	188
4- Conclusions générales	190
 ANNEXE 1 : Communications orales.....	 192
ANNEXE 2 : Contribution Article scientifique	196
ANNEXE 3 : Article de vulgarisation scientifique n°1.....	224
ANNEXE 4 : Article de vulgarisation scientifique n°2.....	228
ANNEXE 5 : Article de vulgarisation scientifique n°3.....	232
ANNEXE 6 : Poster n°1.....	238
ANNEXE 7 : Poster n°2.....	242
ANNEXE 8 : Exemple d'image de coupe histologique et analyses des données obtenues	246
ANNEXE 9 : Références Bibliographiques du Tableau 7 (d'après Farrokh et al., 2013).....	250
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 256

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique de la structure d' <i>E. coli</i>	6
Figure 2: Pathogénie associée à six des sept pathovars d' <i>E. coli</i> responsables de diarrhées (Kaper et al., 2004).....	9
Figure 3: Diagramme de Venn illustrant le système de classification des AEEC/EPEC/STEC/EHEC à partir des signes cliniques et des facteurs de virulence associés aux souches d' <i>E. coli</i> (AFSSA, 2010). Les surfaces des disques et intersections ne sont pas proportionnelles à la prévalence des différents types d' <i>E. coli</i>	15
Figure 4: Evolutions cliniques après ingestion de souches EHEC (Tarr et al., 2005).....	16
Figure 5: Réservoir et mode de transmission des EHEC (AFSSA, 2010).	23
Figure 6: Diagramme schématique des sources potentielles de contamination microbiologiques du lait cru à la ferme. Les flèches en trait plein représentent les principales sources de contamination (EFSA, 2015).....	29
Figure 7: Diagramme simplifié représentant la procédure de recherche des STEC selon la norme ISO-TS 13136. IMS : Immuno-séparation magnétique	31
Figure 8: Organisation génétique du locus d'effacement des entérocytes (Ritchie and Waldor, 2005).	58
Figure 9: Représentation schématique de l'assemblage du système de sécrétion de type III chez les EPEC (Sekiya et al., 2001).....	61
Figure 10: Représentation schématique du système de sécrétion de type III , exprimé par les EHEC et <i>C. rodentium</i> (Pallen et al., 2005).....	61
Figure 11: Mécanisme de pathogénicité des <i>E. coli</i> Entéropathogènes et Entérohémorragiques (Croxen and Finlay, 2010).....	62
Figure 12: Représentations schématiques de la structure des toxines Stx.....	65
Figure 13: Mécanisme d'action des Shiga-toxines (Mariani-Kurkdjian and Bingen, 2012).....	66

Figure 14: Régulation de l'expression des Shiga-toxines en fonction des cycles phagiques (Schüller, 2011).....	68
Figure 15: Voies potentielles de passage des toxines Stx à travers l'épithélium intestinal humain (Schüller, 2011).	70
Figure 16: Nouveau modèle de physiopathologie des infections à EHEC (Etienne-Mesmin et al., 2011).....	71

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principaux critères biochimiques différentiels des espèces du genre <i>Escherichia</i> (d'après Grimont, 1987).....	6
Tableau 2 : Caractérisation des sept classes d' <i>E. coli</i> responsables de diarrhées chez l'homme.	8
Tableau 3 : Classification des sérotypes de STEC en séropathotypes (d'après Karmali et al., 2003).....	13
Tableau 4 : Taux de contamination par des souches STEC considérées comme hautement pathogènes, de viande de bœuf analysée en France au cours des plans de surveillance de 2006 à 2011 (d'après Loukiadis et al., 2012).....	25
Tableau 5 : Taux de contamination par des souches STEC considérées comme hautement pathogènes des produits laitiers analysés en France au cours des plans de surveillance et de contrôle en 2005, 2007 et 2009 (d'après Loukiadis et al., 2012).....	33
Tableau 6 : Résumé des principales épidémies à EHEC dans le monde entre 1998-2014.....	35
Tableau 7 : Epidémies à STEC liées à la consommation de produits laitiers à travers le monde, entre 1986 et 2010 (d'après Farrokh et al., 2013). Les références sont décrites dans l'ANNEXE 7.....	37
Tableau 8 : Définition des sous classes de facteurs de virulence (Wassenaar and Gaastra, 2001).....	55
Tableau 9 : Protéines sécrétées par le système de sécrétion de type III par les <i>E. coli</i> O157:H7 et leurs activités (d'après Stevens and Frankel, 2014).	59
Tableau 10 : Gènes associés à la pathogénicité des STEC étudiés par approche rt-PCR.....	117

ABREVIATIONS

A/E	Attaching and effacing
AAF	Aggregative adherence fimbriae
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
AFNOR	Association Française de NORmalisation
AFSSA	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AIEC	<i>E. coli</i> adhérent-invasifs
ANSES	Agence nationale de Sécurité sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
AOP	Appellation d'Origine Protégée
AR	Acide Resistance
ARN	Acide ribonucléique
Aw	Activité de l'eau
BHI	Brain Heart Infusion (bouillon coeur-cervelle)
CD	Cluster of differentiation
CDC	Centre de contrôle et de prévention des maladies
CDT	Cytotoxic Distending Factor
CFA	Cyclopropane d'acide gras
Cif	Cycle inhibiting factor
CNIEL	Centre National Interprofessionnel de l'Économie Laitière
CNR	Centre National de Référence
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CT	Céfexime-Tellurite
DAEC	<i>E. coli</i> à adhésion diffuse
DGAL	Direction Générale de l'Alimentation
EAEC	Entero aggregative <i>E. coli</i>
EAF	EPEC adhesion factor
EAggEC	<i>E. coli</i> entéro agrégatifs
EAHEC	Entero agregative Hemorrhagic <i>E. coli</i>
EAST1	Entero Aggregative heat-Stable Toxin 1
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ECP	<i>E. coli</i> Common Pilus
EFSA	European Food Safety Authority
EHEC	<i>E. coli</i> entéro-hémorragique
EIEC	<i>E. coli</i> entéro invasifs
EPEC	<i>E. coli</i> entéro pathogènes
ETEC	<i>E. coli</i> entéro toxinogènes
ExPEC	Extra-intestinal pathogenic <i>E. coli</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GalNAc	N-acetyl-galactosamine
Gb3	Globotriosylcéramide
Gb4	Globotetraosylcéramide
GG	Globules Gras
GlcNAc	N-acetyl-glucosamine

HCl	Acide Chlorhydrique
HCP	Haemoragic Coli Pilus
HPI	High Pathogenicity Island
HSPs	Heat Shock protein
IMS	Immunomagnetic separation
InVs	Institut de Veille Sanitaire
IS	Insertion séquence
ISO	Organisation Internationale de Normalisation
ISO-TS	ISO-Specification Technique
LC	Lysine Décarboxylase
LEE	Locus d'effacement des entérocytes
Ler	LEE encoded regulator
Lpf	Long polar fimbriae
LPS	Lipopolysaccharidiques
LT	Toxines thermolabiles
MLST	Multilocus sequence typing
MLVA	Multiple Loci VNTR Analysis
MNEC	Meningitidis and Necrosing <i>E. coli</i>
Neu5Ac	Acide N-acetyl neuraminique
Nle	Non LEE-encoded effector
NM	Souche non mobile
ODC	Ornithine Décarboxylase
OI	O-Island
OMV	Vésicules de membrane externe
ORF	Open reading Frame
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
pH	Potentiel hydrogène
PMN	Polynucléaire neutrophile
PTT	Purpura Thrombotique et Thrombocytopénique
ROS	Reactive oxygen species
rt-PCR	PCR en temps réel
RT-PCR	PCR sur ARN rétro-transcrit en ADNc
SHU	Syndromes hémolytiques et urémiques
SSTT	Système de sécrétion de type III
ST	Toxines thermostables
STEC	Shiga-toxin producing <i>E. coli</i>
TNF	Tumor necrosis factor
UFC	Unité Formant Colonie
UPEC	<i>E. coli</i> Uropathogénique
USA	United States of America
VHR	Viandes hachées de bœuf réfrigérées
VHS	Viandes hachées de bœuf surgelées
VNTR	Variable number tandem repeat
VTEC	Vero-toxin producing <i>E. coli</i>
XOR/DH	Xanthine oxydoréductase/déshydrogénase

INTRODUCTION

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga Toxines (STEC) sont internationalement reconnus comme des bactéries potentiellement hautement pathogènes depuis les années 1980 (Karmali et al., 1983). Ils sont associés à des épidémies alimentaires parfois de grande envergure et souvent gravissimes. L'atteinte de l'homme se traduit par le développement de colites hémorragiques et/ou de syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) pouvant entraîner des séquelles rénales parfois mortelles, nécessitant des traitements à long terme, surtout chez les enfants de moins de 3 ans. Les personnes de plus de 60 ans sont également considérées comme une population à risque (EFSA and ECDC, 2015; Nataro and Kaper, 1998).

Le réservoir naturel principal des STEC est le tube digestif des bovins, même si un portage des STEC chez les ovins et les caprins a été rapporté. La contamination des aliments dérivés des ruminants est la cause majeure des infections humaines. Il s'agit de la viande hachée de bœuf insuffisamment cuite, des végétaux souillés consommés crus et mal lavés et des produits au lait cru.

Les fromages au lait cru sont des produits à forte valeur ajoutée dont la production est d'une importance économique et sociale majeure dans les régions rurales. Ces produits favorisent le développement et l'aménagement des territoires en apportant une source de revenus contribuant à limiter la désertification des régions agricoles. La production de fromage au lait de vache en France est importante puisqu'elle est annuellement d'environ 1,80 millions de tonnes (2013). La consommation de fromage en France (tous types confondus) par les ménages représente entre 764 510 et 790 357 tonnes par an (entre 2010 et 2014), représentant un chiffre d'affaire compris entre 6,7 M€ et 7,3 M€ respectivement (CNIEL,

2014, 2015). Au niveau international, la France a exporté environ 3 M€ de fromage au lait cru en 2014 (CNIEL, 2015).

Dans les pays industrialisés, la sécurité des aliments est considérée comme un thème prioritaire par les instances politiques et décisionnelles, à la fois pour des raisons sanitaires et économiques. Dans ces pays, des moyens importants sont mis en œuvre pour la surveillance, la prévention et le contrôle des maladies d'origine alimentaire. En Europe, un important travail de réglementation sur l'hygiène des aliments est regroupé dans « Le paquet hygiène » (2006). Il fixe notamment les objectifs à atteindre par les professionnels en leur laissant une certaine latitude sur les moyens mis en œuvre (CE, n°178/2002). De manière très simple, il est établi qu'aucune denrée alimentaire ne doit être mise sur le marché si elle représente un risque pour le consommateur. Il indique également que l'exploitant est responsable de son produit et de son environnement (process, fournisseur,...) (<http://agriculture.gouv.fr/securite-sanitaire-le-paquet-hygiene>). Néanmoins, il n'existe à ce jour aucun critère microbiologique relatif aux STEC dans les aliments (hors graines germées). En effet, le comité scientifique des mesures vétérinaires en rapport avec la santé publique du parlement européen est parvenu à la conclusion que l'application d'une norme dans le produit final n'entraînerait probablement pas de diminution du risque connexe pour le consommateur (faible dose infectieuse et faible prévalence de la contamination) (règlement CE No 2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005). Néanmoins, ce même comité a identifié des denrées alimentaires dans lesquelles les STEC présentent un risque pour la santé du consommateur. Parmi elles figurent les fromages au lait cru.

Ainsi, la crainte d'épidémies à STEC liées à la consommation de fromage au lait cru et le Paquet Hygiène incitent les producteurs à multiplier les contrôles microbiologiques coûteux sur leurs produits, induisant des retombées économiques et sociales conséquentes sur

l'ensemble de la filière lait cru Française. Par ailleurs, les législateurs manquent de données scientifiques concernant la pathogénicité des STEC dans les fromages au lait cru.

Malgré une forte prévalence en STEC de 0,9% (en 2009) dans les produits au lait cru, et plus particulièrement dans les fromages, le nombre d'épidémies liées à la consommation de cet aliment n'a été que de deux dans l'union européenne entre 2008 et 2012 (EFSA and ECDC, 2015; EFSA, 2014; Loukiadis et al., 2012 ; Baylis, 2009; Farrokh et al., 2013).

Les connaissances sur la génomique, la physiologie et l'épidémiologie des STEC sont en pleine expansion dans les domaines scientifiques et industriels. Néanmoins, leur pathogénicité est le plus souvent abordée par la connaissance de leur potentiel génétique en lien avec leurs facteurs de pathogénicité. Peu d'études abordent l'expression de ce potentiel dans les fromages ou le tube digestif. Une meilleure compréhension de la pathogénicité globale pourrait contribuer à une meilleure gestion du risque par les autorités et les industriels. Plus précisément, l'impact de la matrice lait et des transformations du lait en fromage suivant différentes technologies sur la pathogénicité des STEC reste encore mal connu. Une meilleure compréhension de l'effet de la matrice lait sur la pathogénicité des STEC, au niveau génomique et physiologique, semble être un enjeu primordial pour la maîtrise de ces micro-organismes dans les fromages au lait cru. Dans ce cadre, l'objectif de la thèse était de mieux évaluer la pathogénicité des STEC dans les produits laitiers. Nous avons ainsi traité deux questions principales :

- Les STEC isolés de produits laitiers ont-ils les capacités génétiques pour déclencher les pathologies à STEC ?
- La présence de la matière grasse des fromages impacte-t-elle les capacités infectieuses des STEC ?

Le premier chapitre de la thèse est une synthèse bibliographique. Elle est consacrée aux rappels généraux sur les *E. coli* producteurs de Shiga toxines, leur épidémiologie avec un

focus particulier sur l'épidémiologie des STEC et leur comportement dans les produits laitiers. La seconde partie de la synthèse bibliographique traite de la pathogénicité des STEC. La troisième partie, présentée sous la forme d'un article de synthèse, est dédiée aux impacts de la matière grasse du lait et des glycoconjugués associés sur les capacités infectieuses des entéro-pathogènes.

Les second et troisième chapitres présentent les résultats expérimentaux et seront illustrés sous la forme de 3 publications scientifiques en anglais. Un résumé en français introduit chacun d'eux pour rappeler les objectifs, puis décrire succinctement les matériels et les méthodes utilisés et les principaux résultats et conclusions.

Les différentes contributions scientifiques et les communications affichées lors de congrès nationaux et internationaux sont présentées en annexes.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. ETAT DE L'ART SUR LES *E. COLI* PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES (STEC)

1. Généralités relatives aux *E. coli* producteurs de shiga-toxines (STEC)

1.1. Données taxonomiques et phylogénétiques

1.1.1. Le genre *Escherichia*

En 1885, l'Allemand Theodore Escherich décrit pour la première fois une bactérie isolée de selles d'un nourrisson. En 1919, Castellani et Chambert lui rendent hommage en nommant cette bactérie *Escherichia coli* (Grimont, 1987).

Les *E. coli* (**Figure 1**) sont des bacilles à Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bactéries aérobies anaérobies facultatives, mésophiles et asporulées se développant sur des milieux pauvres, fermentant les nitrates et ne possédant pas d'oxydase (Grimont, 1987). Commensale, *E. coli* est l'espèce prédominante de la flore aéro-anaérobie facultative du tube digestif des mammifères à sang chaud tel que l'Homme. Cette bactérie est l'une des premières colonisatrices du tractus gastro-intestinal du nouveau-né. Son implantation dans les premières heures suivant l'accouchement, notamment au niveau du côlon est maintenue durant toute la vie du sujet.

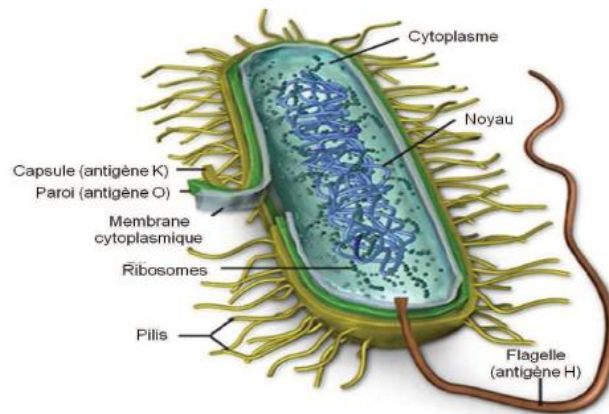


Figure 1: Représentation schématique de la structure d'*E. coli*.

D'autres espèces appartenant au genre *Escherichia* ont été décrites dans la littérature (Grimont, 1987; Priest and Barker, 2010). Il s'agit d'*Escherichia albertii* ; *E. fergusonii* ; *E. hermannii* et *E. vulneris*. Elles se différencient par leurs capacités métaboliques (Tableau 1).

Tableau 1 : Principaux critères biochimiques différentiels des espèces du genre *Escherichia* (d'après Grimont, 1987).

Caractéristiques	<i>E. coli</i> non-O157:H7	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. hermannii</i>	<i>E. vulneris</i>	<i>E. fergusonii</i>
Pigment jaune	-	-	+	(+)	-
LDC	(+)	(+)	-	+	+
ODC	+/-	+/-	+	-	+
β -xylosidase	-	-	-	+	-
β -glucoronidase	(+)	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	-	-
Malonate	-	-	-	+	-
Indole	+	+	+	-	+
Adonitol	-	-	-	-	+

(+) positif pour la majorité des souches ; +/- positif ou négatif selon les souches ; LC Lysine Décarboxylase, ODC Ornithine Décarboxylase.

1.1.2. Classification des *E. coli*

1.1.2.1. La classification sérologique

En plus des tests biochimiques, une classification sérologique basée sur l'identification des antigènes des *Escherichia* a été établie (James P Nataro and Kaper, 1998). Le sérotype se caractérise par l'identification des antigènes lipopolysaccharidiques O de la paroi. Ce polysaccharide constitue la partie externe du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram-négatif (Iguchi et al., 2015). Cet antigène O consiste en 10 à 25 répétitions d'une unité protéique comportant elle-même 5 à 7 résidus de sucres. La combinaison des différents sucres retrouvés à la surface de l'antigène somatique O est spécifique des différents sérotypes. En 2016, 184 sérotypes ont été identifiés chez *E. coli* (Iguchi et al., 2015). L'association spécifique du sérotype avec un des 56 antigènes protéiques flagellaire H définit le sérotype. Le flagelle est constitué d'une partie basale, d'un crochet et d'un assemblage hélicoïdal de flagelline portant les épitopes H. Les parties N- et C-terminale de la flagelline sont conservées, tandis que la région centrale est variable (Wang et al., 2003). L'antigène H est codé par le gène *fliC* (Beutin et al., 2016; Reid et al., 1999). Les *E. coli* ne synthétisant pas d'antigène flagellaire sont considérés comme non mobiles (NM ou H-). Les antigènes K capsulaires sont moins fréquemment utilisés car non communs à tous les *E. coli*.

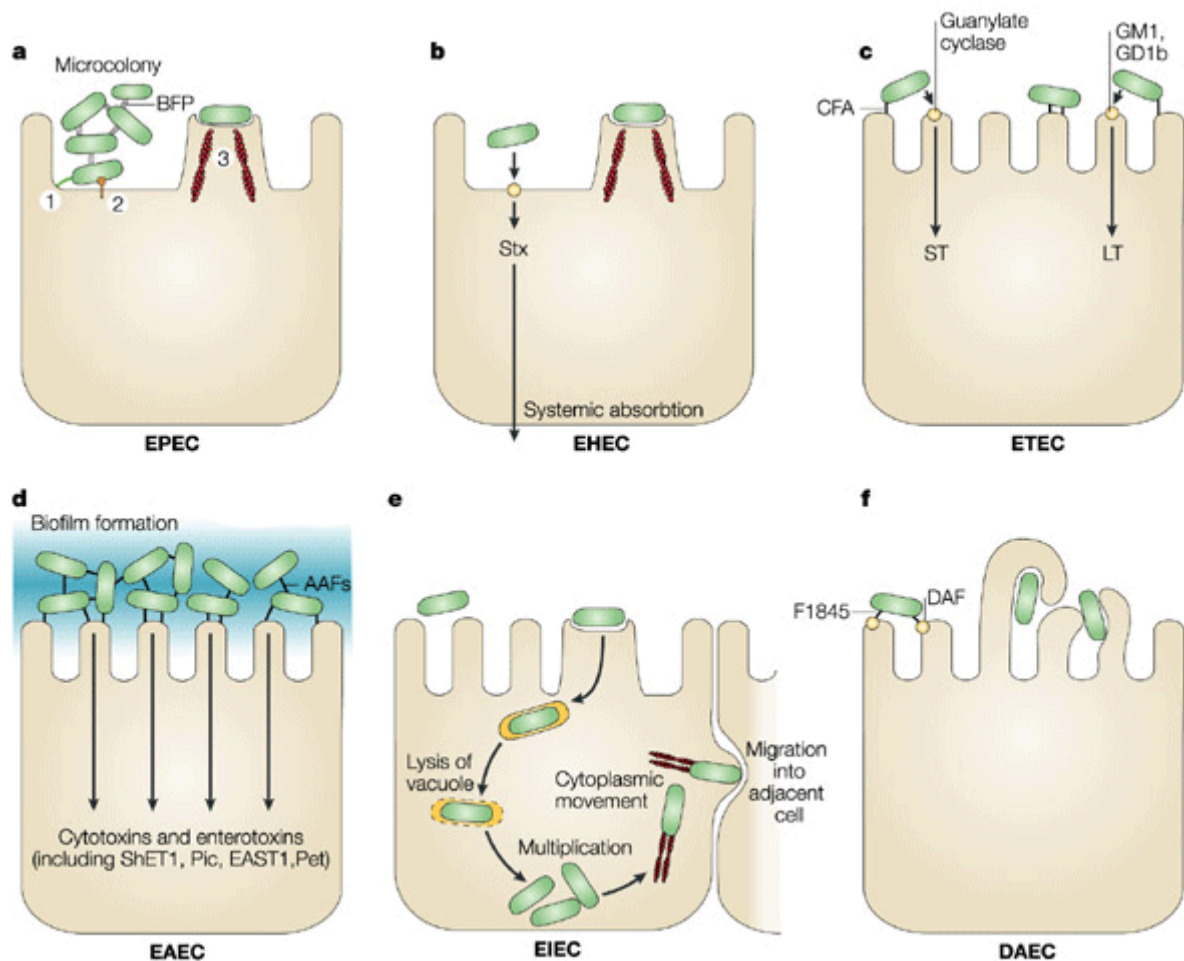
1.1.2.2. Les différents pathovars d'*E. coli*

Il existe une minorité de souches d'*E. coli* pathogènes. L'acquisition de facteurs de virulence par l'intermédiaire de transferts horizontaux (éléments transposables, bactériophages, plasmides...) ou de mutations est à l'origine de cette pathogénicité. Trois

syndromes cliniques d'infections à *E. coli* pathogènes ont été décrits : (1) les septicémies et les méningites dues aux *E. coli* associés aux Meningitidis and Necrosing *E. coli* (MNEC) ; (2) les infections du tractus urinaire dues aux *E. coli* Uropathogéniques (UPEC) ; et (3) les diarrhées. Les *E. coli* appartenant aux deux premiers groupes ont été référencés comme des *E. coli* responsables de pathologies Extra-intestinales et sont regroupés sous le terme d'ExPEC (Extra-intestinal pathogenic *E. coli*). Les *E. coli* appartenant au dernier groupe sont rassemblés sous le terme de pathogènes intestinaux « diarrhogènes ». Ces derniers ont été décrits en sept « pathovars », en fonction des signes cliniques, et des facteurs de pathogénicité exprimés (**Tableau 2** et **Figure 2**). Ils se déclinent en *E. coli* entéropathogènes (EPEC), *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), *E. coli* entéroagréatifs (EAggEC), *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC), *E. coli* adhérent-invasifs (AIEC) et *E. coli* entérohémorragiques (EHEC ; Mariani-Kurkdjian and Bingen, 2012).

Tableau 2 : Caractérisation des sept classes d'*E. coli* responsables de diarrhées chez l'homme.

Classes	Signes cliniques	Facteurs de pathogénicité
<i>E. coli</i> entérohémorragiques (EHEC)	Diarrhée aqueuse puis colites hémorragiques SHU	Shiga-toxines Lésions d'attachement-effacement
<i>E. coli</i> entérotoxigènes (ETEC)	Diarrhée aqueuse choléiforme (tourista)	Facteurs d'adhésion (CFA) Entérotoxines (LT, ST)
<i>E. coli</i> entéropathogènes (EPEC)	Diarrhée aqueuse	Facteurs d'adhésion (BFP) Lésions d'attachement-effacement
<i>E. coli</i> entéro-invasifs (EIEC)	Diarrhée dysentérique	Invasion des cellules épithéliales
<i>E. coli</i> entéro-agrégatifs (EAggEC)	Diarrhée persistante (> à 14 jours)	Facteurs d'adhésion (AAF) Entérotoxine (EAST)
<i>E. coli</i> à adhésion diffuse (DAEC)	Diarrhée aqueuse	Facteurs d'adhésion (Afa, AIDA)
<i>E. coli</i> adhérents-invasifs (AIEC)	Diarrhée chronique Maladie de Crohn	Adhésion/Invasion



Nature Reviews | Microbiology

Figure 2: Pathogénie associée à six des sept pathovars d'*E. coli* responsables de diarrhée (Kaper et al., 2004).

Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) constituent le premier pathotype d'*E. coli* décrit suite à une épidémie de diarrhées infantiles survenues en 1945 au Royaume Uni (Kaper et al., 2004). L'infection à EPEC touche principalement les jeunes enfants de moins de 2 ans. Ces bactéries sont à l'origine de lésions d'attachement-effacement (A/E) avec effacement des microvillosités intestinales. Ce phénomène peut être observé sur des coupes histologiques d'intestin de patients ou d'animaux infectés. L'apparition de ce phénotype d'attachement-effacement est due à l'expression conjointe par la bactérie du gène *eae* (« *enterocytes attaching effacing* ») et du gène *bfp* (« *bundle forming pili* ») (Bugarel et al., 2011).

L'infection à EPEC se caractérise par une forte diarrhée accompagnée de fièvre et de vomissements. Les EPEC sont l'une des causes majeures de diarrhée dans les pays en voie de développement.

Les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) représentent un pathovar d'*E. coli* responsable de dysenterie. Ces souches sont proches des *Shigella* d'un point de vue biochimique et génétique. Une fois dans l'environnement digestif, les EIEC pénètrent dans la muqueuse intestinale, préférentiellement au niveau du gros intestin, et développent une inflammation et une ulcération mucosale caractéristique. La pathologie à EIEC, tout comme celle induite par *Shigella*, se caractérise par une forte diarrhée aqueuse pouvant évoluer vers des syndromes dysentériques (faibles taux de selles sanglantes et riches en mucus). Ces syndromes sont généralement accompagnés de crampes abdominales, de forte fièvre et de vomissements.

Les *E. coli* entéroaggrégatifs (EAggEC ou EAEC) se caractérisent par une absence de synthèse de toxines thermolabiles (LT) ou thermostables (ST) et sont capables de coloniser les cellules HEp-2 (« *Human Epithelioma Pharynx* n° 2 ») suivant un profil agrégatif type « amas de briques » (James P Nataro and Kaper, 1998). Ce phénotype particulier semble être lié à l'expression de fimbriae AAF de type I et II, même s'ils ne sont pas présents dans la majorité des souches étudiées (James P Nataro and Kaper, 1998). Ces bactéries sont responsables de fortes diarrhées pouvant évoluer vers des diarrhées persistantes. Il a été estimé que ces souches étaient impliquées dans des retards de croissance potentiels chez les jeunes sujets. Les souches appartenant à ce pathovar semblent sécréter différentes toxines telles que la *Shigella* entérotoxine de type 1 (ShET1) ou encore la toxine EAST1 (« *EnteroAggregative heat-Stable Toxin 1* »).

Les *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC) représentent une source fréquente de la diarrhée infectieuse du voyageur (« *tourista* ») et du nourrisson. Ces pathogènes se

caractérisent par la synthèse de toxines thermolabiles (LT) et/ou thermostables (ST). Les gènes codant pour ces deux types de toxines sont portés par un plasmide. Les ETEC colonisent la surface mucosale du petit intestin où elles produisent des entéro-toxines qui favorisent les sécrétions intestinales. La colonisation des muqueuses intestinales semble liée à l'expression d'adhésines fimbriaires appelées CFA (« *Colonisation Factor Antigen* »). Les symptômes cliniques peuvent être brefs et peu importants ou d'une extrême gravité (Levine, 1987; Wolf, 1997).

Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) présentent un phénotype « d'adhésion diffuse » sur des cellules HEp-2 cultivées *in vitro* (Kaper et al., 2004; James P Nataro and Kaper, 1998). Ils sont impliqués dans le déclenchement de diarrhées chez les enfants de plus de 12 mois (Kaper et al., 2004; Torres et al., 2005). Les DAEC produisent, pour 75% des souches étudiées l'adhésine fimbriaire F1845 appartenant à la famille des adhésines Afa/Dr, impliquées dans les infections urinaires et les troubles digestifs. Ces adhésines reconnaissent une protéine de surface cellulaire impliquée dans la protection cellulaire des dégâts induits par le complément. Ce pathovar d'*E. coli* induit un phénotype cytopathique caractérisé par un développement de longues extensions cellulaires entourant la bactérie (Kaper et al., 2004). Les gènes codant pour les fimbriae responsables de ce phénotype semblent être retrouvés à la fois au niveau chromosomique et au niveau plasmidique.

Les *E. coli* adhérent-invasifs (AIEC) sont impliqués dans le déclenchement de pathologies nécrosantes du tractus gastro-intestinal humain telle que la maladie de Crohn. Les pathologies dues aux AIEC sont une cause majeure de mortalité et de morbidité infantile nécessitant des traitements à vie. Ces souches AIEC ont la capacité d'envahir et de se multiplier dans les macrophages tout en inhibant l'apoptose de la cellule hôte. De plus, Elles ont la capacité d'induire la synthèse de TNF-alpha (« *Tumour Necrosis Facteur* ») qui

pourrait entraîner l'inflammation caractéristique de la maladie de Crohn (Chassaing et al., 2011; Darfeuille-Michaud, 2002).

Les *E. coli* Enterohémorragiques (EHEC) sont des souches particulières de *E. coli* **producteurs de Shiga-toxines (STEC)** ou de Vérotoxines (VTEC), caractérisées par la production de « *Shiga-like* » cytotoxines (AFSSA, 2010). Ils sont isolés chez les malades ayant développé une infection. Ces infections constituent un problème majeur en santé publique en raison de l'extrême sévérité des manifestations cliniques qu'ils peuvent générer (Syndrome Hémolytique, PTT....). Bien que les souches d'EHEC les plus fréquemment rencontrées lors d'épidémies appartiennent au sérotype O157:H7, de nombreux autres sérotypes comme O26:H11, O103:H2, O111:H8 ou O145:H28 ont également été impliqués dans des cas d'infections épidémiques ou non (AFSSA, 2010; Hussein, 2007). La biodiversité et l'absence de modèle approprié pour l'estimation de la pathogénicité des STEC ont amené les chercheurs à associer les souches en fonction de leurs incidences et implications dans le déclenchement d'épidémies liés aux STEC (Karmali et al., 2003). Ainsi, il a été défini que les souches appartenant au sérotype O157 sont classifiées dans le sérotypage potentiellement hautement virulent A, tandis que celles appartenant au sérotypage E n'ont jamais été associées à des pathologies humaines (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Classification des sérotypes de STEC en séropathotypes (d'après Karmali et al., 2003).

Séropathotype	Incidence relative	Fréquence d'implication dans les épidémies	Association à des symptômes graves (SHU, colite hémorragique)	Sérotypes
A	Elevée	Commune	Oui	O157:H7, O157:NM
B	Modérée	Peu commune	Oui	O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19, O145:NM
C	Faible	Rare	Oui	O91:H21, O104:H21, O113:H21, autres
D	Faible	Rare	Non	Multiple
E	Non-humain	Non-applicable	Non-applicable	Multiple

1.1.2.3. Phylogénie des *E. coli*

La phylogénie est une classification des espèces basée sur des caractères génétiques permettant de définir les relations de clonalité entre les différentes souches de l'espèce. L'obtention d'informations moléculaires relatives à ces relations permet d'appréhender l'histoire évolutive des souches.

Les variabilités de séquences génomiques ainsi que des profils électrophorétiques de 11 enzymes retrouvées de manière consensuelle chez *E. coli* classifient les différents pathovars de *E. coli* en 6 groupes phylogénétiques distincts (A, B1, B2, C D et E) (Ochman and Selander, 1984). Les ExPEC se retrouvent majoritairement dans les phylogroupes B2 et D, tandis que les souches d'*E. coli* diarrhéagéniques, tels que les EHEC/STEC, sont regroupées préférentiellement dans les clusters A et B1 (Girardeau et al., 2005).

En 2016, il est admis que les EHEC seraient issus de deux clones d'EPEC ayant acquis, par l'intermédiaire de transferts horizontaux, les gènes de synthèse des toxines Stx. Ces deux lignées seraient à l'origine des clones O157, et O26/O111 (Ogura et al., 2009; Sperandio et al., 1998; Wieler et al., 2006).

1.2. Les *E. coli* producteurs de shiga toxine (STEC)

1.2.1. Définitions

En France, l'ANSES a défini en 2008 puis en 2010 (AFSSA, 2010), sur la base de données épidémiologiques, que les souches STEC pathogènes aussi nommées « EHEC typiques majeurs » possèdent les critères génétiques suivants (figure 3):

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).

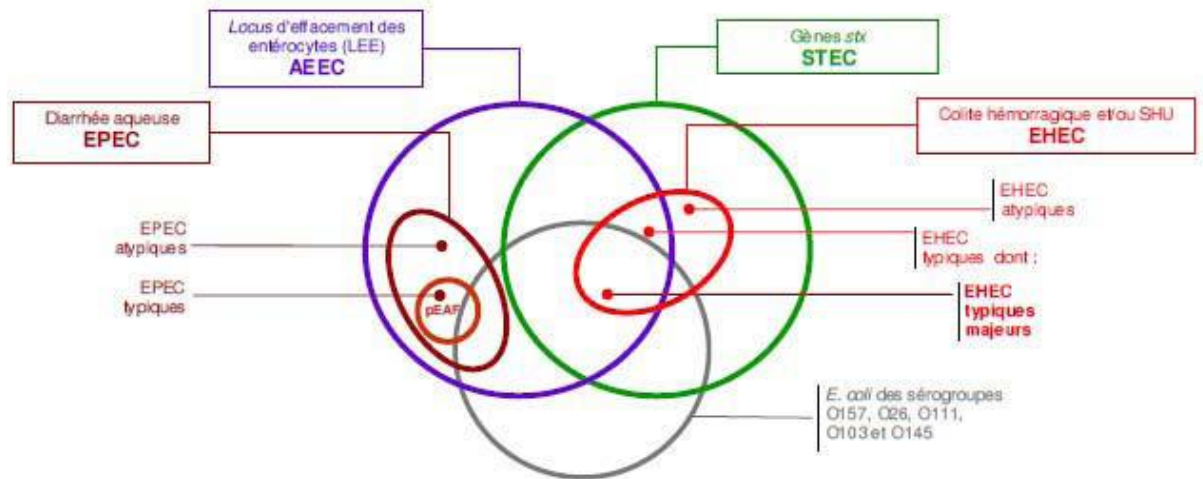


Figure 3 : Diagramme de Venn illustrant le système de classification des AEEC/EPEC/STEC/EHEC à partir des signes cliniques et des facteurs de virulence associés aux souches d'*E. coli* (AFSSA, 2010). Les surfaces des disques et intersections ne sont pas proportionnelles à la prévalence des différents types d'*E. coli*.

Par ailleurs, l'ANSES (2010) a défini que les STEC appartenant aux sérotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 et qui possèdent concomitamment les gènes de virulences *stx1* et/ou *stx2* ainsi que les variants du gène *eae* spécifique du sérotype investigué sont potentiellement hautement pathogènes (**Figure 3**).

1.2.2. Manifestations cliniques liées à l'infection à EHEC

Une infection à EHEC peut se présenter sous différentes formes allant du portage asymptomatique à la mort du sujet en passant par de potentielles complications systémiques telles que le syndrome hémolytique et urémique (SHU) ou le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT, **Figure 4**). L'infection à EHEC est la cause la plus fréquente d'insuffisance rénale aigüe chez les enfants de moins de 5 ans en Amérique et en Europe, (INVS, 2007; Mariani-Kurkdjian and Bingen, 2012). En France, la surveillance des symptômes aux infections à EHEC est menée par des néphrologues pédiatres volontaires. Les enquêtes destinées à établir les sources des contaminations humaines ne sont réalisées que lors

d'épidémies (à partir de deux cas). La prévalence reste donc sous-estimée vis-à-vis de la réalité puisque les cas sporadiques ne sont pas pris en compte dans les calculs de prévalence.

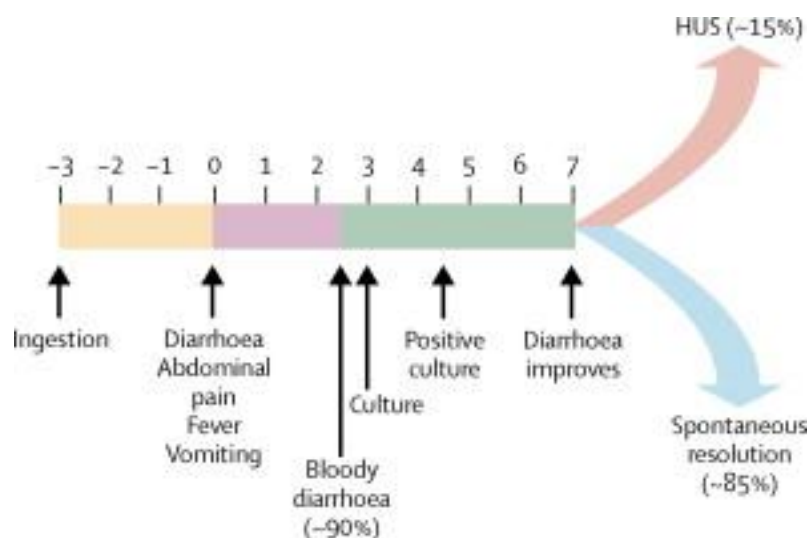


Figure 4: Evolutions cliniques après ingestion de souches EHEC (Tarr et al., 2005).

1.2.2.1. Colites et colites hémolytiques

La forme la plus fréquente de l'infection à EHEC se traduit par l'apparition de diarrhées aqueuses pouvant évoluer vers des colites hémorragiques chez des sujets généralement apyrétiques ou subfébriles (Griffin and Tauxe, 1991). Les colites hémorragiques sont observées dans 90% des patients diagnostiqués positifs pour les EHEC (Tarr et al., 1996). La période d'incubation est comprise entre 2 à 10 jours (Griffin and Tauxe, 1991). Les symptômes se résolvent spontanément en quelques jours dans 90% des cas.

1.2.2.2. Le syndrome hémolytique et urémique (SHU)

Ce syndrome a été décrit pour la première fois en 1955 par Gasser, mais la relation entre une infection intestinale à EHEC et la survenue d'un cas de SHU n'est établie qu'en 1983 par Karmali *et al.* (Karmali et al., 1983). Le SHU touche surtout l'enfant de moins de 3 ans mais également les personnes âgées (plus de 65 ans), les femmes enceintes ainsi que les personnes immunodéprimées. Il survient généralement après une diarrhée prodromique sanglante dans les 7 à 15 jours suivant l'ingestion. Les symptômes sont caractérisés par une insuffisance rénale aigüe, une anémie hémolytique et une diminution du nombre de plaquettes sanguines (thrombopénie) caractéristiques du SHU. L'incidence du SHU est de 10 % chez les enfants de moins de 10 ans et de 10 à 20 % chez les sujets âgés (Griffin and Tauxe, 1991). Ce syndrome post-diarrhéique représente approximativement 90% des cas de SHU de l'enfant et la résolution des cas se fait spontanément dans environ 70% des cas (Loirat et al., 1992). Il est à l'origine de la première cause d'insuffisance rénale du nourrisson. D'autres organes comme le pancréas, le foie et le système nerveux central peuvent également être touchés. L'atteinte du système nerveux central semble être la cause de décès majeure des sujets (Decludt et al., 2000; Loirat et al., 1992). Le traitement actuel de cette pathologie reste aujourd'hui majoritairement symptomatique. La létalité du SHU varie de 3 à 5% et plus d'un tiers des patients conservent des séquelles rénales à long terme (InVS, 2012).

1.2.2.3. Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PPT)

Décrit pour la première fois par Moschcowit (1925), le PTT présente une étiologie de diverses origines (toxique, auto-immune...). La relation entre le syndrome et une infection à EHEC a été faite par Kovacs et al., (1990). Plus souvent chez l'adulte, il est exceptionnel chez l'enfant et la personne âgée. Il se caractérise par l'apparition de signes neurologiques sous la forme d'anémies hémolytiques micro-angiopathiques et thrombotiques associées à une apparition de fièvre et des dysfonctionnement rénaux (Tarr et al., 2005). Le PTT reste néanmoins rare suite à une infection à EHEC.

Points clés n°1 :

- Les *E. coli* sont des bactéries commensales. Certaines souches ayant acquis des facteurs de virulence peuvent être responsables de pathologies chez l'homme.
- Les EHEC sont des STEC isolés chez l'homme et responsables d'infections humaines.
- Les souches EHEC le plus souvent impliquées dans les épidémies alimentaires appartiennent aux sérogroupes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O145:H28 et O111:H8 et possèdent concomitamment les gènes *eae* et *stx*
- Les EHEC sont responsables de différents symptômes allant de la diarrhée simple ou la diarrhée hémorragique au syndrome hémolytique et urémique, et pouvant parfois entraîner la mort.

2. Epidémiologie des STEC

2.1. Surveillance des cas de contaminations à STEC en France

La surveillance des cas d'infection à EHEC est actuellement basée sur l'apparition de cas de SHU chez les enfants de moins de 15 ans. Ainsi, les pathologies à EHEC n'évoluant pas vers un SHU ne sont recensées ni chez l'enfant ni chez l'adulte. En France, la surveillance des infections à EHEC est basée, depuis 1996, sur la surveillance des SHU déclarés chez les enfants de moins de 15 ans. Cette surveillance est effectuée par un réseau de néphrologue pédiatres volontaires répartis sur l'ensemble du territoire métropolitain (31 services). Tout enfant de moins de 15 ans présentant un tableau clinique précis de déclenchement de SHU est ainsi signalé à l'Institut de Veille Sanitaire (InVS). Contrairement aux cas groupés de pathologies à STEC, l'apparition de cas sporadiques ne justifie pas l'établissement d'un protocole d'investigation exploratoire. Celui-ci, en cas d'épidémie, est complété si nécessaire par des investigations vétérinaires et microbiologiques. En cas d'apparition de nouveau cas dans l'entourage direct du premier cas dans les deux semaines suivant le début d'apparition du premier cas de SHU, une nouvelle étude est menée afin d'identifier une potentielle exposition commune des patients. L'infection à STEC est confirmée par le Centre National de Référence (CNR) des *E. coli* et *Shigella* et le laboratoire associé au CNR.

2.2. Le cycle épidémique

Le principal réservoir des EHEC est le tube digestif des ruminants, en particulier des bovins. En Auvergne, une étude épidémiologique a montré que 70% des bovins hébergent des

STEC (Pradel et al., 2000). Néanmoins, les bovins ne sont pas les seuls porteurs de ces bactéries puisque des études sur le portage ont montré la présence de STEC chez les ovins (Blanco et al., 2004; Zschöck et al., 2000), les caprins (Zschöck et al., 2000), le yak (Bandyopadhyay et al., 2012) et les chameaux (Salehi et al., 2012). Des études de portage chez les animaux domestiques ont également montré la présence de STEC chez le chat, le chien et le poulet (Beutin et al., 2007; Zahraei Salehi et al., 2010).

Les études et les investigations épidémiologiques mises en place lors d'épidémies ont permis d'identifier 4 voies principales de transmission des STEC : 1) l'ingestion d'aliments contaminés, consommés crus ou insuffisamment cuits ou encore mal lavés, 2) la transmission hydrique (eau de boisson ou de baignade), 3) la transmission interhumaine et 4) le contact avec les animaux de ferme et leur environnement (**Figure 5**). Par ailleurs, la dose infectieuse de ce type de bactéries est très faible : moins de 100 bactéries ingérées (James P Nataro and Kaper, 1998).

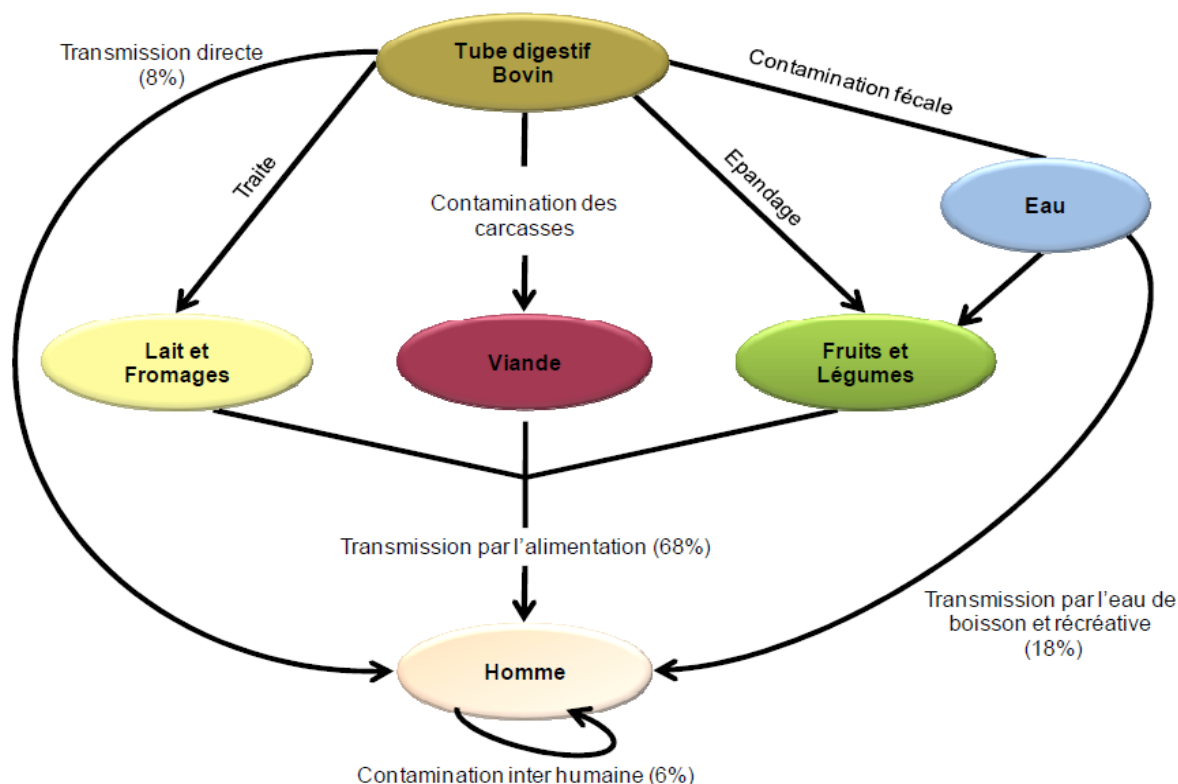


Figure 5: Réservoir et mode de transmission des EHEC (AFSSA, 2010).

Les épidémies d'origine hydrique sont généralement associées à la consommation d'eau de boisson contaminée ou à l'ingestion accidentelle d'eaux de baignade (EFSA and ECDC, 2015; EFSA, 2014; Keene et al., 1994). Ces eaux seraient contaminées suite à des contacts avec des écoulements d'épandage dans les nappes phréatiques. De nombreux cas sporadiques ont été recensés suite à la consommation d'eaux de puits ou de sources privées non traitées par les autorités sanitaires (EFSA, 2014; Holme, 2003; Jackson et al., 1998). Les analyses de routine des eaux de consommation mises en place dans les années 2000 ont permis une diminution du nombre de cas sporadiques et épidémiologiques dus à la consommation d'eau contaminée par des STEC.

Des cas de porteurs sains humains de STEC ont été recensés dans la littérature mais semblent rares (Silvestro et al., 2004; Stephan and Untermann, 1999). Par ailleurs, ce portage

reste difficile à estimer puisque la détection des STEC nécessite des examens cliniques que la majorité des individus porteurs sains ne passent pas. Les principaux cas de transmission interhumaine résultent de contamination oro-fécal. L'hygiène générale et la promiscuité sont des points critiques dans ce type de transmission (Al-Jader et al., 1999; Allaby and Mayon-White, 1995; Belongia, 1993; Boudailliez et al., 1997; Swerdlow and Griffin, 1997). Les environnements à risque sont les crèches, les centres de soins journaliers et psychiatriques (Reida et al., 1994). Ce mode de transmission est également à l'origine de la dissémination des pathogènes au sein des familles (Ludwig and Muller-wicfel, 1998) et des hôpitaux (Bolduc et al., 2004; Karmali et al., 1999).

Le portage important de STEC chez les animaux de bétail favorise l'apparition de cas de contaminations sporadiques ou de plus grande envergure chez les populations en contact avec les animaux de ferme (Crump et al., 2002; O'Brien et al., 2001). La contamination se fait par contact direct ou indirect avec des animaux de ferme ou leurs déjections. Le taux de porteurs sains humains à STEC recensé est plus important dans les populations en contact avec l'environnement de ferme (Evans et al., 2000). Des contaminations impliquant des contacts avec des sols riches en STEC ont également été décrites dans le cadre de festivals en plein air et de camping sur des sites de pâturage (Crampin et al., 1999; Ogden et al., 2002).

La contamination alimentaire est impliquée dans la moitié des épidémies à EHEC. De nombreux produits, principalement issus de produits dérivés du bovin sont majoritairement mis en cause (EFSA and ECDC, 2015; EFSA, 2014). Il s'agit principalement de la viande de bœuf crue ou insuffisamment cuite et des végétaux souillés par des déjections de ruminants excréteurs de STEC et consommés crus et mal lavés.

Les produits carnés sont à l'origine d'un grand nombre de toxi-infections à *E. coli* O157:H7 (EFSA, 2014; Vernozy-Rozand and Montet, 2001). En 2016, la consommation de

viande de bœuf crue ou insuffisamment cuite est toujours la source majeure de contamination par des EHEC (EFSA and ECDC, 2015; EFSA, 2014). Il a également été recensé des cas de contamination suite à la consommation de viande d'autres animaux de boucherie ou de volailles (EFSA and ECDC, 2015; EFSA, 2014). La contamination des produits carnés se fait généralement par l'introduction dans la chaîne alimentaire de carcasses d'animaux contaminées par des STEC. Le transfert de ces bactéries peut ensuite se faire par contact direct des aliments sur des surfaces souillées lors des étapes de transformation des viandes (EFSA and ECDC, 2015; EFSA, 2014). Le **Tableau 4** résume les taux de contamination de ces matrices évalués à partir des différents plans de surveillance menés en France entre 2006 et 2011 (Loukiadis et al., 2012).

Tableau 4 : Taux de contamination par des souches STEC considérées comme hautement pathogènes, de viandes de bœuf analysées en France au cours des plans de surveillance de 2006 à 2011 (d'après Loukiadis et al., 2012)

Année	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Type de produits investigués	VHR/production	VHS/production	Minerais	VHR/distribution	VHR/Distribution	VHS/production
Taux de contamination des viandes de bœuf (en %)	0	0,3	1	0,1	0,2	0,5
(Nombre positifs/nombre analysés*)	(0/796)	(11/3 605)	(10/992)	(2/1 557)	(5/2 476)	(9/1 878)
Intervalle de confiance à 95%	(0-0,4)	(0,2-0,6)	(0,5-1,9)	(0-0,5)	(0,1-0,5)	(0,2-0,9)

VHR : viandes hachées de bœuf réfrigérées

VHS : viandes hachées de bœuf surgelées

* Pour chaque échantillon analysé, les résultats positifs correspondent à la confirmation de la présence d'au moins une souche STEC considérée hautement pathogène dans 25 g.

De nombreuses épidémies de grande envergure ont été recensées suite à la consommation de produits végétaux (fruits, salade, radis, épinards, oignons, graines germées,...) contaminés. Les contaminations de ce type de produits pourraient être dues aux eaux d'irrigation des cultures, au sol contaminé suite à l'épandage d'effluents d'élevages de la faune locale (EFSA and ECDC, 2015; EFSA, 2014).

Des épidémies ont également été reliées, à la consommation de produits au lait cru.

2.3. Epidémiologie à STEC dans la filière lait

2.3.1. Les STEC dans l'environnement de ferme laitière

Les STEC sont retrouvés de manière asymptomatique chez les ruminants. Le tube digestif des bovins représente le réservoir principal des STEC. Les souches semblent être retrouvées tout le long du tractus gastro-intestinal (Keen et al., 2006; Pradel et al., 2000). Les risques de contamination alimentaire et de transmission à l'Homme par contact avec des bovins ont motivé de nombreuses études sur l'excrétion de STEC et leur maintien dans l'environnement de ferme, notamment de ferme laitière, et plus précisément des souches appartenant au sérotype O157.

2.3.1.1. Les réservoirs animaux et l'excrétion de STEC par le bétail

Les ruminants laitiers, et plus particulièrement les bovins et les caprins, sont des excréteurs potentiels de STEC. La prévalence des STEC dans les fèces de ces ruminants est principalement estimée par la détection du gène *stx* (Gyles, 2007; Hussein and Sakuma, 2004). La prévalence de ces gènes dans les fèces de ruminants laitiers semble variable en fonction du site géographique et de l'espèce considérée (Beutin et al., 1993; Blanco et al., 2004; Cobbaut et al., 2009; Cortés et al., 2005; EFSA, 2015; Zschöck et al., 2000). Par ailleurs, il semblerait que le portage de souches STEC appartenant au sérotype O157:H7 soit très faible chez les ovins et les caprins (La Ragione et al., 2009). Par ailleurs, ces souches sont

rarement porteuses des gènes *eae* et *stx2* (Beutin et al., 1993; Blanco et al., 2004; Kudva et al., 1997, 1996; Orden et al., 2003; Solecki et al., 2009; Zschöck et al., 2000).

La fréquence d'excrétion de STEC par les ruminants est actuellement controversée. Cette excrétion serait persistante d'après Orden et al., (2008), alors que la majorité des auteurs (Heuvelink et al., 1998; Kudva et al., 1997; Mechie et al., 1997; Rahn et al., 1997) la considère comme transitoire. L'excrétion des STEC peut varier en fonction des saisons avec une augmentation durant les mois d'été (Berry and Wells, 2010; Hancock et al., 1997; Heuvelink et al., 1998; Van Donkersgoed et al., 2001). Deux catégories d'excréteurs, ont été décrites notamment chez les bovins : les excréteurs et les « super » excréteurs ($> 10^4$ UFC par gramme de fèces) (Chase-Topping et al., 2008; Low et al., 2005; Naylor et al., 2003).

2.3.1.2. Persistance des STEC dans l'environnement de ferme laitière

Les STEC peuvent persister plusieurs mois dans les fermes (Farrokh et al., 2013; Fremaux et al., 2006; Gyles, 2007; Hussein and Sakuma, 2004; Widiastih et al., 2004). Ainsi des souches d'*E. coli* O157 peuvent persister 17 mois dans une même ferme et être excrétées 7 mois par les vaches (Liebana et al., 2005). La survie des STEC dans les fèces de ruminants est d'environ 100 jours pour les sérotypes O157:H7 et O26:H11 et pour O111 (Duffy, 2003; Fukushima et al., 1999; Scott et al., 2006). Cette persistance de STEC dans les environnements de fermes laitières est un des facteurs principaux de risque de contamination des animaux de traite et des produits laitiers lors de la traite.

2.3.2. Les voies de contamination des produits laitiers par les STEC

La contamination des produits laitiers par les STEC au niveau des fromageries résultant du non-respect des règles d'hygiène reste relativement rare. Lors de la traite, les matières fécales d'animaux laitiers porteurs seraient une des voies de contamination du lait (Ansary and Kaspar, 1997; Kousta et al., 2010). Des co-cultures de cellules épithéliales mammaires avec des souches de *E. coli* O157:H7 suggèrent également une sécrétion potentielle de ces bactéries directement au niveau mammaire (Matthews et al., 1997). Elle serait responsable de mammites sub-cliniques liées à STEC. Néanmoins, cette voie de contamination reste rare. Les STEC pourraient également persister sur les matériels de traite insuffisamment entretenus (Farrokh et al., 2013) (**Figure 6**).

La présence des STEC dans le tractus digestif des ruminants suggère que le contrôle total de la contamination des produits laitiers à l'échelle de la ferme laitière est difficile. Néanmoins, des mesures, tant préventives que curatives, semblent maintenir le taux de STEC dans ces environnements à des taux acceptables (Berry and Wells, 2010; Hussein and Sakuma, 2004; LeJeune and Wetzel, 2007). Ces mesures visent à limiter l'excrétion de STEC par les animaux en identifiant et en agissant sur les excréteurs de STEC. Ces actions incluent l'utilisation de probiotiques antagonistes des STEC, de vaccins (aux Etats-Unis), la modification de l'alimentation des animaux ou en minimisant leur stress (Berry and Wells, 2010; Hussein and Sakuma, 2004; LeJeune and Wetzel, 2007). Elles visent également à limiter la circulation des souches STEC d'une ferme à l'autre et à réduire les contaminations fécales du lait lors de la traite (Farrokh et al., 2013).

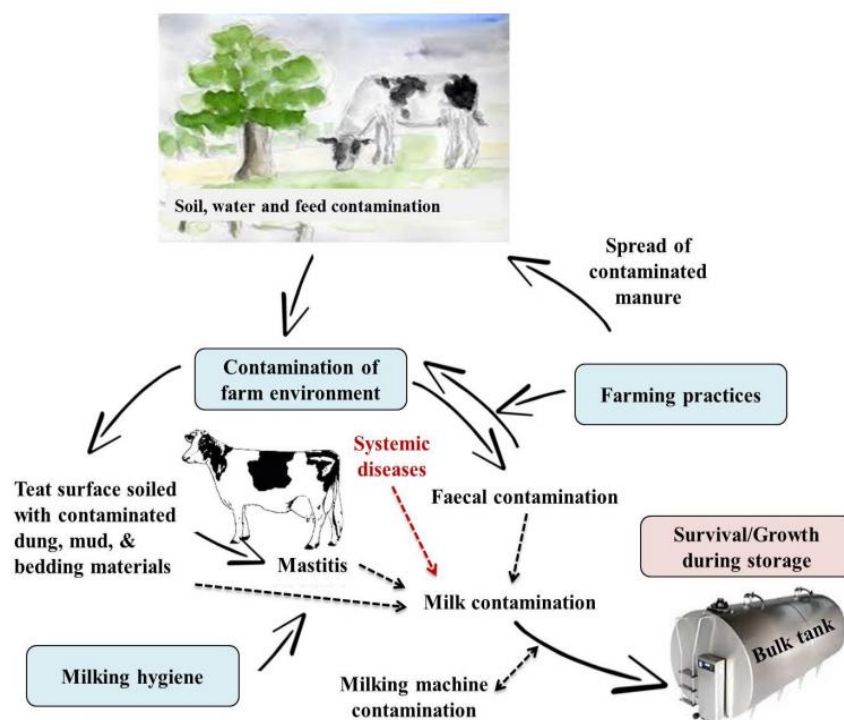


Figure 6: Diagramme schématisant les sources potentielles de contamination microbiologique du lait cru à la ferme. Les flèches en trait plein représentent les principales sources de contamination (EFSA, 2015).

2.3.3. Détection des STEC dans les aliments et prévalence dans les produits au lait cru

Aucun critère microbiologique relatif à la détection des STEC dans les matrices alimentaires n'existe en 2016, excepté dans les graines germées (depuis 2013). En effet, le comité européen est arrivé à la conclusion que la mise en place de ce type de critère n'entraînerait probablement pas de réduction sensible du risque connexe pour le consommateur compte tenu des faibles taux de contamination des aliments à risque. Néanmoins, le comité a identifié des catégories de denrées alimentaires dans lesquelles les STEC représentent un risque pour la santé publique. Il s'agit des viandes crues ou peu cuites de bœuf, des viandes hachées, du lait cru et des produits au lait cru et des végétaux

consommés non cuits. Néanmoins, l'absence de critère réglementaire ne signifie pas qu'il y ait une absence de danger. Dans ce cadre, le paquet hygiène (CE, n°178/2002) impose aux producteurs de mettre sur le marché des produits alimentaires indemnes de toute contamination, les rendant ainsi responsables de la qualité sanitaire de leurs produits. Ainsi, les industriels produisant des aliments à risque intègrent donc de plus en plus les STEC dans leur plan de maîtrise sanitaire.

En France, la recherche des STEC se fait classiquement par une prise d'essai suivie d'une étape d'enrichissement (sélective ou non). En cas de résultat positif lors de la détection, une étape de confirmation est alors engagée, visant à isoler la souche afin de l'identifier à un genre, une espèce et d'identifier ses facteurs de virulence. *E. coli* O157:H7 étant le sérotype le plus impliqué dans les cas de pathologies humaines, et le plus facile à mettre en évidence, une méthode normative (ISO 16654) a été mise en place depuis 2001. De nombreuses méthodes alternatives validées AFNOR permettant la détection de ce sérotype sont également commercialisées. Depuis 2012, la spécification technique ISO-TS 13136 définit une méthode horizontale pour la détection des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines appartenant aux sérogroupes O157, O26, O103, O111 et O145. La méthode repose sur la primo-détection des gènes *stx* et *eae* par PCR en temps réel. En cas de présence de ces deux gènes, une détection du séro groupe, en accord avec la définition d'un STEC potentiellement hautement pathogène de l'ANSES est effectuée (**Figure 7**).

En France, selon les recommandations de l'ANSES (Avis de 2010), les autorités recommandent de gérer le danger lié aux STEC potentiellement hautement pathogènes appartenant aux sérotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 et O157:H7 et possédant concomitamment les gènes *stx* et *eae*. D'autres pays européens, ne gèrent pas le même danger et recherchent par exemple toutes les souches d'*E. coli* qui possèdent un gène *stx* (EFSA and ECDC, 2015).

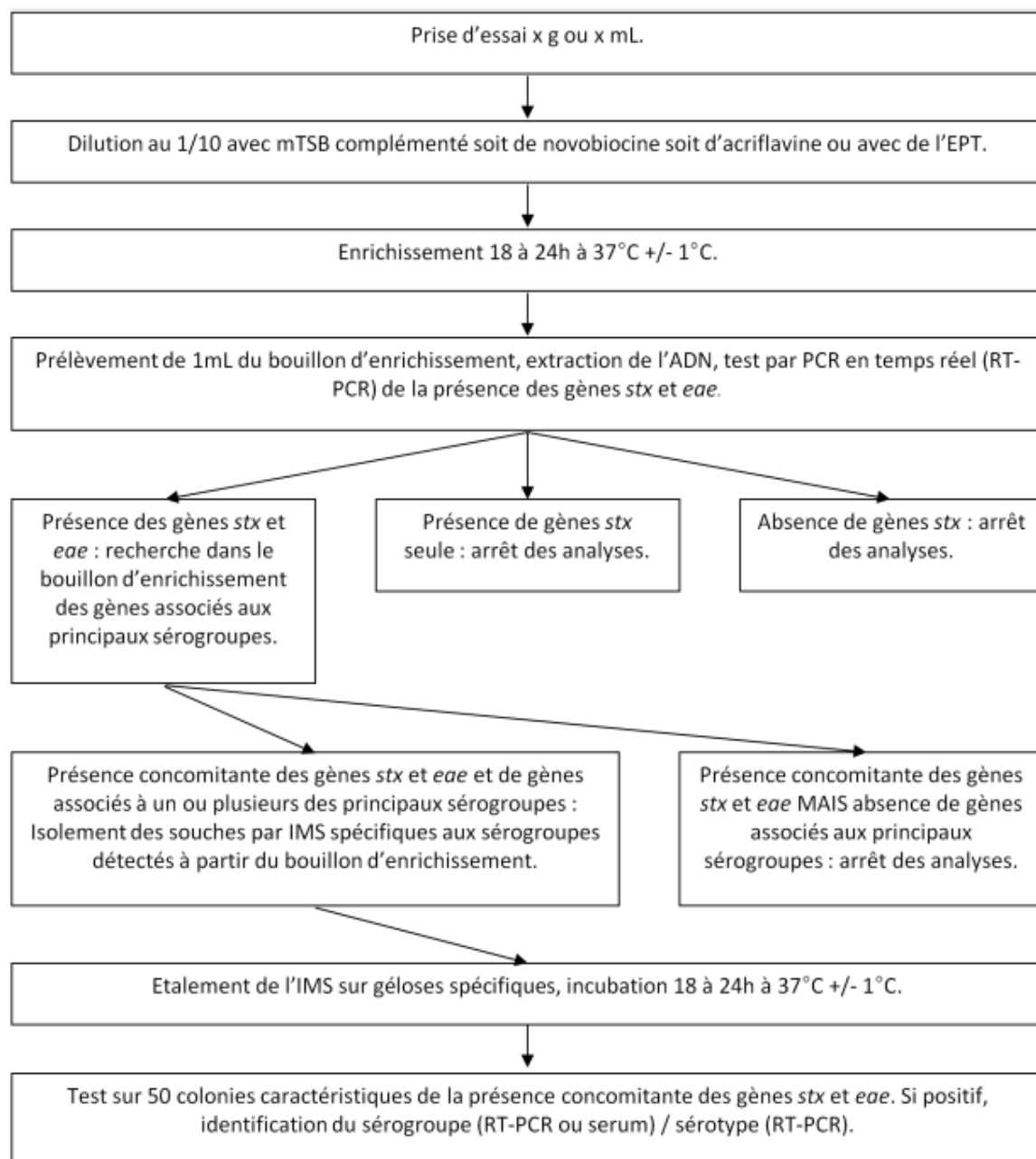


Figure 7: Diagramme simplifié représentant la procédure de recherche des STEC selon la norme ISO-TS 13136. IMS : Immuno-séparation magnétique

La prévalence des STEC dans les produits laitiers a été largement publiée (Baylis, 2009). Néanmoins, ces études sont principalement basées sur la détection de gènes et non pas des souches de STEC viables propres à présenter un risque potentiel pour la santé humaine. Elles ne fournissent donc que des informations relatives à la prévalence de gènes de pathogénicité

et de virulence (*eae*, *stx1/2*) et aux caractéristiques génétiques de souches STEC (Beutin et al., 2007; Fach et al., 2001). La prévalence des gènes de virulence *stx1* et/ou *stx2* dans le lait de vache est généralement bien plus importante que celle des souches de STEC isolées. Par exemple, la prévalence des gènes *stx1* et *stx2* dans les laits crus bovins était respectivement de 36% et 21% alors que la présence de souches STEC n'était que de 0,8% et 3,2% (Cobbold et al., 2008; Lynch et al., 2012). De manière globale, le pourcentage de lait cru contaminé par les STEC serait compris entre 0 et 2% (Bastian et al., 2000; Farrokh et al., 2013; Hussein and Sakuma, 2004).

Concernant la prévalence des STEC dans les fromages au lait cru, trois plans de surveillance ont été conduits en France (**Tableau 5**). Aucune souche de STEC n'a été retrouvée lors des deux premiers plans de surveillance (2005 et 2007) qui portaient sur l'analyse de 871 et 392 échantillons de fromage respectivement. Le plan de surveillance de 2009 a montré une prévalence de 0,9% de STEC dans 1924 échantillons de fromages fabriqués à partir de laits crus de vache, de brebis et de chèvre (Loukiadis et al., 2012). Il est à noter que les technologies de détection des STEC ont grandement évolué entre ces différents plans de surveillance suggérant que les résultats des deux premiers plans de surveillance puissent résulter de faux négatifs (Auvray et al., 2009; Delannoy et al., 2013a; Fach et al., 2001). Le dernier plan de surveillance européen mené en 2014 a montré que 1,2% des laits étudiés étaient positifs en STEC (EFSA, 2015).

Tableau 5 : Taux de contamination par des souches STEC considérées comme hautement pathogènes des produits laitiers analysés en France au cours des plans de surveillance et de contrôle en 2005, 2007 et 2009 (d'après Loukiadis et al., 2012).

Année	2005	2007	2009
Type de produits investigués	Fromages de chèvre frais au lait cru	Fromages au lait cru de vache, brebis et chèvre	Fromages au lait cru de vache, brebis et chèvre ^a
Taux de contamination des fromages (en %) (Nombres positifs/nombres analysés*)	0 (0/871)	0 (0/392)	0,9 (17/1911)
Intervalle de confiance à 95%	(0-0,4)	(0-0,9)	(0,6-1,4)

a : 1050 fromages au lait de vache, 510 au lait de chèvre et 347 au lait de brebis.

* Pour chaque échantillon analysé, les résultats positifs correspondent à la confirmation de la présence d'au moins une souche STEC considérée hautement pathogène dans la prise d'essai.

2.3.4. Les principales épidémies liées aux EHEC

La première épidémie recensée à EHEC a eu lieu aux Etats-Unis en 1982 suite à la consommation de steaks hachés contaminés. Les pays dont la fréquence d'isolement d'EHEC O157:H7 est la plus importante sont les Etats-Unis, le Canada et le Royaume-Uni. Ce sérotype a également été décrit en Australie, Argentine, Afrique du Sud, Thaïlande, Israël, Chine, Japon et dans différents pays Européens (Belgique, Italie, République Tchèque, Espagne, France). Les EHEC constituent la cause majeure de diarrhées hémorragiques et de SHU dans les pays développés (**Tableau 6**). La dernière épidémie (Mai-Juin 2011) de large envergure a été décrite en Europe (Allemagne et France) suite à l'ingestion de graines germées de fenugrec contaminées par *E. coli* O104:H4. Le bilan était lourd : 4300 cas, 850 SHU et 82 morts (Frank et al., 2011).

Les premières épidémies à EHEC en France ont été recensées en 2005, l'une due à la consommation de viande de bœuf, l'autre, à la consommation de camembert au lait cru (Espié et al., 2006b). D'après l'InVS, 1378 cas de SHU ont été recensés en France entre 1996 et

2010 avec une incidence moyenne annuelle de 0,8/100 000 pour les enfants de moins de 15 ans (King et al., 2012). Il semblerait par ailleurs que la localisation géographique soit un facteur à prendre en compte puisque l'incidence annuelle moyenne est la plus élevée en Franche-Comté (1,6/100 000) et en Bretagne (1,4/100 000) (InVS, 2011). Les patients présentaient un âge médian de 30 mois avec 60% des cas de moins de 3 ans avec 43% des cas durant la période estivale (de juillet à septembre). La diarrhée prodromique a été rapportée pour 96% des cas, dont 59% présentaient du sang dans les selles. Douze enfants (0,9%) sont décédés des complications de leur SHU au cours de cette période. Une infection à STEC a été confirmée par sérologie ou par coproculture dans 63% des patients analysés. Parmi eux, O157 était le sérotype le plus incriminé (77%), suivi par O26 (7%) et O103 (3%) (ANSES, 2015). En 2013 (dernières données disponibles), 152 cas de SHU ont été notifiés en France. Les patients de moins de 3 ans représentaient 59% des cas (King et al., 2013). En 2014, l'incidence annuelle du SHU était de 1,2/100 000 enfants de moins de 15 ans (ANSES, 2015).

Les données de surveillance de SHU en France chez les enfants de moins de 15 ans sont similaires à celles d'autres pays et à celles décrites dans la littérature. Elles révèlent que les cas sont majoritairement sporadiques, rarement sous forme d'épidémies, prédominants en période estivale et chez les enfants de moins de 3 ans et majoritairement attribués au sérotype O157 (ANSES, 2015).

Tableau 6 : Résumé des principales épidémies à EHEC dans le monde entre 1998-2014

Année	Pays	Sérogroupe de STEC	Nb de malades (SHU et décès)	Aliments suspectés ou confirmés	Référence
1982	USA	O157:H7	46	Viande hachée de bœuf	(Riley et al., 1983)
1984	USA	O157:H7	34 (4 décès)	Hamburger	(Ryan et al., 1986)
1991	Canada	O157:H7	152 (22 SHU et 2 décès)	Viande de caribou et bœuf haché	(Orr et al., 1994)
1992-93	USA	O157:H7	501 (45 SHU et 3 décès)	Hamburger	(Bell et al., 1994)
1994	USA	O157:H7	23 (2 SHU)	Salami sec	(Tilden et al., 1996)
1994	Angleterre	O157:H7	70 (9 SHU et 1 PTT)	Lait pasteurisé	(Upton and Coia, 1994)
1995	USA	O157:H7	>70 (1 SHU)	Laitue	(Ackers et al., 1998)
1995	Australie	O111:H-	23 SHU (1 décès)	Saucisse sèche fermentée	(Paton et al., 1996)
1995	Angleterre	O157	14 (2 SHU)	Plats préparés à base de viande crue (bœuf et porc)	(Stevenson and Hanson, 1996)
1996	Japon	O157:H7	9451 (12 décès)	Radis blanc	(Michino et al., 1999)
1996	Canada	O157:H7	70 (14 SHU et 1 décès)	Jus de pomme non pasteurisé	(Cody et al., 1999)
1996	USA	O157:H7	14 (3 SHU)	Jus de pomme frais non pasteurisé	(Hilborn et al., 2000)
1996	Ecosse	O157:H7	512 (34 SHU et 17 décès)	Viande de bœuf	(Cowden et al., 2001)
1997	Ecosse	O157:H-	37	Gâteau à la crème	(O'Brien et al., 2001)
1997	USA	O157:H7	108 (4 SHU)	Germe de luzerne	(Breuer et al., 2001)
1998	USA	O157:H7	55	Fromage frais caillé	(CDC, 2001)
2000	Canada	O157:H7	2300 (7 décès)	Eau de boisson	(Hrudey et al., 2003)
2000	Angleterre	O157	6 (1 SHU)	Lait non pasteurisé	(Baylis, 2009)
2001	Canada	O157:H7	5 (2 SHU)	Lait de chèvre non pasteurisé	(McIntyre et al., 2002)
2002	France	O148:H8	11 (2 SHU)	Viande de mouton	(Espíe et al., 2006a)
2005	France	O157:H7	70 (17 SHU)	Viande de bœuf	(King et al., 2009)
2005	France	O26	6 SHU	Camembert	(Espíe et al., 2008)
2005	France	O157	2 (1 SHU)	Fromage au lait cru de chèvre	(Espíe et al., 2006b)
2005	Suède	O157:H7	120 (7 SHU)	Laitue	(Söderström et al., 2005)
2006	Norvège	O103:H25	17 (10 SHU et 1 décès)	Saucisse fermentée	(Sekse et al., 2009)
2006	USA	O157:H7	199 (31 SHU et 3 décès)	Epinards	(CDC, 2006)
2009	France	O123:H-	2 (1 SHU)	Hamburger	(L. A. King et al., 2010)
2010	USA	O145	19	Laitue	(CDC, 2010)
2011	Allemagne	O104:H4	3816 (845 SHU et 54 décès)	Graines germées de Fenugrec	(Beutin and Martin, 2012)
2011	France	O104:H4	15 (9 SHU)	Graines germées de Fenugrec	(Grad et al., 2012)
2011	France	O157:H7	19 SHU	Viande hachée de bœuf	(InVS, 2011)
2011	Japon	O111:H8	181 (34 SHU, 5 décès)	Viande de bœuf	(Watahiki et al., 2014)
2012	France	O157:H7	4 SHU	Viande hachée de bœuf	(InVS, 2012)
2013	Suède	O157:H7	28 (1 SHU)	Salade	(Edelstein et al., 2014)
2014	USA	O157:H7	4 (1 décès)	Viande de bœuf	(CDC, 2016)

Le **Tableau 6** montre que de nombreuses épidémies sont liées à la consommation de viande et de végétaux. Les cas épidémiques associés à la consommation de produits laitiers non pasteurisés sont moins fréquents que pour les autres matrices à risque. Le **Tableau 7** recense les épidémies liées à la consommation de produits laitiers à travers le monde.: 51 épidémies entre 1986 à 2010 (Farrokh et al., 2013). Alors que la consommation de fromages au lait cru est d'environ 2,8 kg/an/hab. en France (CNIEL, 2014), il est surprenant de constater que seulement 4 épidémies soient liées à ces matrices (1992, 1994, 2004 et 2005 ; **Tableau 7**; Farrokh et al., 2013).

Une épidémie à EHEC de grande envergure impliquant des fromages au lait cru d'origine Roumaine a touché, début 2016, l'Italie et la Roumanie. Sur les 25 cas d'enfants âgés de 6 à 36 mois contaminés, 19 ont développé un SHU et 3 sont décédés. Douze cas présentaient des évidences microbiologiques et/ou sérologiques d'une contamination à O26, 13 étaient positifs pour O157 et *stx1* et ou *stx2* et *eae* (EFSA, 2016).

Tableau 7 : Epidémies à STEC liées à la consommation de produits laitiers à travers le monde, entre 1986 et 2010 (d'après Farrokh et al., 2013). Les références sont décrites dans l'ANNEXE 7.

Year	Dairy product	Serotype, virulence factors	Number of cases	Country	References
1986	Raw milk	O157:H7	2 HUS	USA	1
1989	Raw milk	O22:H8	1 HUS	Germany	2
1990	Raw milk	O157:H7	2 HUS	USA (Washington)	3
1991	Farm yoghurt (pasteurised milk)	O157:H7	16–5 HUS	UK (England and Wales)	4
1992–1993	Farm fresh goat's and cow's milk cheese (raw milk)	O119:B14; VT2	4 HUS	France (Cher)	5, 6
1992–1993	Raw milk	O157:H7	14–0 HUS	USA (Oregon)	7
1993	Milk	O157	7–3 HUS	UK (England and Wales)	8, 9
1994	Pasteurised milk	O157:H7; Vt2 + PT2	> 100–9 HUS	UK (Scotland)	10
1994	Farm raw milk cheese	O157; VT2; PT28	22–1 HUS	UK (Scotland)	11, 12
1994	Milk	O157; VT2	8–3 HUS	UK (Scotland)	11
1994	Farm fresh goat's milk cheese (raw milk)	O103	4 HUS	France (Ardèche)	13
1994	Milk (post pasteurisation contamination suspected)	O104:H21	11 confirmed; 7 suspected	USA (Montana)	14
1995	Farm raw goat's milk	O157:H7	4 HUS	Czech Republic	15
1996	Raw milk cheese	O110:H–	3–0 HUS	Germany	16
1996	Milk	O157	12–1 HUS	UK	17
1997	Unpasteurised milk	O157	6	Finland	18
1997	Unpasteurised milk	O157	3 HUS	Finland	18
1997	Unpasteurised milk	O157	2 HUS	Finland	18
1997	Cheese	O157	5 (2 confirmed)	UK	19
1998	Unpasteurised milk	O157	17	Finland	18
1998	Unpasteurised farm cheese	O157	4	UK (Scotland)	20
1998	Raw milk cheese	O157; PT2; VT2	10–1 HUS	UK (Dorset)	21
1998	Unpasteurised cream	O157:H7	7	UK (England)	22
1998	Fresh cheese curds	O157:H7	55–2 HUS	USA (Wisconsin)	23
1999	Farm milk	O157	38–3 HUS	UK (North Cumbria)	24
1999	Homemade goat's milk cheese (raw milk)	O157; PT 21; PT 28	27–1 HUS	UK (Scotland)	25
1999	Raw milk	O157	3	UK (Scotland)	20
2000	Raw milk	O157	2	UK (Scotland)	20
2001	Raw goat's milk	O157:H–; sorbitol + Stx2+; Stx2c +	2–1 HUS	Austria	26
2001	Goat's milk	O157:H7	5–2 HUS	Canada (British Columbia)	27

2002–2003	Raw milk gouda	O157:H7	13–2 HUS	Canada (Alberta)	28
2003	Raw cow's milk	O26:H–; stx2+; eae + hly +	2 HUS	Austria	29
2003	Raw cow's milk	O157; stx2+; eae + ehxA +	9–4 HUS (family outbreak)	Slovakia	30
2003–2004	Organic milk	O157:H–	25–0 HUS	Danemark	31
2004	Raw milk cheese	O157:H7	3	Canada (Quebec)	32
2004–2006	Farm fresh goat's cheese (raw milk)	O157; stx2+; eae +	2 HUS	France	33, 34
2005	Milk	O157:H7	6	Canada (Ontario)	28
2005	Milk shake	O157:H7	16–1 HUS	Canada (Alberta)	35
2005	Raw milk	O157:H7	18–4 HUS	USA (Washington–Oregon)	36
2005	Raw milk cheese (brie)	O26; O80; stx2 +; eae +	6 HUS	France (Normandie)	37
2006	Raw milk	O80:H–; stx1+; eae + hly+; O145; stx1+; stx2 + eae +	59–1 HUS	Germany	38
2006	Raw cow's milk	O157:H7	2 HUS	USA (California)	39
2006	Organic raw milk and cow's colostrum	O157:H7; other STEC serotypes	6–2 HUS	USA (California)	40
2007	Farm ice cream	O145:H28; stx2+; eae + ehxA + O26:H11; stx1+; eae + ehxA +	12–5 HUS	Belgium	41, 42
2007	Pasteurised cheese	O121; O26; O84	135–10 HUS	USA (Colorado)	43
2008	Raw goat's milk	O157:H7	4–1 HUS	USA (Missouri)	44
2009	Raw milk	O157:H7; O121	3	USA (Washington)	45
2010	Raw milk	O157:H7	8–1 HUS	USA (Minnesota)	46
2010	Raw goat's milk	O157:H7	30–2 HUS	USA (Colorado)	47
2010	Gouda cheese	O157:H7	38–1 HUS	USA (5 states)	48
2010	Raw milk cheese	O157:H7	8	USA (4 states)	49
2016	Raw milk cheese	O26:H11	25-19 HUS-3 death	Europe (Romania, Italia))	50

Shiga-toxin (= verocytotoxin)

stx Shiga-toxin gene

HUS Haemolytic Uremic Syndrome

1— CDSC Communicable Disease Surveillance— USA

2— CDC Centers for Disease Control and Prevention— USA

3— MAPAQ Ministère de l'Agriculture, des pêcheries et de l'Alimentation du Québec

PT Phage Type

4— INVS Institut de Veille Sanitaire — France

5— RKI Robert Koch Institut.

Points clés n°2 :

- En France, seules les épidémies à EHEC chez les enfants de moins de 15 ans sont recensées.
- Les enfants de moins de trois ans et les personnes âgées constituent la population la plus sensible aux pathologies à EHEC.
- Les ruminants laitiers sont des porteurs asymptomatiques de STEC potentiellement pathogènes.
- La contamination du lait par des STEC est majoritairement liée à une mauvaise hygiène lors de la traite (par contact avec des matières fécales d'animaux excréteurs).
- La prévalence en STEC dans les produits laitiers est comprise entre 0 et 2%.
- Malgré une forte prévalence dans les produits laitiers, les épidémies à EHEC liées à leur consommation restent rares.

3. Facteurs influençant le comportement des STEC dans les produits

laitiers

Il existe une très grande variété de fromages selon la nature du lait et les différentes technologies mises en œuvre pour les fabriquer (Mahaut et al., 2000). Les technologies de fabrication fromagère mettent en jeu des variations tant biotiques, de par les diversités qualitatives et quantitatives des communautés microbiennes, qu'abiotiques liées à la composition de la matière première et aux paramètres technologiques de fabrication (conditions d'emprésurage, température, humidité, ajout de sel...). Ces variations biotiques et abiotiques influent sur le comportement des STEC en cours de fabrication et d'affinage des fromages.

3.1. Croissance des STEC en fromages

3.1.1. Comportement des STEC en fromages

Les comportements des STEC varient selon les technologies fromagères. Le début de la fabrication, par les variations de température et la vitesse d'acidification mais également la durée d'affinage (fin de fabrication) sont des facteurs importants influant leur comportement.

La coagulation du lait concentre les micro-organismes (Govaris et al., 2002; Maher et al., 2001; Mischczycha et al., 2013; Reitsma and Henning, 1996). Le début de la fabrication fromagère présente des conditions optimales pour la croissance des STEC (pH ~6,8, 30°C, $A_w \sim 0,99$). Au cours de l'affinage et de la conservation du fromage, la diminution de la

température, la diminution de l' A_w , la carence en nutriments et l'absence d'oxygène sont des stress pouvant entraîner une diminution du taux de STEC.

Dans les fromages frais, les STEC O157:H7 sont totalement inactivés par chauffage du caillé (55-60°C) (Arocha et al., 1992; Hudson et al., 1997). De même un chauffage de caillé à 80°C durant 5 minutes au cours de la fabrication de mozzarella l'élimine complètement (Spano et al., 2003). Dans du gouda et du cheddar, les souches de STEC O157:H7 diminuent lentement au cours de l'affinage et restent détectables après enrichissement même après 270 jours (D'Amico et al., 2010). Dans les fromages de type Féta et Camembert une souche de STEC O157:H7 survit aux procédés de fabrication et d'affinage (Montet, 2009). Son niveau dans le camembert était supérieur de 1,5 Log par rapport au niveau initial après 65 jours et de 1 Log dans la Feta après 75 jours.

Mizczycha et al, 2013 ont comparé la croissance de différents sérotypes de STEC (O157:H7, O26:H11, O103:H2, O145:H28 et O111:H8) dans des fromages à pâte cuite, des fromages lactiques, fromages à pâte pressée non cuite et fromages à pâtes persillées. Inoculées à 2 Log UFC/ml, les souches de sérotypes O157:H7 et O26:H11 ne se développent pas dans les fromages à pâte cuite et ne sont détectables qu'après enrichissement. Par contre, elles croissent rapidement (augmentation de 2 à 4 Log) pendant les 24 premières heures dans les fromages à pâte pressée non cuite. Leur niveau reste stable durant les 60 jours d'affinage puis décroît. A 28 jours d'affinage, seul le sérotype O26:H11 est encore détecté à 3 Log UFC/g. Dans les pâtes persillées, la population des différents sérotypes augmente aussi de 1 Log (sérotype O157:H7) à 3 Log (O26:H11). Le sérotype O157:H7 n'est plus détectable après 7 jours alors que le sérotype O26:H11 est encore détectable après enrichissement après 240 jours. Cette meilleure croissance du sérotype O26:H11 est aussi observée en fromages lactiques. Le taux de O157:H7 n'est plus détectable après 36 et 44 jours d'affinage dans du Télémé et de la féta, respectivement (Govaris et al., 2002), alors que la souche présentait une

croissance dans les 24 premières heures de fabrication. En revanche, le taux de STEC O157:H7 reste détectable après une période de stockage de 75 jours à 2°C de fromage frais type fêta (Ramsaran et al., 1998). Des bactéries viables de STEC ont également pu être isolées après enrichissement jusqu'à 90 jours après le début de la fabrication de fromages à croûte lavée (Maher et al., 2001). Des STEC O157:H7 sont isolables en fin d'affinage de camembert (Montet, 2009). Les niveaux de STEC O157:H7 diminuent progressivement durant les premières heures de fabrication d'un fromage de chèvre type caillé lactique jusqu'à un taux inférieur à 1 Log₁₀ malgré des niveaux d'inoculation des laits de 10, 10² ou 10³ UFC/mL. Après 42 jours, les STEC n'étaient détectables qu'après enrichissement (Vernozy-Rozand et al., 2005).

Ces différentes données indiquent que les technologies de fabrication, les conditions et la durée d'affinage des fromages peuvent être un moyen de maîtrise de ces bactéries.

3.1.2. La compétition métabolique

Les STEC sont, comme tous les *E. coli*, adaptés à la survie dans divers environnements (température stable, pH variable, anaérobiose, compétition microbienne de cet environnement). Pour pouvoir s'implanter dans des environnements riches en espèces microbiennes, les STEC doivent présenter des avantages écologiques majeurs pour accéder aux nutriments de manière efficace. Fabich et al., (2008) mettent ainsi en évidence que la majorité des sucres sont utilisés de manière équivalente par *E. coli* O157:H7 EDL933 et *E. coli* K12 MG1655. Cependant, EDL933 métabolise le galactose, le mannose et le ribose alors que MG1655 non. Inversement, MG1655 métabolise l'acide N-acétyl Neuraminique et le glutamate tandis que EDL933 non. Les STEC semblent donc utiliser des sucres disponibles

dans l'environnement qui ne sont pas utilisés par la souche d'*E. coli* commensal K12, leur conférant ainsi un avantage écologique majeur (Fabich et al., 2008).

Escherichia coli ne possède pas de glucosidases pour dégrader des chaînes osidiques composées de plus de deux saccharides (Boos and Mayer, 2013). Par exemple, les EHEC possèdent un système à deux composants, appelé FusKR, activé en présence de fucose et réprimant l'expression de gènes de virulence. La libération de fucose résultant de la dégradation des sucres associés aux mucines par d'autres micro-organismes active la cascade de signalisation FusKR, modulant l'expression des gènes de virulence des EHEC (Pacheco et al., 2012). Ceci suggère que les EHEC sont dépendantes des métabolites microbiens des autres populations microbiennes de l'écosystème.

Bertin et al., (2013) ont étudié la compétition d'*E. coli* EDL933 pour les glycoconjugués associés aux mucines intestinales bovines, source d'énergie principale pour le microbiote intestinal bovin. Ils ont mis en évidence que les EHEC utilisent plus rapidement les monosaccharides dérivés des glycocalyx associés aux mucus (galactose, N-acétyl-glucosamine (GlcNAc), N-acétyl-galactosamine (GalNAc), fucose, mannose et acide N-acétyl neuraminique (Neu5Ac)) que les souches bactériennes endogènes présentes dans le contenu du petit intestin bovin. Ils ont démontré que l'utilisation rapide du mannose, du GlcNAc, du Neu5Ac et du galactose favorise une croissance rapide des EHEC, leur conférant ainsi un avantage écologique sur les souches bactériennes autochtones.

Ainsi, plusieurs stratégies de compétition métabolique pourraient être mises en place par les STEC pour s'implanter et se maintenir dans un écosystème. Ceux-ci utiliseraient des sucres qui ne le sont pas par les *E. coli* commensaux, des métabolites secondaires produits par d'autres espèces microbiennes de l'écosystème et/ou des nutriments disponibles avec plus d'efficacité que les espèces autochtones.

3.2. Facteurs biotiques

Les communautés microbiennes - populations naturellement présentes ou ferments microbiens exogènes - constituent la partie biotique de l'écosystème fromage. Elles peuvent impacter la physiologie, la survie et la croissance des STEC dans ces matrices (Duffy et al., 1999). L'utilisation de lait cru ou de lait pasteurisé pour la fabrication de fêta ou de camembert n'influence pas le comportement d'*E. coli* O157:H7 (Ramsaran et al., 1998). De même, Masoud et al., (2012) ont observé que la présence ou l'absence de ferment (*L. lactis*) lors de la fabrication de fromage danois n'influeait pas la croissance de *E. coli*. Delbès-Paus et al., (2013) ont également observé que la présence d'un ferment lactique thermophile n'impactait pas la croissance d'*E. coli* O26:H11 dans une technologie de fabrication type pâte pressée non cuite au lait pasteurisé.

Cependant, les communautés microbiennes retrouvées dans le lait cru sont variables en fonction de la saison, du type d'alimentation des animaux et des pratiques de traite. Elles sont riches et diverses dans les fromages au lait cru et peuvent être source de souches bio protectrices (Montel et al., 2014). Par exemple, le taux d'*E. coli* O157:H7 décroît dans la croûte de fromages à croûte fleurie lors de l'affinage concomitamment à la multiplication des flores microbiennes de croûte (Maher et al., 2001). Peu de souches antagonistes de STEC ont été décrites dans la littérature. *Hafnia alvei*, utilisé comme ferment d'affinage dans certains fromages, augmente la phase de latence des STEC O157:H7 en bouillon cœur cervelle à 37°C. Elle réduit son taux de croissance et sa densité maximale (Duffy et al., 1999). Elle serait également antagoniste d'*E. coli* O26:H11 dans des fromages à pâte pressée non cuite (Delbès-Paus et al., 2013). Cet antagonisme a été confirmé pour O26:H11 mais également pour d'autres sérotypes. *H. alvei* pourrait agir en synergie avec des souches de

Lactobacillus plantarum et de *Lactococcus lactis* permettant d'atteindre des niveaux de STEC en dessous du seuil de détection après 28 jours d'affinage (Callon et al., 2016b). Des souches de : *Lc. lactis*, *Lc. garvieae*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Ln. citreum*, *Lactobacillus spp*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* et *Carnobacterium mobile* inhibent également des souches d'*E. coli* O26:H11 et *E. coli* O157:H7 en fromages à pâte pressée non cuite (Callon et al., 2016a). Leur efficacité varie selon les sérotypes et les technologies fromagères.

3.2.1. Nature de l'antagonisme

La nature de l'antagonisme de ces communautés microbiennes vis-à-vis des STEC est peu documentée. Néanmoins, celles décrites pour d'autres pathogènes peuvent être évoquées. La production d'acides organiques (acide acétique, acide lactique), de peroxyde d'hydrogène ou de bactériocines (peptides antimicrobiens) sont souvent impliqués dans ces antagonismes (De Vuyst and Vandamme, 1992). Cependant l'inhibition des STEC par *H. alvei* ne serait due ni au pH, ni aux acides lactiques et acétiques, ni à la production de peroxyde d'hydrogène (Callon et al., 2016b). De plus, bien que *H. alvei* possède des gènes codant pour les bactériocines alveicine A et B (Wertz and Riley, 2004), celles-ci ne seraient pas impliquées dans la décroissance du taux de STEC dans ces matrices (Callon et al., 2016b). Cet antagonisme résulterait d'autres mécanismes.

3.2.1.1. Acides organiques

L'acido-résistance des STEC définit la résistance de la souche à des pH faibles. Cependant, l'acido-résistance de ces souches est dépendante du type d'acide utilisé

(Buchanan and Edelson, 1999). Dans les fromages, les acides organiques faibles sont principalement issus de la fermentation des sucres du lait par les bactéries. L'acide lactique (forme L ou D) est issu de la fermentation du lactose, essentiellement par les bactéries lactiques. L'acide lactique n'a pas d'effet inhibiteur important sur *E. coli* O157:H7 dans le lait (Farrag et al., 1992). Les acides organiques affectent principalement la croissance des bactéries sous leur forme non-dissociée. Ils pénètrent la membrane plasmique, acidifiant ainsi le cytoplasme et le milieu intracellulaire de l'organisme. Ceci induit une perturbation des voies métaboliques, et donc une inhibition de croissance (Roe et al., 1998). Cette accumulation de formes protonées peut également être à l'origine de stress osmotique pour la bactérie. Un taux de 50 mM de lactate, à pH 3, semble avoir un impact sur la survie d'*E. coli* O157:H7 (Jordan et al., 1999). Cependant, un tel pH ne peut être atteint au cours du processus fromager.

Les capacités de résistance à l'acidité des STEC ont principalement été étudiées *in vitro* par rapport à des acides forts comme l'acide chlorhydrique. Dans des fromages à pâtes molles où la diminution de pH est due à des acides organiques, les STEC acido-résistants ou acido-sensibles survivent de façon similaire, bien que le pH atteigne 4,6 (Montet, 2009).

3.2.1.2. Effet des composés oxygénés réactifs

Les composés oxygénés réactifs (ROS pour « *Reactive oxygen species* ») sont responsables du stress oxydatif. Ils peuvent être synthétisés dans les fromages par la xanthine oxydoréductase/déshydrogénase (XOR/DH) présente au niveau des membranes des globules gras du lait (Harrison, 2006). Cette enzyme a montré *in vitro*, sa capacité à générer des

réactifs oxygénés (O₂-), des ions hyperoxydes (NO) et du peroxyde d'hydrogène en quantité suffisante pour la destruction de *Staphylococcus aureus* et *E. coli* (Martin et al., 2004).

De plus certaines espèces bactériennes (eg *Lc. garvieae*) ont la capacité de produire du peroxyde d'hydrogène (Delpech et al., 2015). Le peroxyde d'hydrogène à 0,7 mM a un effet bactériostatique sur les cellules d'*E. coli* et un effet bactéricide à des concentrations supérieures à 2,9 mM (Labas et al., 2008). Son efficacité bactéricide dépend du pH du milieu et de la température (Christieans et al, 2013).

3.2.1.3. Les bactériocines

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés par certaines espèces microbiennes. Parmi celles-ci, la nisine, bactériocine produite par *Lc. lactis*, en présence de lactoferrine (protéine du lait) aurait un effet létal *in vitro* sur *E. coli* O157:H7 (Murdock et al. 2007). La reuterine synthétisée par *Lactobacillus reuteri* diminuerait la survie des STEC dans les fromages frais (el-Ziney and Debevere, 1998). De même, les colicines E1 et N d'*E. coli* réduisent également la croissance d'*E. coli* O157:H7 à des degrés variables selon les souches (Callaway et al., 2004)

3.3.Facteurs abiotiques

Tout au long du *process* de fabrication et d'affinage des fromages le comportement des STEC est soumis à l'influence de facteurs abiotiques (non liés aux êtres vivants) tels que l'activité de l'eau (aw), la température, l'humidité et la composition de la matière première.

3.3.1. Température

Au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages, les températures ne sont pas constantes. L'élévation de température peut affecter l'intégrité cellulaire (Peng et al., 2011). En effet, le traitement de lait cru à ~64°C pendant 17,5 seconde réduit significativement de 5 Log UFC/mL de *E. coli* O157:H7 (Schlessner et al., 2006). Le chauffage du lait à 56°C pendant une heure et demie inactive *E. coli* (Hudson et al., 1997). De même, la pasteurisation (72°C, 16 seconde) du lait élimine complètement *E. coli* O157:H7 (D'Aoust et al., 1988).

Certaines technologies de fabrication fromagère impliquent des traitements thermiques en début de fabrication. En effet, les technologies de fabrication de fromages types pâte pressée cuite nécessitent un chauffage du caillé compris entre une demi-heure et une heure à 55°C. Un chauffage du caillé à une température supérieure 53°C induit une rapide décroissance des STEC dans les premières heures de fabrication fromagère (Peng et al., 2011). Dans le cadre de fabrication de mozzarella (fromage type pâte filée), un chauffage du caillé à 80°C pendant 5 min détruit complètement les formes cultivables de STEC O157:H7 (Spano et al., 2003).

Cependant, dans le cas des technologies de fabrication type pâte pressée non cuite les températures n'excèdent pas les 33°C. Celles-ci sont essentielles pour le développement du microbiote laitier et des ferments lactiques indispensables à la fabrication. Néanmoins, ces températures d'emprésurage favorisent également la multiplication des STEC, augmentant ainsi leur taux de survie dans les fromages (Reitsma and Henning, 1996).

3.3.2. pH

La production d'acide organique par les bactéries lactiques au cours de la fabrication de fromage induit des variations de pH dans la pâte des fromages. Le pH du lait (environ 6,8) diminue progressivement au cours du *process* de fabrication jusqu'à des valeurs pouvant atteindre 4,5 pour certains fromages lactiques.

Même si le pH optimal de croissance des *E. coli* O157:H7 se situe autour de 7, ils sont capables de croître à des pH compris entre 4,5 et 9 (Dineen et al., 1998; Glass et al., 1992). Par ailleurs, certaines souches très acido-résistantes résistent à des pH voisins de 3 (Jordan et al., 1999). La réponse induite lors de stress acide lié à l'acide lactique et l'HCl semble néanmoins similaire en phase stationnaire (King et al., 2010).

3.3.3. Le salage et l'activité de l'eau (aw)

Les fromages sont majoritairement salés en surface et parfois dans la masse (technologie AOP Cantal) à des concentrations variant en fonction des technologies de fabrication. L'activité de l'eau diminue en même temps que l'élimination progressive de l'eau au cours des étapes d'égouttage/pressage puis de manière plus importante au cours de l'affinage (Mahaut et al., 2000). Ce phénomène limite ainsi le développement des coliformes, notamment lors de cette dernière étape. L'*aw* diminue progressivement au cours de l'affinage atteignant, pour des technologies de fabrication type pâte pressée cuite, des valeurs inférieures à 0,9. Dans le cas des fromages type pâte pressée non cuite, elle peut être comprise entre 0,92 et 0,98 en fonction de la durée d'affinage. La croissance des STEC nécessite un minimum d'*aw* de 0,945 à 0,95 (Lindblad and Lindqvist, 2010).

Points clés n°3 :

- Les technologies de fabrication de fromage sont multiples et impliquent différentes conditions physico-chimiques nécessaires au processus de fabrication.
- Les points critiques de la multiplication des STEC en fromage sont les 24 premières heures de fabrication
- Les conditions abiotiques liées aux technologies de fabrication (température, pH, aw) impactent la croissance et la survie des STEC dans ces matrices.
- Les STEC possèdent des avantages métaboliques pour survivre dans l'environnement fromager.
- Le lait cru contient des microorganismes capables de limiter la croissance des STEC dans les produits laitiers.
- L'antagonisme potentiel des souches bio protectrices contre les STEC repose majoritairement sur la synthèse d'acides organiques, de composés réactifs oxygénés et/ou de bactériocines.

4. La pathogénicité et facteurs de virulence des STEC

4.1. Virulence et pathogénicité : retour aux bases

Depuis les années 1990, les définitions de virulence et de pathogénicité sont conflictuelles au sein des pathologistes (Shaner et al., 1992). Les définitions de ces deux termes et des notions qu'ils regroupent (sévérité, agressivité, *fitness*) sont différentes en fonction des domaines d'application (phytopathologie, pathologie humaine, entomopathologie, ...) (Casadevall and Pirofski, 2001; Sacristán and García-Arenal, 2008; Shaner et al., 1992; Thomas and Elkinton, 2004; Wassenaar and Gaastra, 2001). Une définition consensuelle est donc difficile. La notion d'hôte semble néanmoins centrale pour tous ces domaines, et plus particulièrement concernant la microbiologie. En effet, la notion de pathogène opportuniste implique qu'un microorganisme communément non pathogène, voire commensale, puisse être impliqué dans le déclenchement de maladie chez des hôtes présentant des déficiences immunitaires. L'apparition de pathologies liées à ce type de microorganisme montre que l'hôte joue un rôle prépondérant dans la notion de pathogénicité (Pirofski and Casadevall, 2015). Les notions de virulence et de pathogénicité ne peuvent donc être établies que pour un couple hôte-pathogène bien défini (Wassenaar and Gaastra, 2001). Ainsi, la distinction entre souches bactériennes pathogènes pour l'homme et souches non-pathogènes est difficile en raison des problèmes éthiques qu'implique l'étude de la pathogénie de bactéries responsables de maladies humaines. De plus, l'absence de modèles pour évaluer dans leur ensemble le pouvoir pathogène des bactéries pour l'homme est un frein supplémentaire dans ce domaine.

Les avancées en biologie moléculaire du début des années 2000 (e.g. séquençage génomique) enrichissent les bases de données internationales en gènes de potentielle virulence bactérienne. Ces facteurs de virulence ont été définis comme des gènes impliqués dans le déclenchement des pathologies, et contribuent à la sévérité de la maladie. Une classification des gènes impliqués dans la pathogénicité des bactéries a été proposée (Wassenaar and Gastra, 2001), les divisant en trois sous-catégories majeures (**Tableau 8**) :

- Les gènes de virulence : les gènes codant pour des facteurs ou des enzymes produisant des facteurs impliqués dans les interactions avec l'hôte, qui sont directement responsables des lésions pathologiques pendant l'infection et que l'on ne retrouve pas dans les souches non pathogènes.
- Les gènes associés à la virulence : les gènes codant pour des facteurs ou des enzymes produisant des facteurs régulant l'expression de gènes de virulence ou qui activant des facteurs de virulence lors de modifications post traductionnelles, ou qui sont requis pour l'activité des facteurs de virulence.
- Les gènes impliqués dans le maintien du pathogène : les gènes codant pour des facteurs ou des enzymes produisant des facteurs favorisant la colonisation de l'hôte, des gènes favorisant l'évasion du pathogène du système immunitaire, ou favorisant la survie du pathogène en milieu intracellulaire, ou détournant les facteurs de l'hôte pour accroître la survie du pathogène.

Tableau 8 : Définition des sous classes de facteurs de virulence (Wassenaar and Gastra, 2001)

First digit : life-style of organism	Second digit: gene class	Definition	Examples of this class	Evidence, comments	Third and further digits: subclasses
PA: virulence genes from bacteria that are exclusively pathogenic	1. True virulence genes	Their gene products are directly involved in interactions with the host and are directly responsible for the pathological damage. These genes are exclusively expressed in pathogens.	Cholera toxin, anthrax toxin, botulin toxin, shiga toxin, Bordetella adenylate cyclase toxin, etc.	The pathological damage is induced by purified gene products and the gene is the structural gene for these products.	Subclasses according to gene families, for instance, .1 : RTX toxins, .2 : enterotoxins, etc.
HS: virulence genes from bacteria displaying hostdependent pathogenicity	2. Colonization genes	Their gene products enable colonization of a host and determine the localization of the infection.	Adhesins, fimbriae, intimin, invasins.	Inactivation will result in decrease in colonization potential. The factors make contact at the site of colonization.	.1: adhesins, .2 : intimins, .3: invasins, .4: accessory genes of fimbrial subunit
	3. Defense system evasion genes	Their gene products are involved in evasion of the host immune system.	Immunoglobulin-specific proteases, cytotoxins directed against immune cells, surface layers, slime polysaccharide.	The role of these genes must be established for each pathogen.	Subclasses according to the specific function
OP: virulence genes from opportunistic pathogens	4. Processing virulence genes	Their gene products are involved in the biosynthesis of virulence life-style factors by enzymatic processing.	Specific proteases, methylases, chaperonins, glycosyltransferases, with virulence life-style genes as a substrate.	The enzymatic activity of the gene product must be proven. This activity must not be solely directed towards virulence life-style factors.	Subclasses according to the type of processing, e.g. .1: chaperonins, .2: methylases, .3 :
	5. Secretory virulence genes	Their gene products are responsible for secretion of virulence life-style factors.	Type III secretion machinery, type I secretion machinery.	The role of the gene products in secretion of virulence life-style factors must be proven. Their activity may not be solely directed towards these factors.	Subclasses: .1 : type I secretion machinery genes, .3 : type III secretion machinery genes
	6. Virulence housekeeping genes	Their gene products provide nutrients during colonization, improve competition with other microbes, or provide the proper microenvironment.	Urease, catalase, superoxide dismutase, siderophores, proteinase inhibitors. Flagella could also belong to this class although they are strictly speaking structural components of the organism.	Inactivation will result in decrease in colonization potential although a direct role in colonization or immune evasion is absent. These genes are likely to be present in non-pathogens as well.	Subclasses according to function
	7. Regulatory genes	Their gene products are involved in regulation of virulence life-style gene expression.	Alternative sigma factors, global regulators, specific transcription activators, regulators of phase variation by gene/promoter inversion.	The role of these genes in virulence must be established for each pathogen.	.1: two-component regulators, .2: global regulators, .3: alternative sigma factors, etc.

Lors de notre étude, nous avons défini la virulence et la pathogénicité des STEC comme deux notions distinctes intimement liées. Toutes deux se réfèrent à la capacité d'un organisme à déclencher une maladie chez l'homme mais ne se positionnent pas au même « niveau » de cette maladie. La pathogénicité apprécie le type de pathologie lié à l'agent infectieux (notion qualitative de l'infection) tandis que la virulence fait référence à l'intensité des symptômes (notion quantitative de l'infection) (Sacristán and García-Arenal, 2008).

4.2. Pathogénie des STEC

D'après les définitions établies pour ces notions de virulence et de pathogénicité, outre la synthèse de Shiga-toxines, de nombreux facteurs de pathogénicité, principalement portés par des éléments mobiles, ont été décrits chez les STEC. La liste des facteurs de virulence participant au pouvoir pathogène (pathogénicité) de l'agent infectieux n'est actuellement pas totalement définie et les mécanismes impliqués dans le pouvoir pathogène des EHEC ne sont pas encore élucidés. Bien que la production de Shiga-toxines (Stx) soit une condition « *sine qua none* » du déclenchement des symptômes de la pathologie, leur seule expression ne semble néanmoins pas être suffisante pour induire les symptômes liés à l'infection humaine (ANSES, 2011). En effet, ces bactéries doivent être en mesure de survivre à la barrière acide de l'estomac et de transiter jusqu'à leurs sites de colonisation, l'iléon terminal et le côlon. Pour éliminer les agents étrangers, l'hôte possède de nombreuses défenses (e.g. Système immunitaire inné et adaptatif) auxquelles les pathogènes doivent échapper, par mimétisme ou désorganisation de la réponse immunitaire, pour pouvoir survivre. Ces bactéries pathogènes doivent également être capables de coloniser les cellules entérocytaires et de se multiplier rapidement afin de ne pas être éliminées par l'intermédiaire du transit intestinal. Cette colonisation se fait par l'intermédiaire, entre autre, de l'expression du gène *eae* avec

formation de lésions typiques d'effacement des microvillosités (lésions A/E) ainsi que d'autres mécanismes impliqués dans la fonction d'adhésion des EHEC à la barrière intestinale. De plus, l'expression des facteurs de virulence des EHEC est influencée par de nombreuses conditions environnementales incluant, mais pas limitant, la température, le milieu de culture, le pH, les sels biliaires et les facteurs cellulaires de l'hôte (Barnett Foster, 2013).

4.2.1. Les facteurs d'adhésion

Une fois la barrière acide stomacale franchie, les STEC transitent dans l'environnement intestinal jusqu'à leurs sites de prédilection que sont l'iléon terminal et le côlon. Les pathogènes captent alors des signaux environnementaux tels que l'adrénaline, la noradrénaline ou encore une molécule du quorum sensing : l'auto-inducer de type III qui active la biosynthèse d'ECP (« *E. coli Common Pilus* ») et de HCP (« *Haemorrhagic Coli Pilus* ») à leur surface. Ces pilis leur permettent d'adhérer à la surface de la muqueuse intestinale et de se rapprocher de la surface cellulaire grâce à un mécanisme de « grappin » moléculaire. La captation de ces signaux environnementaux et la fixation de la bactérie à la muqueuse déclenchent l'activation de l'expression d'un des îlots de pathogénicité présents chez les EHEC : le locus d'effacement des entérocytes (LEE).

4.2.2. Le locus d'effacement des entérocytes

Ce LEE est un îlot de pathogénicité de 35,6 kb. Il est constitué de cinq opérons polycistroniques (*LEE1* à 5) codant pour 41 ORF et notamment pour une intimine, codé par le gène *eae* (« *E. coli attaching and effacing* ») et son récepteur Tir (« *translocated intimin*

receptor ») (*LEE5* ; **Figure 8**). En plus d'être présent dans le génome chromosomique des STEC potentiellement pathogènes, ce LEE est retrouvé chez plusieurs bactéries entéropathogènes tels que les EPEC, *Citrobacter rodentium* ou *Escherichia albertii* (Franzin and Sircili, 2015).

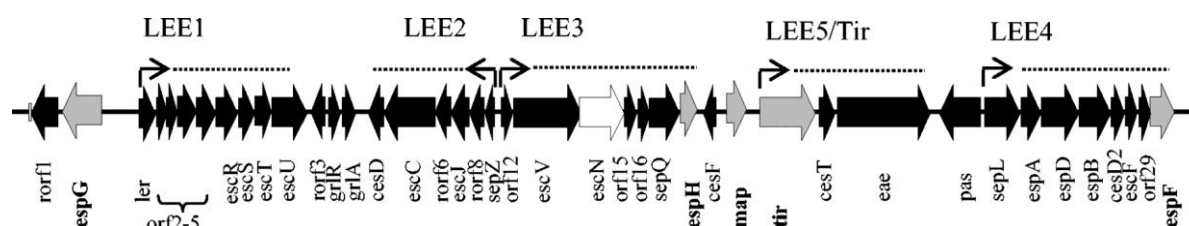


Figure 8: Organisation génétique du locus d'effacement des entérocytes (Ritchie and Waldor, 2005).

Les gènes *sep* (« *secretion of E. coli protein* »), *esc* (« *E. coli secretion* ») (Jarvis and Kaper, 1996) et *esp* (« *EPEC-secreted protein* ») retrouvés dans les *LEE1*, *LEE2* et *LEE3* codent pour un système de sécrétion de type III (SSTT). Le *LEE1* contient le gène « *LEE encoded regulator* » (*ler*) codant pour une protéine se fixant à l'ADN et qui est le régulateur principal de l'expression des autres LEE. Le SSTT est impliqué dans la translocation d'effecteurs, majoritairement codés par les gènes du *LEE4*, dans la cellule hôte (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Protéines sécrétées par le système de sécrétion de type III par les *E. coli* O157:H7 et leurs activités (d'après Stevens and Frankel, 2014).

Effector	Subcellular localization	Interacting partners or substrates	Function
EspB	Plasma membrane, cytosol	α 1-antitrypsin, α -catenin, myosin-1c	Pore-forming translocon component; microvillus effacement; antiphagocytosis; disruption of adherens junctions
EspF	Plasma membrane, cytosol, mitochondria, nucleus	14-3-3zeta, ABCF2, actin, Arp2, CK18, N-WASP, profilin, SNX9, ZO-1/-2	Disrupts mitochondrial function, nucleolus, tight junctions and intermediate filaments. Inactivates NHE3 and SGLT-1; activates SNX9 and N-WASP; inhibits PI3K-dependent phagocytosis and induces apoptosis
EspG	Cytosol, Golgi	Arf1/6, PAK1/2/3, tubulin, GM130, Rab1	Disrupts microtubules, tight junctions and paracellular permeability; sequesters ADP-ribosylating factor (Arf) to modulate GTPase signaling; stimulates p21-activated kinases (PAKs) to inhibit endomembrane trafficking; binds GM130 and inactivates Rab1 to disrupt Golgi structure and protein secretion; induces calpain protease and necrosis in absence of Tir
EspH	Plasma membrane, pedestal	DH-PH Rho guanine nucleotide exchange factors (GEFs)	Inhibits RhoGTPase signaling and FC γ R-mediated phagocytosis; causes cell detachment via disassembly of focal adhesions and remodels brush border; promotes actin nucleation and pedestal elongation by recruiting N-WASP and Arp2/3 via WIP
EspZ	Plasma membrane, mitochondria	CD98, translocase of inner mitochondrial membrane 17b (TIM17b)	Inhibits apoptosis and cytotoxicity; regulates Type III secretion via "translocation stop" activity
Map	Mitochondria	Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulatory factor (NHERF)-1 and -2, Cdc42	GEF for Cdc42 that induces transient filopodia formation; causes mitochondrial dysfunction; inactivates sodium-d-glucose cotransporter (SGLT-1) in a manner that may result in net fluid secretion; disrupts tight junctions, causing loss of epithelial barrier integrity
Tir	Plasma membrane	Intimin, 14-3-3tau, α -actinin, cortactin, CK18, IQGAP1, IRTKS, IRSp53, Nck, PI3K, SHP-1, Talin, Vinculin	Receptor for intimin, actin pedestal formation, regulates activities of Map and EspG
EspI/NleA	Plasma membrane, Golgi	Syntrophin, Sec23/24, MALS3, PDZK11, SNX27, TCOF1, NHERF-1 and -2, MAGI-3, SAP97 and -102 PSD-95	Inhibits protein export from the endoplasmic reticulum by disrupting COPII function; disrupts tight junctions
EspJ	Cytosol, mitochondria	Unknown	Inhibits phagocytosis mediated by complement receptor 3- and Fc γ -receptor
EspK	Cytosol	Unknown	Unknown, influences intestinal colonization of calves by EHEC O157:H7
EspL	Pedestal	Annexin 2	Promotes F-actin bundling activity of annexin 2
EspM	Cytosol	RhoA	GEF for RhoA that induces actin stress fibers and modulates pedestal formation; disrupts tight junctions and monolayer integrity
EspN	Unknown	Unknown	Unknown
EspO	Unknown	Integrin-linked kinase (ILK)	Regulates EspM2-mediated RhoA activity and stabilizes focal adhesions to block cell detachment
EspR	Unknown	Unknown	Unknown
EspV	Cytosol	Unknown	Alters cell morphology
EspW	Unknown	Unknown	Unknown
EspX	Unknown	Unknown	Unknown
EspY	Unknown	Unknown	Unknown

NleB	Cytosol	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Inhibits TNF α -induced activation of NF- κ B and proinflammatory responses by transferring N-acetyl-d-glucosamine to GAPDH, thereby disrupting TRAF2-GAPDH interaction to suppress TRAF2 polyubiquitination and NF- κ B activation
NleC	Cytosol, nucleus	p65 (RelA), p50, c-Rel, I κ B, acetyltransferase p300	Zinc metalloprotease that cleaves p65 (RelA), p50, c-Rel and I κ B to inhibit NF- κ B activation
NleD	Cytosol	c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)	Zinc metalloprotease that cleaves JNK and MAPK to inhibit induction of apoptosis and proinflammatory responses
NleE	Cytosol	TAB2 and -3	Blocks I κ B degradation to inhibit activation of NF- κ B, proinflammatory responses and neutrophil transepithelial migration. Uses S-adenosyl-l-methionine-dependent methyltransferase activity to modify Npl4 zinc finger domains in TAB2 and TAB3, which regulate NF- κ B signaling
NleF	Unknown	Caspase-4, -8, and -9, Tmp21	Inhibitor of caspase activation and apoptosis; binds the COPI-vesicle receptor Tmp21 involved in Golgi function and slows protein secretion
NleG/NleI	Cytosol	UBE2D2	E3 ubiquitin ligases analogous to eukaryotic RING finger and U-box enzymes
NleH	Plasma membrane, cytosol, endoplasmic reticulum	Bax-inhibitor 1, NHERF2, ribosomal protein S3 (RPS3)	Binds Bax-inhibitor 1 to block apoptosis; sequesters RPS3 to inhibit NF- κ B signaling
TccP/EspF _U	Pedestal	N-WASP, IRSp53, IRTKS, cortactin	Relieves auto-inhibition of N-WASP to stimulate the Arp2/3 complex to polymerize actin and form pedestals

L'expression de chaque opéron de ce LEE est inactivée de manière constitutive par la fixation d'une protéine H-NS (« *Histone-like protein* ») sur le site de fixation de l'ARN polymérase. La fixation de la protéine Ler (LEE1) à la protéine H-NS active l'expression des opérons. Le SSTT est assemblé (**Figure 9**), EspA permet l'élargissement de la seringue de l'injectisome (SSTT) jusqu'à la membrane de la cellule eucaryote. EspB et EspD transloquent ensuite à travers cette seringue moléculaire pour former un port d'ancrage du SSTT dans la membrane de la cellule cible qui relie la bactérie à la cellule hôte (**Figure 10**).

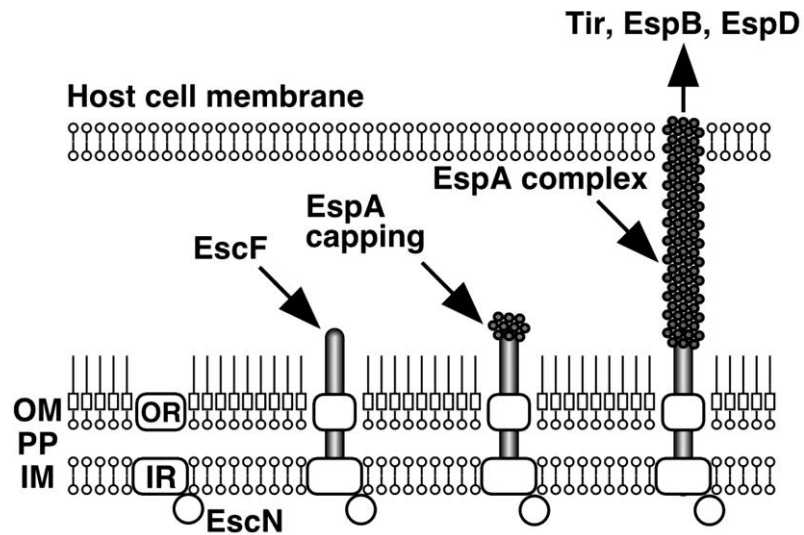


Figure 9: Représentation schématique de l'assemblage du système de sécrétion de type III chez les EPEC (Sekiya et al., 2001).

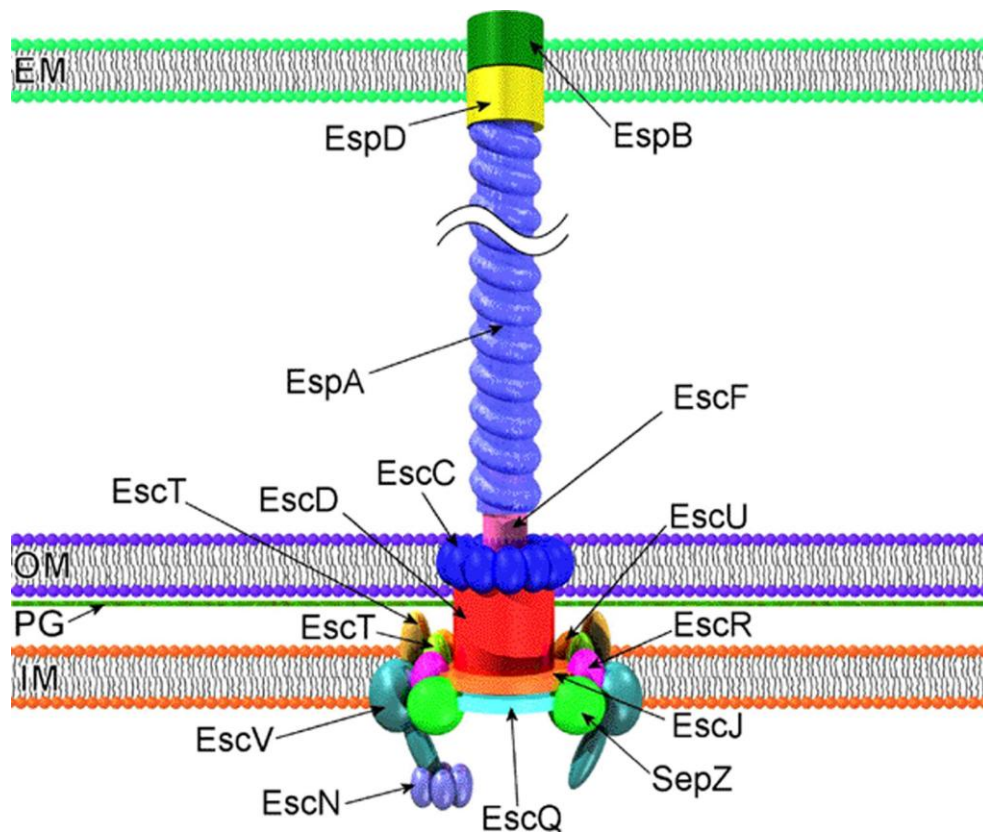


Figure 10: Représentation schématique du système de sécrétion de type III, exprimé par les EHEC et *C. rodentium* (Pallen et al., 2005).

Grâce au SSTT ainsi formé, les protéines Tir sont ensuite transférées dans le cytoplasme de la cellule cible. Elles sont insérées dans la membrane plasmique eucaryote et

servent de récepteurs aux intimines exprimées à la surface de la membrane externe bactérienne et codées par le gène *eae*. L'association entre ces deux protéines permet la mise en place d'une relation très rapprochée entre la bactérie et sa cible. Cet attachement permet le recrutement, par l'intermédiaire des récepteurs Tir, de protéines eucaryotes qui induisent des réarrangements du cytosquelette et forment un « piédestal » d'actine autour de la bactérie, créant ainsi une niche pour le développement du pathogène. La formation de ce piédestal crée le phénotype d'effacement des microvillosités des cellules endothéliales du côlon à l'origine des diarrhées aqueuses (lésion d'attachement/effacement [A/E], **Figure 11**) (Croxen and Finlay, 2010).

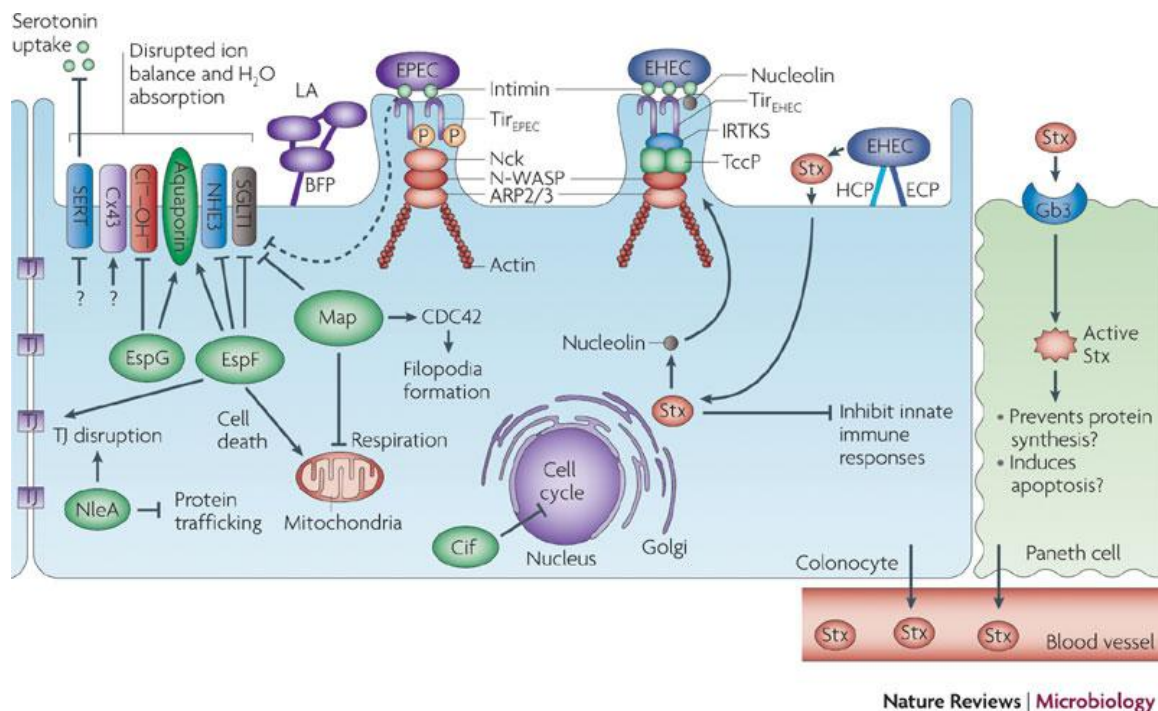


Figure 11: Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* entéropathogènes et entérohémorragiques (Croxen and Finlay, 2010).

La colonisation du tube digestif est une étape majeure de la physiopathologie des EHEC. Les EHEC mettent notamment en place des lésions A/E analogues à celles décrites

chez les EPEC (**Figure 11**). Néanmoins, contrairement aux EPEC qui colonisent l'intestin grêle, les lésions A/E des STEC se concentrent au niveau de l'épithélium folliculaire des plaques de Peyer (Phillips and Frankel, 2000).

Différents variants du gène *eae* existent (Caprioli et al., 2005). Il semblerait que ces variants soient impliqués dans le tropisme cellulaire. En effet, les souches d'EPEC sont capables de coloniser et d'établir des lésions A/E au niveau de l'intestin grêle, tandis que les EHEC sont retrouvés au niveau de l'iléon terminal et du côlon, notamment à proximité des plaques de Peyer. Or il a été démontré qu'une souche EHEC O157:H7 inactivée pour le gène *eae-gamma* et *trans*-complémentée pour le gène *eae-alpha*, communément retrouvé chez les EPEC, était capable de coloniser le côlon et l'intestin grêle de porcs gnotobiotiques, à l'instar des souches EPEC (Tzipori et al., 1995).

D'autres facteurs d'adhésion potentiels ont été décrits chez les STEC. Le génome de la souche SAKAI O157:H7 contient au moins 16 groupes de gènes codant pour des adhésines fimbriaires. Ces gènes sont également retrouvés chez des souches non-O157, même si certains ne semblent pas être totalement fonctionnels. Cependant, l'hypothèse de *trans*-complémentation des différents loci exprimant ces adhésines potentielles a été émise (Ogura et al., 2009).

Parmi ces autres facteurs d'adhésion, nous pouvons citer le gène *saa* (« *STEC autoagglutinating adhesin* ») codant pour une adhésine non fimbriaire auto-agglutinante. Ce gène a notamment été retrouvé chez des souches d'EHEC *eae* négatives et isolées de cas humains (Paton et al., 2001). L'adhésine EfaI est impliquée dans l'adhésion *in vitro* de STEC à des cellules cibles (Badea et al., 2003; Nicholls et al., 2000). Ce gène *efaI* présente 99,9% d'homologie avec le gène *lifA* (pour « lymphocyte inhibitory factor A ») codant pour une lymphotoxine présente chez les souches EPEC (Klapproth et al., 2000; Nicholls et al., 2000).

La protéine ToxB, impliquée dans l'adhésion des souches EHEC O157:H7 sur des cellules Caco-2 *in vitro* favorise la sécrétion des protéines par le SSTT (Stevens et al., 2004; Tatsuno et al., 2001). Cette protéine présente des homologues avec la toxine B de *Clostridium difficile* (Barroso et al., 1990; Makino et al., 1998). Le facteur d'adhésion Lpf (pour « long polar fimbriae ») semble être impliqué dans l'adhésion des souches O157:H7 (Payne et al., 2003; Pearce et al., 2004). Ces Lpf sont néanmoins présents chez de nombreuses souches d'*E. coli*, notamment pathogènes, et ne semblent donc pas être spécifiques des EHEC (Toma et al., 2006).

Des gènes chromosomiques (Spears et al., 2006) et des îlots génomiques (Shen et al., 2005) codant potentiellement pour d'autres adhésines fimbriaires ont également été mis en évidence (*sfa*, *stp* et *stc*, OI-1 et OI- 47) mais leur rôle dans la pathogénie des EHEC reste à déterminer. Les « bundle-forming pilus » jouent un rôle dans l'adhésion des EHEC aux cellules cibles (Croxen and Finlay, 2010). Une protéine de la membrane externe bactérienne, Iha (pour « IrgA homologue adhesin»), proche de la protéine IrgA (« Iron-regulated gene homologue A ») de *Vibrio cholerae*, a été identifiée. Iha confère aux bactéries un phénotype d'adhésion diffuse sur des cellules HeLa en culture (Tarr et al., 2000).

4.2.3. Les Shiga-toxines (Stx)

Les Shiga-toxines sont les principaux facteurs de virulence des EHEC (**Figure 12**). Deux types de Shiga-toxines ont été décrits dans la littérature : les Shiga-toxines de type 1 (Stx1) et de type 2 (Stx2). Les toxines Stx1 et Stx2 présentent respectivement 99% et 54% d'homologie de séquence protéique avec la toxine produite par *Shigella dysenteriae* (Mariani-Kurkdjian and Bingen, 2012). Ces deux toxines ont des caractéristiques antigéniques différentes, mais leur mode d'action reste similaire (Strockbine et al., 1986). Les gènes *stx*

sont codés par un prophage lambdoïde intégré dans le chromosome bactérien. Il semblerait que la toxine Stx2 soit la plus fréquemment retrouvée lors d'épidémies et de cas graves d'infections à EHEC (AFSSA, 2010).

Ces toxines sont des hétéro polymères constitués d'une sous unité A (pour « activity »), responsable de leur activité cytotoxique, et d'un homo pentamère de sous-unités B (pour « binding »), permettant la reconnaissance et la fixation de la toxine à son récepteur glycolipidique, le globotriosyl céramide (Gb3).

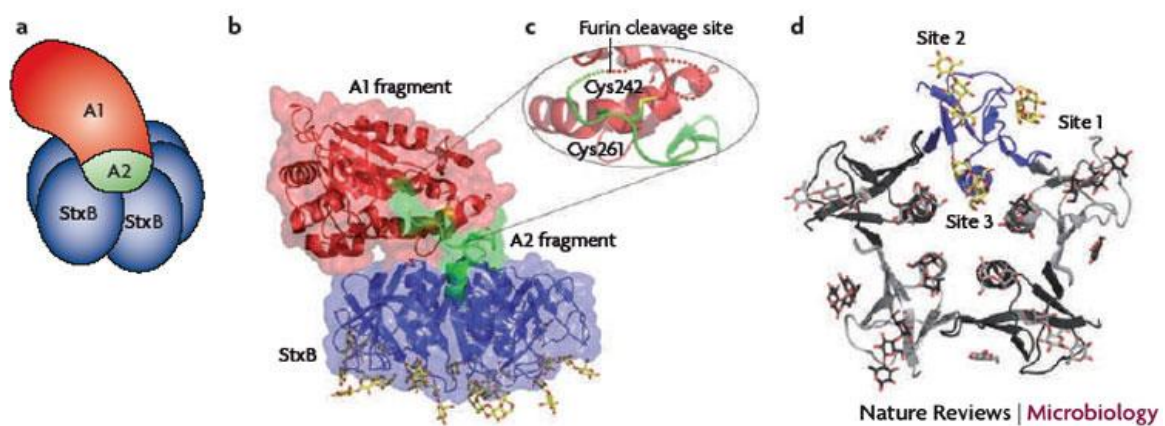


Figure 12: Représentations schématiques de la structure des toxines Stx.

(a) Structure schématique des shiga-toxines exprimées par les STEC et les EHEC. (b) Diagramme de Ribbon montrant le site de fixation de la sous unité StxB au Gb3. (c) Site de clivage de la sous unité StxA du pentamère StxB entre la Cys242 et la Cys261. (d) Diagramme de Ribbon montrant le pentamère de sous unité StxB orienté vers la membrane et montrant les trois sites de fixations au Gb3 (Johannes and Römer, 2010).

Une fois fixée à son récepteur, la shiga-toxine est internalisée par endocytose, et subit un transport rétrograde jusqu'à l'appareil de Golgi et le reticulum endoplasmique. La sous unité A est séparée de l'homopentamère B par un mécanisme de thio-réduction et est clivée en deux sous unités A1 et A2. La sous unité A1, porteuse de l'activité N-

glycosidase de la toxine, est ensuite transloquée au niveau cytosolique et agit sur l'adénosine A2348 de l'ARN ribosomique 28S. Ceci entraîne l'inactivation de la sous unité 60S du ribosome inhibant la synthèse des protéines eucaryotes. L'inhibition de la synthèse protéique est à l'origine du stress ribotoxique responsable de l'induction apoptotique de la cellule hôte (**Figure 13**; Erwert et al., 2003; O'Brien et al., 1992; Schüller, 2011).

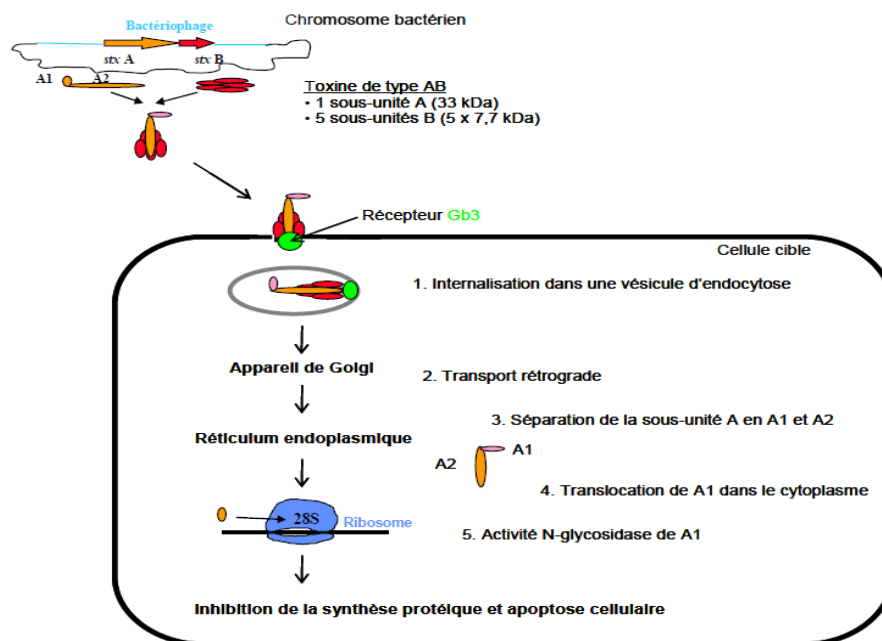


Figure 13: Mécanisme d'action des Shiga-toxines (Mariani-Kurkdjian and Bingen, 2012).

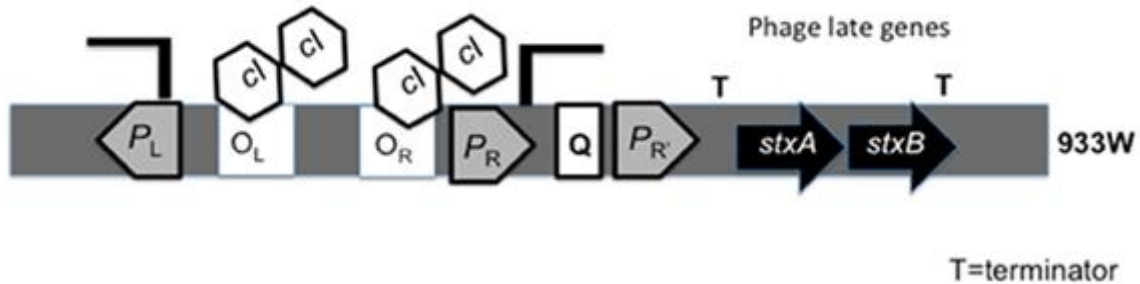
Egalement connu sous le nom CD77 (« *Cluster of differentiation* »), le récepteur Gb3 des toxines Stx est exprimé à la surface des cellules endothéliales intestinales, rénales et cérébrales mais également à la surface de certains lymphocytes B du centre germinal (Mangeney et al., 1993). Il a été décrit comme étant impliqué dans la transduction de signaux apoptotiques. Il est également impliqué dans les régulations de

la réponse immunitaire adaptative. En effet, le suicide cellulaire programmé est retrouvé au cours de l'embryogénèse, de la métamorphose cellulaire, au cours de régression tumoral mais également lors de la sélection clonale des lymphocytes B immatures au niveau du centre germinal (Taga et al., 1997). Ce centre germinal se situe au niveau des organes lymphoïdes secondaires et est responsable de la différenciation, la prolifération et la maturation des lymphocytes B lors de la réponse immune normale consécutive d'une infection (Thorbecke et al., 1994). Ce cluster de différenciation CD77 semble être un récepteur pour le CD19, une molécule impliquée dans l'apoptose. De manière intéressante, l'association entre le CD77 et le CD19 semble induire un transport rétrograde analogue à l'internalisation des Stx (Khine et al., 1998). De plus, il semblerait que les séquences protéiques du CD19 et de la sous unité B des Stx présentent de fortes similarités.

La régulation de l'expression des deux gènes *stx* est sous le contrôle de deux promoteurs phagiques distincts (**Figure 14**; Schüller, 2011). Contrairement à Stx1, la transcription de Stx2 est fortement dépendante de l'expression de gènes lytiques du phage (Croxen and Finlay, 2010). Ainsi, l'expression de cette toxine induit la lyse bactérienne et sa libération dans le milieu environnemental (Wagner et al., 2001). Les mécanismes de régulation de l'expression de ces toxines sont encore mal compris. L'un d'eux serait l'induction de l'expression de Stx1 en réponse à une faible concentration en fer dans le milieu extracellulaire via la protéine Fur (Schüller, 2011). Un autre mécanisme serait dû à une réponse à des signaux SOS (déclenchés notamment par l'ajout d'antibiotiques) activant l'expression de la protéine de stress RpoS. Cette protéine clive alors le répresseur phagique et déclenche l'expression de Stx2 (Wagner et al., 2001).

Shiga toxin expression

Quiescent state - phage lysogenic cycle



Induced state - phage lytic cycle

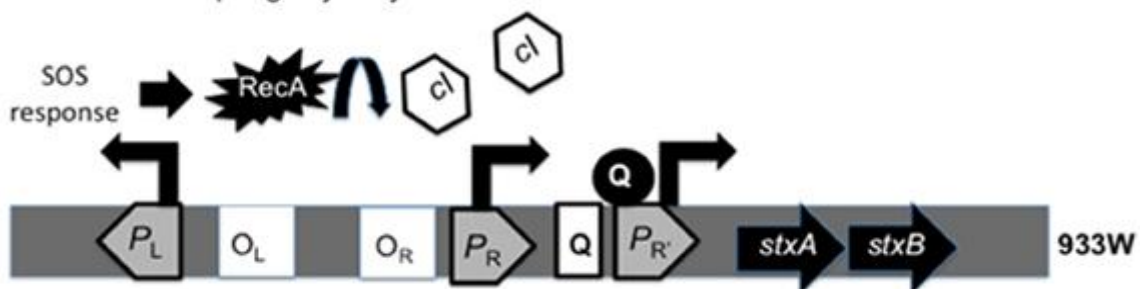


Figure 14: Régulation de l'expression des Shiga-toxines en fonction des cycles phagiques (Schüller, 2011).

Le répresseur cI se fixe au niveau des sites opérateurs O_L et O_R inhibant la transcription des gènes sous contrôle des promoteurs P_L et P_R . La présence d'un site de terminaison en amont de $P_{R'}$ inhibe la transcription des gènes codant pour *stxAB* permettant au phage de demeurer quiescent. En cas de signaux SOS, la protéine RecA clive le répresseur cI, levant la répression de P_R et activant l'expression des anti-terminateurs N et Q. L'anti-terminateur Q se fixe à $P_{R'}$, activant la transcription des gènes *stxA* et *stxB* et les gènes impliqués dans la phase lytique du phage.

En 2016, bien qu' aucun système de sécrétion n'ait été identifié, il a été démontré que les toxines Stx1 et Stx2 sont retrouvées dans des vésicules de membrane externe (OMV pour *Outer Membrane Vesicle*) (Kolling and Matthews, 1999; Yokoyama et al., 2000). Ces OMV sont synthétisées lors de l'infection bactérienne et peuvent fusionner avec la membrane plasmique eucaryote, libérant ainsi leur contenu dans le cytoplasme de la cellule cible (Kolling and Matthews, 1999).

Le fait que la libération des toxines Stx, et notamment de Stx2, semble fortement dépendante de la mort cellulaire des STEC soulève la question du bénéfice pour la bactérie d'exprimer ces toxines. Si les STEC ne trouvent pas d'avantage pour la synthèse de toxines, une pression de sélection des bactéries présentant des mutations pour les sites lysogéniques se mettrait en place et éliminerait les virus des populations bactériennes. Puisque ces populations de STEC se maintiennent, la présence de phages codant pour les toxines Stx conférerait un avantage écologique pour les STEC, favorisant ainsi le maintien de ces virus en tant que prophage (Loś et al., 2012a).

Les complications systémiques des infections à EHEC nécessitent le passage des Stx à travers la barrière intestinale vers la circulation sanguine. Les mécanismes mis en jeu lors de ce passage ne sont pas encore bien définis, mais plusieurs pistes ont été suggérées (**Figure 15**). Etienne-Mesmin et al., (2011) ont montré qu'*E. coli* O157:H7 peut transloquer au travers des cellules M présentes au niveau des plaques de Peyer (**Figure 16**). Une fois dans la *lamina propria*, les EHEC sont phagocytés par les macrophages où ils survivent et produisent des toxines Stx. L'accumulation de toxines induit la mort du macrophage hôte et les toxines sont libérées dans la circulation sanguine où elles atteignent les organes cibles que sont les reins, l'intestin grêle et le cerveau (Etienne-Mesmin et al., 2011).

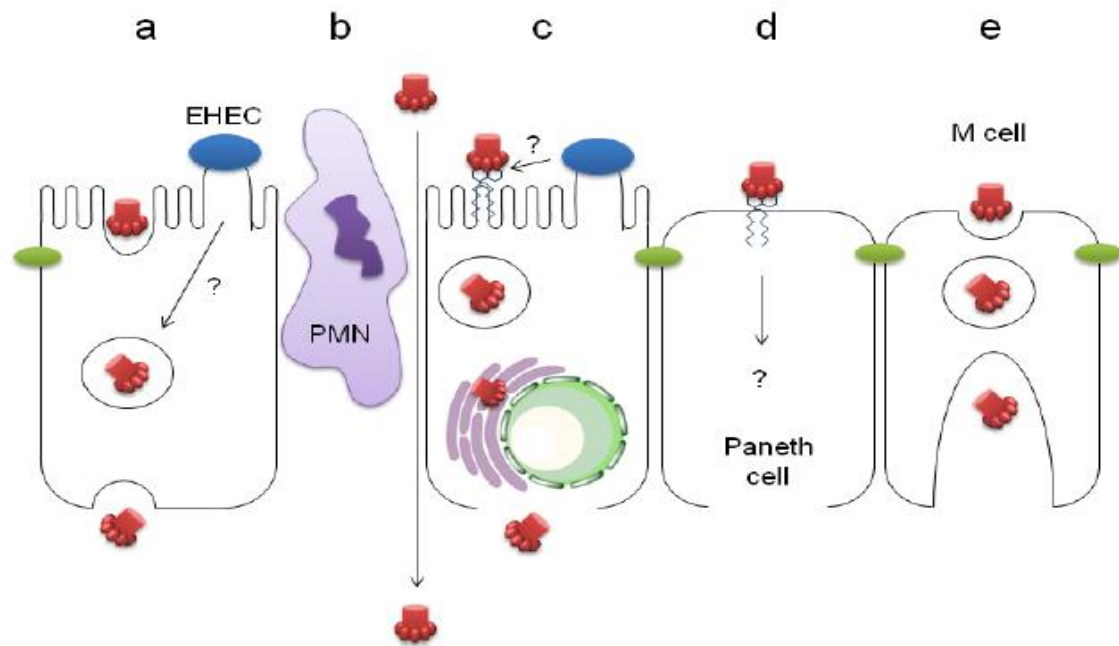


Figure 15: Voies potentielles de passage des toxines Stx à travers l'épithélium intestinal humain (Schüller, 2011).

(a) Transcytose Gb3-indépendante, probablement déclenchée par l'infection à EHEC; (b) transport para-cellulaire lors du passage des polynucléaires neutrophiles; (c) induction de l'expression de Gb3 par l'infection à EHEC, transport rétrograde et libération de Stx après la mort cellulaire; (d) translocation Gb3-dépendante par l'intermédiaire des cellules de Paneth; (e) transcytose via les cellules M.

PMN : Polynucléaire Neutrophile.

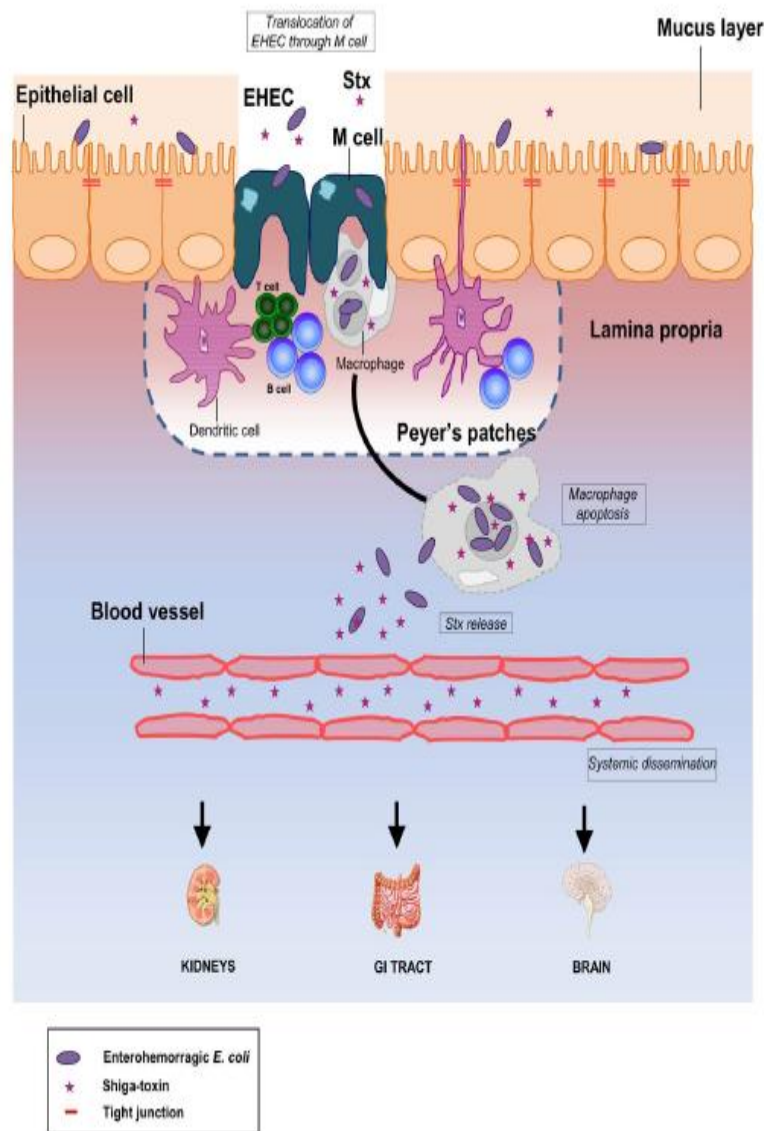


Figure 16: Nouveau modèle de physiopathologie des infections à EHEC (Etienne-Mesmin et al., 2011).

Les EHEC traversent l'épithélium intestinal au niveau des cellules M des plaques de Peyer. Une fois dans la *lamina propria*, les bactéries sont phagocytées par les macrophages résidents. Les EHEC survivent au stress oxydatif consécutif de la phagocytose et peuvent produire des toxines. Cette accumulation de toxines provoque la mort du macrophage hôte. Les toxines sont alors libérées dans la circulation sanguine et atteignent les organes cibles: reins, intestin, cerveau.

Des études épidémiologiques menées aux Etats-Unis et en Grande-Bretagne ont suggéré que les patients atteints d'une colite hémorragique due à une infection à EHEC produisant Stx1 et Stx2 ou Stx2 seule, ont plus tendance à développer de sérieuses complications telles que le SHU et le PTT que les patients infectés avec EHEC ne produisant que Stx1 (Ethelberg et al., 2004; Ostroff et al., 1989). Stx2 semble donc être un déterminant pathogénique plus important que Stx1. De plus, de nombreux variants génétiques de ces deux types de toxines ont été décrits dans la littérature. Trois sous types de Stx1 (Stx1a, Stx1c et Stx1d) et sept pour Stx2 (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f et Stx2g) ont ainsi été définis (Scheutz et al., 2012). Il semblerait que certains sous types, notamment les sous types Stx2a, Stx2c et Stx2d, soient les plus souvent rencontrés dans le déclenchement de diarrhées sanglantes et de SHU (Karch et al., 2006). Enfin, les toxines Stx induiraient la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et les monocytes, engendrant alors la production de Gb3 à la surface des cellules, les rendant ainsi plus sensibles à l'action des Shiga-toxines (Johannes and Römer, 2010).

4.2.4. Autres facteurs de pathogénicité

La majorité des séquences d'ADN spécifiques à *E. coli* O157:H7 EDL933 semblent provenir de transferts horizontaux orchestrés par l'intermédiaire de prophages (Perna et al., 2001). Des événements de transferts horizontaux provenant de 53 espèces différentes auraient permis l'obtention de ces séquences spécifiques (Putonti et al., 2006). Les souches d'EHEC O157:H7 possèdent également un plasmide appelé pO157. Il s'agit d'un plasmide non-conjugatif de type F, d'une taille allant de 92 à 104 kb en fonction de la souche étudiée. Ce plasmide contient différents éléments mobiles tels que des transposons, des prophages, des séquences d'insertion (IS pour *insertion sequence*) et des fragments d'autres plasmides

bactériens (Perna et al., 2001). La séquence complète de ce plasmide montre 100 ORFs (Open Reading Frame) dont 43 présentent des similarités avec des protéines connues. Trente-cinq de ces protéines pourraient être impliquées dans la virulence de la bactérie, même si seulement 19 dont l'hémolysine, une catalase-peroxydase, un système de sécrétion de type II, une sérine protéase, une adhésine, une métalloprotéase et un fragment conservé du gène *eae* ont été caractérisés. Le rôle des produits des gènes de ce plasmide pO157 dans la physiologie de la bactérie reste cependant encore mal compris (Burland et al., 1998).

En 2016, la liste des gènes impliqués dans le déclenchement des symptômes et dans la virulence des STEC pathogènes n'est toujours pas totalement définie. Plusieurs gènes codant pour des toxines, tels que l'entérohémolysine E-hlyA (Beutin, 1991), l'entérohémolysine thermostable EAST1, la cytotoxine subtilase (SubAB), les cyclomodulines CDT (pour «*Cytolethal Distending Factor*») ou encore la toxine Cif (pour «*Cycle inhibiting factor*») ont été caractérisés. Des gènes codant pour des protéases telles que la sérine protéase EspP, la catalase peroxydase KatP et la métalloprotéase StcE ont également été identifiés. Ces bactéries mettent également en place des systèmes de captation du fer nécessaires à leur virulence, notamment les sidérophores codé par l'îlot de pathogénicité HPI (pour «*High Pathogenicity Island*»). Afin de coloniser efficacement le tractus gastro-intestinal, les EHEC ont développé des mécanismes de résistance efficaces à l'acidité (cf paragraphe 4.2.5.2.1). Ils possèdent également un gène codant pour une uréase qui contribue au *fitness* de la bactérie lors de la colonisation du tractus gastro-intestinal. Néanmoins ce dernier gène ne semble pas être indispensable pour l'établissement de la virulence des EHEC (Steyert and Kaper, 2012).

De nombreux gènes de virulence ont été mis en évidence après comparaison avec le génome de la souche de référence *E. coli* K12 MG1655. Ils sont portés par des « O-Island » (OI), des îlots de pathogénicité retrouvés au sein du génome des EHEC. Cent soixante-dix-sept îlots ont été identifiés sur le génome de la souche de référence O157:H7 EDL933, (Perna

et al., 2001). La distribution de ces OI semble être de souche dépendante et le corolaire entre présence de ces gènes et déclenchement des pathologies à EHEC a été établi (Coombes et al., 2008a). Bien que de nombreux effecteurs de la virulence transloqués dans la cellule hôte par l'intermédiaire du système de sécrétion de type III soient codés par les gènes du LEE, d'autres sont retrouvés dans les OI (Nle pour « *Non LEE encoded effector* ») (Tobe et al., 2006). A ce jour, 16 gènes *nle*, répartis sur 4 îlots de pathogénicité (OI-50, OI-57, OI-71 et OI-122) ont été identifiés. La plupart ont pour fonction de moduler la réponse inflammatoire de la cellule hôte (Bugarel et al., 2011; Coombes et al., 2008a; Delannoy et al., 2013a; Ju et al., 2013; Karmali et al., 2003).

Les EHEC présentent ainsi de nombreux facteurs génétiques associés à la pathogénicité. Ces bactéries ont développé des stratégies pour une colonisation efficace de l'hôte cible en accroissant leur survie dans des conditions délétères par l'intermédiaire de mécanismes de résistance aux différents stress rencontrés. Cette résistance (e.g. stress acide, oxydatif) favorise leur survie jusqu'aux sites de colonisation de prédilection que sont les plaques de Peyer de l'iléon terminal et le côlon humain. L'expression de facteurs d'adhésion permet à ces pathogènes de se fixer de manière efficace et étroite aux cellules hôte de manière à ne pas être éliminés par le flux du transit intestinal. L'adhésion des pathogènes induit une réponse spécifique de l'hôte par l'expression de cytokine pro-inflammatoire autocrine telle que le TNF-alpha. Ces cytokines sont, entre autres, responsables de la transduction de signaux « d'alarme » permettant le recrutement de cellules de l'immunité (Macrophages, polynucléaires neutrophile). Les EHEC, par l'intermédiaire du système de sécrétion de type III, injectent dans la cellule hôte des effecteurs de la virulence qui inhibent la synthèse de ce type de cytokines, bloquant ainsi les communications cellules-cellules. Une autre conséquence de la colonisation des cellules intestinales par les EHEC est l'induction de signaux apoptotiques par la cellule hôte afin de recruter des cellules de l'immunité impliquées

dans l'autophagie et le suicide cellulaire. De même, les EHEC par l'intermédiaire de l'injectisome, inhibent l'apoptose cellulaire et assure ainsi leur maintien au niveau des sites d'adhésion. Enfin, la phagocytose des EHEC par les macrophages n'induit pas la destruction totale de la population bactérienne mais favorise la synthèse de shiga toxines Stx.

4.2.5. Les réponses aux stress des STEC

Au cours de la vie des STEC, ces bactéries transitent d'un environnement à l'autre (e.g. environnement de ferme, matrice laitière, tractus gastro-intestinal humain/bovin, ...). Les variations physico-chimiques retrouvées dans ces différents environnements impactent la physiologie des STEC. Il s'agit de stress auxquels les STEC doivent s'adapter de manière à se maintenir et à croître dans ces environnements.

Le « Hurdle concept » définit l'effet synergique de différents stress sur la croissance et la survie de souches bactériennes (pathogènes ou non) au sein d'un environnement tel que les matrices fromagères (Leistner, 2000). En effet, durant la fabrication du fromage au lait cru, et en fonction des technologies de fabrication employées, différents stress peuvent être rencontrés par les bactéries. Il s'agit du salage et de l'égouttage/délactosage (stress osmotique), des variations de température (stress thermique), des variations de pH (stress acide), et l'oxydation (stress oxydatif) dus à l'action d'enzymes et du microbiote présent dans le lait (Montel et al., 2014; Peng et al., 2011). De même, ces pathogènes rencontrent au cours de la digestion chez l'homme des conditions physico-chimiques induisant des stress analogues chez les STEC. Celles-ci sont : la barrière acide gastrique (stress acide), le passage de la température ambiante à la température du corps humain (37°C), la bactériolyse liée aux cellules de l'immunité par l'intermédiaire de ROS (stress oxydatif).

Ainsi les STEC doivent répondre à ces stress par différents mécanismes moléculaires complexes ayant des effets majeurs sur leur croissance, leur survie et leur physiologie dans ces types d'environnement. La réponse au stress peut être divisée en une réponse au stress « globale » et une réponse au stress « spécifique » (Peng et al., 2011). La réponse spécifique au stress est ciblée sur un seul signal de stress et généralement, elle inclut l'élimination des composés du stress et/ou la réparation des dommages. La réponse globale au stress peut, contrairement à la dernière, être déclenchée par différents stress.

L'objectif des prochains paragraphes est de décrire les mécanismes moléculaires de résistance aux différents stress que les STEC peuvent notamment mettre en œuvre dans les matrices fromagères et au cours de la transformation du lait en fromage suivant différentes technologies et lors de la digestion chez l'homme.

4.2.5.1. Réponses globales aux stress et système SOS

Le système SOS des *E. coli* regroupe environ 30 gènes impliqués dans la division cellulaire, la réplication et la réparation de l'ADN. L'expression de ces gènes est contrôlée par des lésions causées à l'ADN lorsque la bactérie subit un stress. Ces dommages sont reconnus par l'enzyme de réparation et de recombinaison RecA. L'induction de la réponse au stress peut significativement augmenter le niveau d'induction du prophage porteur du gène *stx* (Waldor and Friedman, 2005). La nature et l'intensité de la réponse au stress peuvent varier entre *E. coli* pathogènes et non pathogènes mais aussi entre souches pathogènes (H J Chung et al., 2006).

Cette réponse globale est majoritairement régulée par le régulateur σ^S (RpoS) qui touche différents régulons et entraîne un état physiologique de cellules plus résistantes (Peng et al., 2011). Bien que l'expression du gène *rpoS* soit constitutive, le niveau cytoplasmique de σ^S

dans des conditions normales de croissance reste faible car cette protéine est dégradée par la protéase ClpXP (H J Chung et al., 2006). Durant la phase exponentielle de croissance d'*E. coli* en conditions de cultures optimales, σ^S n'est pas détectable. Lorsque les souches sont stressées, la quantité de σ^S peut augmenter de 3 à 20 fois (Hengge-Aronis, 2002). Le facteur σ^S est induit en réponse à l'entrée en phase stationnaire ainsi que lors d'un stress acide, de carence nutritive, de forte osmolarité ou encore d'un stress thermique.

Bien que le facteur σ^S soit impliqué dans la transcription de plus de 35 gènes et joue un rôle clef dans la réponse au stress global, d'autres systèmes régulateurs et facteurs sigma jouent un rôle dans la réponse au stress spécifique (H J Chung et al., 2006).

L'adaptation à un stress ainsi que l'induction de σ^S induit une meilleure résistance des *E. coli*. Ces derniers sont protégés contre le stress rencontré mais également contre d'autres stress que la bactérie n'a encore jamais rencontrés. Cette protection est appelée la « *cross protection* » (Peng et al., 2011). Par exemple, la réponse au stress acide pourrait favoriser la survie des STEC en activant certains mécanismes de défense contre un stress thermique (Cheng et al., 2002). Cette augmentation de la thermo-résistance semble néanmoins souche-dépendante. Trois souches d'*E. coli* O157:H7 (ATCC 43889, ATCC 43895) adaptées à un pH de 5 ont une résistance accrue à une augmentation de température jusqu'à 52°C. Aucun effet significatif n'était observé pour la souche EDL933 (Cheng et al., 2002).

4.2.5.2. Les réponses spécifiques aux stress

4.2.5.2.1. La réponse au stress acide

Pour coloniser un hôte et déclencher une pathologie, les EHEC doivent être capables de survivre à l'environnement très acide de l'estomac humain (pH compris entre 1,5 et 5). Les

environnements acides induisent des perturbations au niveau des réserves d'énergie (perturbation du maintien de la force proton motrice), et au niveau de l'homéostasie (diminution du pH interne de la bactérie engendrée par les flux d'anions et de protons). Cette diminution de pH peut être à l'origine de pertes de fonctions ou de dénaturations enzymatiques (Peng et al., 2011). Etant donnée la très faible dose infectieuse moyenne de ces bactéries (James P Nataro and Kaper, 1998), la résistance à l'acidité est un facteur clé pour la virulence du pathogène.

Les *E. coli* (pathogènes ou non) possèdent 5 systèmes différents de résistance à l'acide (AR1 à AR5) et chacun de ces mécanismes est impliqué dans la réponse à une gamme de pH définis allant jusqu'à des pH de 2 à 2.5 (Barnett Foster, 2013; Zhao and Houry, 2010). Parmi ceux-ci, un système oxydatif nommé AR1 et quatre systèmes de résistance à l'acide appelés « système aminoacide décarboxylase », impliquant un système glutamate-dépendant (AR2), arginine-dépendant (AR3), lysine-dépendant (AR4) et ornithine-dépendant (AR5) favorisent la survie et la croissance des STEC dans des conditions de pH normalement délétères. Le système glutamate-dépendant permet la survie des STEC dans un environnement hautement acide ($\text{pH} < 3$). Ces quatre systèmes sont basés sur l'action d'une enzyme décarboxylase, spécifique d'un acide aminé, couplée à un antiport permettant l'échange du produit décarboxylé par un nouveau substrat (Zhao and Houry, 2010). La décarboxylation de l'acide aminé entraîne la consommation d'un proton intracellulaire qui favorise l'augmentation du pH (Barnett Foster, 2013) .

Plusieurs études ont démontré que les souches d'*E. coli* O157:H7 sont extrêmement acido-résistantes puisqu'elles peuvent survivre jusqu'à 3h dans un fluide gastrique synthétique à pH 1,5 (Arnold and Kaspar, 1995; Roering et al., 1999). De plus, elles possèdent une résistance accrue à l'acidité lorsqu'elles sont en phase stationnaire de croissance (Arnold and Kaspar, 1995). L'adaptation d'une souche d'*E. coli* O157:H7 à un pH de 5 favorise sa

survie dans une solution d'acide lactique à pH 3,8 (Leyer et al., 1995). D'après Barnett Foster, (2013), les EHEC provenant d'aliments contaminés sont mieux adaptés à survivre au stress acide lors du passage dans le tractus gastro-intestinal. En effet, la réponse au stress acide peut être déclenchée avant l'ingestion, soit dans le tractus intestinal bovin, ou dans les aliments acides (Foster, 2004). De plus, des études ont montré que les EHEC O157:H7 ayant déjà exprimé la réponse au stress acide, restent résistants à l'acide pendant au moins un mois au cours de la réfrigération. Une fois induite, l'expression des gènes impliqués dans la résistance au stress acide reste stable lorsque les STEC se retrouvent dans un environnement extrême (pH 2.5 ; Lin et al., 1996). Large et al., (2005) mettent en évidence une diminution significative de la survie de O157:H7 vis-à-vis de O26:H11 et O121:H19 lorsque ceux-ci se retrouvent en milieu minimum à pH 2,5. Ils montrent également l'implication des ions Mg^{2+} dans la résistance à l'acidité. HdeA et HdeB sont deux protéines chaperonnes impliquées dans la réponse au stress acide. Ces protéines périplasmiques reconnaissent une variété de substrats et les maintiennent dans un état soluble lorsque l'environnement devient acide. *In vivo*, il a été montré que HdeA et HdeB sont requises pour une protection optimale des protéines du périplasme dans des conditions de pH de l'ordre de 2 à 3 (Zhao and Houry, 2010).

Ces bactéries ont développé d'autres stratégies en plus des cinq systèmes de résistance à l'acide. Elles sont par exemple capables de modifier la composition de leurs membranes cellulaires : les membranes cyclopropane d'acide gras (CFA). En effet, Brown et al, 1997 ont corrélié l'induction de la résistance aux acides et l'augmentation des taux de phospholipides dans les membranes CFA (Brown et al., 1997).

4.2.5.2.2. La réponse au stress thermique

Une augmentation de la température induit, chez les STEC, l'expression d'une famille spécifique de protéines, appelées protéines de choc thermique ou HSPs tels que IbpA et IbpB (Thomas and Baneyx, 1998). Les HSPs forment un groupe composé de protéines chaperonnes et de protéases qui aident au repliement, à la réparation et à la dégradation des protéines (Peng et al., 2011). Des molécules chaperonnes, comprenant le système DnaK-DnaJ-GrpE, facilitent le bon repliement de polypeptides nouvellement synthétisés et aident les protéines endommagées par le stress thermique à retrouver une forme biologique active (Hartl, 1996).

De manière globale, la réponse à un stress thermique se fait par l'intermédiaire du facteur sigma σ^{32} codé par le gène *rpoH*. Lorsque la température de l'environnement s'élève, une augmentation de la transcription des gènes codant σ^{32} et une stabilisation du niveau de cette protéine (normalement instable) sont observées (H J Chung et al., 2006).

4.2.5.2.3. La réponse au stress oxydatif

Des agents environnementaux abiotiques, tels que les radiations UV, les rayonnements ionisants ou d'autres agents biologiques tels que les cellules de l'immunité, les protozoaires bactériophages, le microbiote laitier (*Lactococcus garviae*) ou l'enzyme xanthine oxydo-reductase retrouvés dans le lait cru, génèrent des radicaux libres O₂⁻ intracellulaires. Ce stress augmente lorsque la concentration en ROS atteint un niveau qui excède les capacités de défense des cellules. Les cibles biologiques de ces ROS sont l'ADN, l'ARN, les protéines et

les lipides (Cabiscol et al., 2000). La formation de ROS est souvent en relation avec des phénomènes d'anoxie-réoxygénation.

La réponse au stress induite chez les STEC par des agents générant des ions superoxydes dépend du locus *soxRS*. Les gènes *soxR* et *soxS* codent des activateurs de transcription qui participent à l'activation en cascade de plus de 16 gènes. Parmi eux, deux flavodoxines codées par les gènes *fldA* et *fldB* et une manganèse superoxyde dismutase codée par *sodA* (Pomposiello and Dimple, 2001). Touati (1988) a démontré qu'un traitement au peroxyde d'hydrogène élevait significativement le niveau de transcription du gène *sodA*. Les stress oxydatifs induisent l'expression des gènes *stx* (Loś et al., 2012b). Un autre mécanisme impliqué dans la résistance au stress oxydatif est la présence dans le génome des STEC de l'opéron *ter*. Cet opéron, bien qu'encore mal compris en 2016, est impliqué dans la résistance au tellurite, au stress oxydatif, dans la résistance aux bactériocines et à l'infection par des phages (Anantharaman et al., 2012; Chasteen et al., 2009).

4.2.5.2.4. La réponse au stress osmotique

Le salage des fromages augmente la pression osmotique induisant une accumulation de solutés dans le cytoplasme bactérien. *Escherichia coli* répond à un stress alcalin par l'assimilation de potassium pour rééquilibrer la balance osmotique de part et d'autre de sa membrane plasmique. Trois mécanismes sont connus chez *E. coli* : un transporteur à faible affinité pour le potassium Trk et un transporteur à forte affinité pour le potassium Kdp. Un autre mécanisme est le système Kdp-ATPase (Peng et al., 2011; Wood, 1999).

La réponse au stress osmotique des bactéries consiste en une réponse immédiate (spécifique) activant des gènes impliqués dans des systèmes de transport ainsi que des enzymes. Elle repose sur des osmosenseurs indirects qui détectent des changements au

niveau des propriétés cellulaires altérées tels que le volume de la cellule, la pression turgor (gonflement d'une cellule causée par une entrée d'eau) ou encore la tension membranaire (Peng et al., 2011). Lorsque la pression osmotique augmente dans l'environnement, les cellules activent un système d'osmo régulation afin de prévenir les pertes d'eau qui pourraient induire la lyse cellulaire. Le stress osmotique active l'expression des gènes codant les protéines Pex de carence ainsi que les protéines HSP (Heat shock proteins). Il entraîne une diminution de la réplication de l'ADN, de la croissance cellulaire et de l'assimilation des nutriments (signaux SOS) (H J Chung et al., 2006).

L'autre réponse au stress osmotique est plus longue, activant la transcription et la traduction de nouvelles enzymes, de systèmes de transport et de composés de la paroi cellulaire (Peng et al., 2011) : quand la pression osmotique diminue, les canaux mécanosensitifs localisés au niveau de la membrane cytoplasmique sont activés. Ils permettent le relargage de petites molécules prévenant ainsi la rupture cellulaire due aux flux hydriques. Parmi ces canaux, la protéine TonB est impliquée dans le potentiel électrochimique de la membrane cytoplasmique. Cette protéine permet ainsi un transport actif au travers de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. ExbB et ExbD ont été identifiées comme des protéines auxiliaires de TonB (Ahmer et al., 1995).

Les bactéries à Gram négatif contiennent des protéines porines intégrées dans la membrane externe, qui agissent comme des canaux facilitant la diffusion de petites molécules hydrophiles à l'extérieur de la cellule. Parmi celles-ci la porine ompC, dont les niveaux d'expression augmentent dans des environnements à forte osmolarité, semble être un bon candidat pour l'étude de la réponse au stress osmotique (Csonka, 1989).

Points clés n°4 :

- La pathogénicité permet d'évaluer le type de désordre dû à un pathogène chez un hôte. La virulence permet d'apprécier l'intensité (vitesse, sévérité) des symptômes.
- Les STEC possèdent de nombreux gènes impliqués dans la pathogénicité.
- Les STEC survivent à des pH faibles, leurs permettant de franchir la barrière stomacale
- L'adhésion des STEC aux surfaces épithéliales se fait par l'intermédiaire de fimbriae et de l'intimine (*eae*)
- Les STEC peuvent manipuler les facteurs de l'hôte par injection d'effecteurs intracellulaires via le SSTT. Elles peuvent également impacter la réponse immunitaire de l'hôte.
- La production des toxines Stx est à l'origine des complications des infections à STEC. L'expression de ces toxines est dépendante de la réponse aux stress.
- La résistance à différents stress permet au STEC de survivre et de se multiplier dans des environnements normalement délétères comme certains aliments ainsi que le tractus digestif.

5. Interactions des bactéries pathogènes avec la matrices laitière

Pour coloniser efficacement l'hôte et déclencher une maladie, de nombreux pathogènes intestinaux ont développé des moyens d'adhésion aux cellules et tissus hôtes (Kaper et al., 2004; Ofek et al., 2003). Cette adhésion est essentielle à l'établissement de niches écologiques favorables à la survie du pathogène, lui évitant d'être éliminé par les flux intestinaux de l'hôte. Les organelles les plus couramment impliquées dans l'adhésion et exprimées par de nombreuses bactéries, sont des fimbriae de surface, les lectines et des curli interagissant avec des oligosaccharides et d'autres composants complémentaires présents à la surface des cellules hôtes (Lis and Sharon, 1998).

Depuis plusieurs années, des études ont montré que les produits laitiers sont des aliments exerçant une influence positive sur la santé humaine (Dewettinck et al., 2008; Ebringer et al., 2008; Mills et al., 2011). Parmi ces nombreux effets bénéfiques, les propriétés anti-adhésives des glycoprotéines, des glycolipides et des glucides du lait ont été établies pour plusieurs agents pathogènes intestinaux. Plus précisément, le lait, matière première de la fabrication fromagère, est une matrice complexe riche en matière grasse. Cette matière grasse est retrouvée à 95% sous forme de globule gras délimité par une triple membrane dérivée de la région apicale des cellules mammaires. Cette membrane est riche en glycoconjugués et les structures oligosaccharidiques composant le glycocalyx de ces macromolécules ont motivé plusieurs études relatives à leurs propriétés anti-adhésives contre la colonisation microbienne des cellules hôtes.

Actuellement, peu de travaux de recherche se sont focalisés sur cet aspect des interactions entre EHEC et la matrice des produits laitiers. Par ailleurs, les mécanismes d'exclusions des microorganismes par l'effet de la présence de glycoconjugués n'est pas un mécanisme spécifique, mais plutôt un effet global ne favorisant pas de sélections génétiques

de souches résistantes. L'analyse bibliographique relate donc les interactions entre les bactéries pathogènes majoritairement retrouvées dans les produits laitiers et les glycoconjugués retrouvés dans ces aliments. Elle a fait l'objet d'un article de synthèse soumis dans *Glycobiology*. L'objectif de cet article était de faire un état de l'art des propriétés des glycoconjugués et des oligosaccharides associés à la membrane des globules gras limitant l'adhésion des principales bactéries pathogènes entériques à la surface intestinale. L'intégrité du complexe bactéries/membrane des globules gras au cours de la fabrication de produits laitiers et de la digestion a également été traitée.

5.1. Article scientifique de synthèse n°1 (Soumis dans *Journal of Dairy Science*)

Anti-adhesive properties of bovine oligosaccharides and bovine milk fat globule membrane-associated glycoconjugates against bacterial food enteropathogens—A review

T. DOUËLLOU^{1, 2*}, MC. MONTEL¹, D. THEVENOT SERGENTET^{2, 3}

¹Institut National de Recherche Agronomique, Unité de Recherches Fromagères (URF545), 15000 Aurillac, France

²Université de Lyon, “Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment” Research Group, UMR5557 Ecologie Microbienne Lyon, Université Lyon 1, CNRS, VetAgro Sup, 69280 Marcy-l’Etoile, France

³Université de Lyon, VetAgro Sup—Campus Vétérinaire, Laboratoire d’Etudes des Microorganismes Alimentaires Pathogènes—French National Reference laboratory for *Escherichia coli* including Shiga toxin-producing *E. coli* (NRL-STEC), 69280, Marcy-l’Etoile, France

*Corresponding author: delphine.sergentet@vetagro-sup.fr

KEY WORDS

Bacteria entero-pathogens/Adhesion inhibition/Milk Fat Globules/Glycoconjugates

ABSTRACT

The prevalence of the main raw milk and raw-milk-derived dairy-product enteropathogens (*Campylobacter*, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria* and *Salmonella*) does not fit with the number of epidemiological cases related to ingesting these foodstuffs. Milk fat globule membrane (MFGM)-linked glycoconjugates interact with foodborne enteropathogens to inhibit their adhesion to intestinal cells/tissues. This review looks at the main mechanisms and strategies employed by enteropathogens to adhere to their target, details of the anti-adhesive properties of MFGM against enteropathogens and enterotoxins, assesses the integrity of bacteria/MFGM complexes during dairy product manufacture and digestion, and discusses the potential for using these macromolecules and glycoconjugates in foods for public health.

INTRODUCTION

The main gastrointestinal foodborne bacteria are a major public health concern worldwide due to the incidence of cases in recent years, with numerous cases of people developing infection and intoxication and eventually dying as a result of foodborne outbreaks. Foodborne disease outbreaks cause billions of dollars' worth of damage and food spoilage. Prevalence figures for *Campylobacter*, pathogenic *Escherichia coli*, *Listeria* and *Salmonella* in raw milk and raw-milk-derived dairy products range from 0–40%, 0–33.5% (89.8% in France), 1–60% (45.3% in Spain; Domínguez Rodríguez et al., 1985) and 0–11.8%, respectively, according to method of detection (Kai & Aotearoa, 2009; Lebrero et al., 2015). However, epidemiological studies show that this class of product is only a minor source of enteric human infection (EFSA, 2015). Indeed, only 27 outbreaks related to milk or dairy product consumption were reported in Europe between 2007 and 2012 (EFSA, 2015): 21 related to *Campylobacter* (236 cases between 2007–2008 and 2010–2012), one to *Salmonella* Typhimurium (3 cases in 2010), two to Shiga-toxin producing *E. coli* (31 cases in 2008 and 2012), and three to tick-borne encephalitis virus (TBEV, 34 cases in 2007 and 2010). Interestingly, prevalence data on these enteropathogens in dairy matrices and ingestion-related outbreaks do not fit overall foodborne-related outbreak figures (EFSA, 2015, 2014).

To effectively colonize a host and cause disease, many intestinal bacterial pathogens have evolved mechanisms and strategies for attaching or adhering to host cells and tissues (Kaper et al., 2004; Ofek et al., 2003). Adhesion is required so that the organisms are not swept away by the host's natural self-cleaning mechanisms. The most common means of adhesion, used by numerous bacteria, are surface fimbriae, curli and lectins that interact with complementary carbohydrates and other components present at the host cell surfaces (Boehm & Stahl, 2007; Lis & Sharon, 1998; Rivero-Urgell & Santamaria-Orleans, 2001; Tao et al., 2008). Different studies have singled out glycoconjugates (carbohydrates, called glycocalyx, covalently bound

with macromolecules like proteins or lipids, **Figure 1**) linked to milk fat globule membrane (MFGM; Ghosh & Mehla, 2012; Quintero et al., 2011; Quintero-Villegas et al., 2013; Sprong et al., 2002) as suitable host epithelial cell mimetic receptors. These MFGM-linked glycoconjugates could therefore act as efficient decoys competing with the natural adhesion targets of enteropathogens (Newburg et al., 2005; Y Bao, L Zhu, 2007).

About 95% of bovine milk fat is present as small droplets called milk fat globules (MFG) delimited by the trilayer MFGM. MFG are coated with a complex mixture of glycoconjugates, such as glycoproteins and glycolipids, and enzymes (Gopal and Gill, 2000; Goudedranche et al., 2000; Michalski et al., 2003, **Figure 2**). Glycoconjugate glycocalyxes are oligosaccharides, i.e. carbohydrates with 3 to 10 monosaccharides covalently linked with glycosidic bonds. Nearly 40 bovine milk oligosaccharides have been described (Tao et al., 2008). Milk oligosaccharide monomers include D-glucose (Glc), D-galactose (Gal), N-acetylglucosamine (GlcNAc), L-fucose (Fuc), N-acetylneuraminic acid (NeuAc) and N-glycolylneuraminic acid (NeuGc). Among many other beneficial effects of bovine raw milk, its glycoproteins, glycolipids and milk carbohydrates have anti-adhesive properties against several intestinal pathogens (Dewettinck et al., 2008; Ebringer et al., 2008; Mills et al., 2011).

This review aims to explore the state of knowledge on the anti-adhesive properties of MFGM glycoconjugates and associated oligosaccharides that inhibit bacterial pathogen adhesion to the intestinal epithelial layer. More precisely, we detail the anti-adhesive properties of MFGM against the main enteric bacterial pathogens before going on to assess the integrity of bacteria/MFGM association complexes during dairy product manufacture and digestion. We then conclude by discussing the potential for using these macromolecules and glycoconjugates in foods for public health.

1- Mechanisms and strategies of adhesion of pathogenic bacteria to target cells/tissues

Adhesion is critical to the life of pathogenic enteric bacteria. It enables targeting to a specific surface and, in flow environments, enables bacteria to resist physical detachment by hydrodynamic shear forces (Klemm & Schembri, 2000; Pizarro-Cerdá & Cossart, 2006). Attachment of pathogenic bacteria to host surfaces is a critical step in the pathogenesis of several gastrointestinal tract infections. It also gives the pathogens better access to sources of nutrition, facilitates the delivery of toxic agents into the host tissues and, ultimately, enables the bacteria to penetrate into tissues (Sharon, 2006).

Bacterial attachment may involve specific interactions between specialized proteins and receptors present at the host cell surface (Lis & Sharon, 1998). Enteric pathogenic bacteria use different strategies to bind target host cells or tissues and several means of adhesion, such as capsule, fimbriae, pili and other glycan-binding surface proteins (lectins; Esko & Sharon, 2009; Haiko & Westerlund-Wikström, 2013). As a rule, bacterial adhesins typically target sugar moieties of glycoproteins or glycolipids by a carbohydrate-recognition domain usually located at the terminal end of the tip (Esko and Sharon, 2009; Jaglic et al., 2014). In several cases, the receptor target of bacterial adhesins has a known molecular structure (Klemm & Schembri, 2000; Klemm et al., 2010).

Adhesins are a group of proteins in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) that enable pathogen-to-host attachment or colonization. More precisely, intimin and Tir are involved in the development of attaching and effacing lesion (McWilliams & Torres, 2014). A suite of fimbrial proteins (Lpf1, Lpf2, curli, ECP, F9, ELF, HCP and type-1 fimbria) play a role in EHEC adhesion to abiotic and biological surfaces (Croxen & Finlay, 2010). The capacity of *Listeria monocytogenes* to cause disease is reliant on its ability to survive in the macrophage, invade and replicate on non-phagocytic cells, and cross the intestinal barriers. Internalin (InlA

or InlB) proteins play a role in this invasiveness (Pizarro-Cerda et al., 2012). Finally, unlike *E. coli* or *Salmonella*, *Campylobacter* adhesion is not mediated by fimbria or pili. *Campylobacter* interacts with host cells in a complicated process involving a plethora of bacterial cell surface structures interacting with particular cell receptors. Its attachment may involve glycan–lectin interaction (Rubinchik et al., 2012).

2- Inhibition of pathogenic bacteria adhesion by milk fat globule membranes

Several natural food components have been shown to act as efficient inhibitors of pathogen adherence (Quintero et al., 2011; Quintero-Villegas et al., 2013). It was shown that the recognition of fimbrial end tip protein and the sugar moieties found at host cell surfaces generally have low affinity (Esko & Sharon, 2009). This suggests that the presence of oligosaccharide decoys might compete with natural targets of enteropathogens. Competition for natural binding sites of pathogenic bacteria with mimetic receptors may inhibit pathogen anchoring. Since colonization by pathogens is one of the first steps of host infectivity, milk components may act as protective agents. MFGM surface area depends on MFG size but typically ranges between 5 to 11 m² per 100 g of milk (Michalski et al., 2003; Walstra, 1995), which offers large availability of MFGM-linked glycoconjugates for enteropathogen bacteria.

2.1- MFGM and bacteria association:

Evidence of bacterial association with the MFG phase has been around for decades. Dean et al. (1959) reported that bacteria present a tendency to aggregate at the MFG surface. Laloy et al. (1996) showed that lactic acid bacteria are strongly associated with MFG residues in the cheese matrices and mainly present in the MFGM, principally as ghost cells. Lopez et al. (2006) later observed in Emmental cheese that the bacteria were preferentially localized at the fat/protein interface. An electron microscopy study of pasta filata mozzarella observed aggregations of chains and rods of bacteria in sites originally occupied by MFG and MFGM

residues (Kuo & Gunasekaran, 2009). The authors also confirmed that a majority of bacteria in this cheese was located at the fat/protein interface. Using confocal laser scanning microscopy, Brisson et al. (2010) observed interactions between bacteria and MFGM. Finally, electron micrograph observations by Martinovic et al. (2013) showed that lactococci used as starter in cheese seems to be associated with fat globules.

2.1.1- Oligosaccharides and glycocalix

There is growing evidence that bovine oligosaccharides and MFGM-associated glycoconjugates are not only used as energy source for microbiota but are soluble receptors that mimic epithelial cell surface carbohydrates. These glycoconjugates and associated glycocalyxes act as competitors or interact with natural receptors of these pathogens target cells (Gopal & Gill, 2000). The anti-adhesive properties of MFGM glycoconjugates are essentially dependent on glycocalyx composition and structure.

The majority of bovine milk oligosaccharides are tri- and tetrasaccharides, which appear to be highly polarized as nearly 70% of these carbohydrates contain sialic acid residues in the form of N-acetyl and N-glycolylneuraminic acid (Tao et al., 2008). The fact that sialylated oligosaccharides in bovine milk can inhibit bacterial adherence was first established back in 1993. Virkola et al., (1993) showed that sialylated lactose strongly bound *E. coli* S-fimbria. There is also evidence that sialic acid modulates the *fim* operon expression implicated in the synthesis of type-1 fimbria in several potential pathogens, including *E. coli* (Sohanpal et al., 2004). This operon is also present in pathogenic strains of *Salmonella* and *Klebsiella* but it has still not been determined whether sialic acid is implicated in its regulation (Blomfield, 2015; Klemm and Schembri, 2000; Stahlhut et al., 2009).

Another study showed that sialylated oligosaccharides inhibit *Helicobacter pylori* adhesion to monolayer duodenum-derived cell line HuTu-80 cultures (P. Simon et al., 1997). Similarly,

bovine sialylated oligosaccharides were shown to be effective hemagglutination inhibitors in uropathogenic *E. coli* (UPEC) and enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) strains (Martin-Sosa et al., 2002). Parker et al. (2010) showed that the inhibition of *E. coli* and *Salmonella* serovar Typhimurium adhesion to Caco-2 cells seems to be structure-dependent with sialic acid, L-fucose and D-mannose monosaccharides. Another study demonstrated the impact of bovine colostrum oligosaccharides on the adhesion properties of enteropathogenic *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to HEp-2 cell monolayers cultured *in vitro* (Maldonado-Gomez et al., 2015).

2.1.2- Lipids and glycolipids

Since many bacteria and toxins use glycosphingolipids as binding site to host cells, exogenous milk sphingolipids could also have a protective effect against pathogens by competing for or acting as cellular-like pathogen binding sites (Fantini et al., 1997).

The distribution of polar lipids in the MFGM appears to be heterogeneous (Evers et al., 2008; Lopez et al., 2011). MFGM micro-domain ‘lipid rafts’ are mainly composed of sphingomyelin (Lopez et al., 2011). These lipid rafts originate directly from the apical mammary epithelial cells (Lopez et al., 2011) and may feature cholesterol entrenchment. Sprong et al. (2002, 2001) reported the bactericidal effect of sphingolipids against *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens*. They also demonstrated a decrease in viable *E. coli* and *Salmonella enteritidis* after an *in vitro* treatment with sphingolipid macromolecules. Sánchez-Juanes et al. (2009) demonstrated an *in vivo* impact of glycosphingolipids on the intestinal colonizability of ETEC strains by binding the pathogens.

MFGM can also contain other minor lipids including as ceramides, cerobrosides, gangliosides and cholesterol, which is the major sterol in milk (~95%). The major gangliosides in bovine

milk are GD3 and GM3. Ganglioside-supplemented formula appeared to diminish *E. coli* rate in preterm infants (Rueda et al., 1998) and inhibit the intestinal inflammatory response due to *E. coli* lipopolysaccharides (Park et al., 2007).

Nevertheless, the lipid fraction of the MFGM appeared to play a less important role than the glycoconjugate fraction for anti-adhesive activity against *H. pylori* (Wang et al., 2001).

2.1.3- Proteins and glycoproteins

The ability of bovine MFGM-bound glycoproteins to inhibit pathogen adhesion was only recently confirmed. Bacterial lectin, a bacterial-like fimbria-associated protein, selectively binds to butyrophilin, CD36, MUC1, MUC15 and PAS 6/7. More precisely, bacteria bind to glycoproteins whose glycocalyxes are mainly O-linked and N-linked glycans (Lopez et al., 2010). Mucins are widely shown to demonstrate anti-adhesion activity, and they belong a heavily-glycosylated family of glycoproteins (Kvistgaard et al., 2004; Schroten et al., 1992).

Bovine MFGM and defatted MFGM fractions both inhibited hemagglutination of *H. pylori* at similar concentrations and reduced *H. pylori* binding to HeLa S3 cell monolayers (Wang et al., 2001). Likewise, Sando et al. (2009) showed that purified bovine Muc1 directly bound fluorescently-labeled *Escherichia coli* bioparticles and inhibited their binding to bovine mammary epithelial cells grown *in vitro*. N-acetylglucosamine and N-acetylgalactosamine also significantly inhibited *E. coli* adhesion while galactose, one of the most abundant Muc1 monosaccharides, showed the strongest inhibition against *Salmonella* Typhimurium (Parker et al., 2010). Another study on human milk reported that the mucin fraction of MFGM inhibited S-fimbriated *Escherichia coli* adhesion to buccal epithelial cells (Schroten et al., 1992).

Studies on other components (Struijs et al., 2013) has demonstrated that the Muc1 fraction of MFGM glycoproteins has a strong inhibitory effect against microbiota adhesion to a mucus-enriched agar whereas the PAS 6/7 fraction had only a neutral effect. However, total MFGM

glycoprotein fraction showed a greater anti-adhesion effect than the Muc1 and Muc1/PAS 6/7 fractions. These data suggested that other MFGM-associated components are also implicated in the inhibition of bacterial adhesion, and that these milk components could have a synergistic effect against microbial adhesion (Struijs et al., 2013).

Work led by Wang et al (2001) showed that milk components such as glycomacropeptide and sialyl-lactose presented inhibitory properties against *H. pilory* adhesion to model cell monolayers, even if these components appeared to have a weaker effect than Muc1.

MFG also inhibited the ability of *L. monocytogenes* to adhere to the intestinal layer in rats fed milks containing different MFG concentrations (Sprong et al., 2002, 2001). However, Brisson et al. (2010) showed that cell surface characteristics of *L. reuteri* influence the binding properties of the strains. The more hydrophobic strains are more able to adhere to MFGM. A strong association was found between strain hydrophobicity and presence of extractable cell surface proteins, suggesting that they might play a key role in the binding of these bacteria.

Peterson et al. (1998) suggested that lactalbumin and k-casein-derived glycomacropeptide may inhibit bacterial adhesion to the gastric mucosa. Brück et al. (2006) demonstrated that milk glycomacropeptide and α-lactalbumin effectively inhibit enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), *Salmonella* Typhimurium and *Shigella flexneri* adhesion to CaCo-2 cultures.

The role of xanthine oxidoreductase (XOR) as an antimicrobial agent in the gastrointestinal tract is now well described in the literature. This enzyme acts by producing reactive oxygen species, superoxide and hydrogen peroxide in the gastro-intestinal tract. It can also reduce nitrite to nitric oxide and peroxynitrite, which have strong antimicrobial properties (Harrison, 2006; Martin et al., 2004). XOR is located at the inter-space of the two MFGM membranes.

2.2- MFGM and toxin association

Milk also contains numerous mimetic receptors that help recognize several bacterial toxins such as EHEC Shiga toxins, thermolabile and thermoresistant *Salmonella* toxins or *Vibrio cholerae* enterotoxins (Minke et al., 1999). These receptor-like compete for natural site of host cell action and help protect the organism. The *Vibrio cholerae* enterotoxin is an AB5 toxin that binds specifically to the Gal β 1–3GalNAc moiety of GM1 ganglioside (Minke et al., 1999). Similarly, Shiga toxin synthesized by Shiga-toxin producing *E. coli* binds to the Gal α 1–4Gal moiety on both glycolipids and glycoproteins (Esko & Sharon, 2009). Steil et al. (2015) led a deep structural analysis of the Stx receptor and identified globotriaosylceramide (Gb3Cer) and globotetraosylceramide (Gb4Cer) as the glycosphingolipid receptors for shiga-toxin variants Stx1a, Stx2a and Stx2e strongly associated with HUS. Note too that the authors characterized globopentaosylceramide as a receptor for Stx2e. It is well known that Gb3Cer and Gb4Cer are well represented in MFG. These lipid rafts may play an antagonist role against shiga-toxin receptor recognition.

3- Evolution of MFGM adhesion structure during milk transformation and digestion

3.1- Dairy products manufacturing

Bovine milk is mainly largely transformed into dairy products such as cheese, cream, yoghurt and ice-cream. These various milk treatments can modify the molecules involved in the MFGM–bacteria association. Specifically, milk treatments for processing impact MFG and MFGM integrity in terms of the glycoconjugates and associated oligosaccharides. These treatments include the high-temperature treatment (Kim & Jimenez-Flores, 1995; Sharma and

Dalgleish, 1993) that kills or limits the growth of germs present in raw milk, homogenization, which allows fat dispersion into drinking milk, and enzymatic reactions led by pressure and lactic acid bacteria for cheese making (Lopez, 2005).

Heat treatment (typically pasteurization) of milk is an effective process for inactivating pathogens. MFGM-associated glycoproteins and glycolipids form a lace-like network of glycoconjugate filaments at the MFG oil–water interface. These filaments are lost when milk is heated (Jensen et al., 1992). Thermal treatments of milk thus destroy the carbohydrates located at the MFGM surface, which means fewer carbohydrate-like receptors are available for bacteria, thereby inhibiting anti-adhesive properties of MFGM.

Industrial drinking milks are homogenized to maintain fat dispersion in the aqueous phase of milk. Homogenization partially disrupts the MFGM and leads to the adsorption of milk whey. Moreover, homogenization induces a decrease in MFG diameter (ranging from 0.1 to 0.5 μm ; Lopez, 2005). It also alters MFGM structure and modifies MFGM composition (Keenan et al., 1983; Sharma & Dalgleish, 1993), with the result that coated carbohydrates are less available at the aqueous–fat interface for enteropathogens.

The many varieties of cheeses produced can be collapsed into four categories: soft, semi-soft, semi-hard, and hard. The different processing technologies used in the various cheeses impact the fat structure. Cheese fat can be found as either native MFG surrounded with MFGM, an aggregate of MFG, free fat or fat associated with whey proteins. Interactions between MFG surface and protein matrix affect the structure and texture of dairy products. Interestingly, MFG do not interact with protein but act mainly as fillers (Michalski et al., 2003). These interactions with milk proteins partially destroy the MFGM and thus leave enteric pathogens fewer carbohydrate decoys to target.

All milk treatments destabilize MFGM structure during milk processing. Nonetheless, excluding pasteurization, glycoconjugates may remain intact through to end-consumption of the dairy products. Glycoconjugates are the main set of key macromolecules involved in the anti-adhesive properties of milk against enteropathogens.

3.2 - Digestion of MFGM

MFGM digestion takes place in the stomach and three segments of the human small intestine, i.e. duodenum, jejunum, and ileum and colon. During digestion, gastric pH, gastrointestinal secretions and peristalsis are key factors controlling the outcome of foodborne pathogens. Moreover, physical–chemical conditions and microbial content of the gastrointestinal tract both alter MFGM structure, leading to a release of MFGM glycoconjugates and digestion of the fat, proteins and sugars. Here, we explore whether MFGM still have effective anti-adhesive properties after passage through the human gastrointestinal tract.

The diversity and complexity of arrangements of the saccharidic monomers composing milk oligosaccharide glycoconjugates act as a layer of protection against digestive enzymes and hydrolysis by pepsin. Moreover, carbohydrates enable the pepsin enzyme to confer protective effects to the macromolecule core when associated as glycoproteins and/or glycolipids. Nevertheless, the hydrolase resistance of milk oligosaccharides appears to be dependent on degree of glycosylation. Experiments by Kobylka & Carraway (1972) and Shimizu et al., (1979) have demonstrated that Muc1 (heavily-glycosylated) was highly resistant to the action of pepsin whereas CD36 and PAS 6/7 (less glycosylated) were less resistant. Brück et al., (2006) showed that digestion of milk α -lactalbumin and glycomacropeptide by pepsin and/or pancreatin did not affect their anti-adhesion properties against EPEC, *Salmonella* Typhimurium and *Shigella flexneri* strains. Le et al. (2012) showed that integrity of Muc1, as well as a minor share of PAS III and a major share of CD36, were maintained

after treatment with pepsin and a combination of trypsin and α -chymotrypsin. The integrity of these glycoproteins was maintained according to their degree of glycosylation. Milk oligosaccharides are thus neither digested nor absorbed in the human upper intestinal tract but remain structurally and functionally intact during digestion (Gallier et al., 2012) and at delivery into the colon, where they can serve as nutrients for colonic microflora (Albrecht et al., 2011; Chaturvedi et al., 2001; Coppa et al., 2001; Sabharwal et al., 1991). Note that no study yet has set out to determine the digestibility of lectin-associated oligosaccharides. Rudolff et al. (2012) showed that nearly 1% of non-degraded oligosaccharides in maternal milk reappear in urine of preterm breastfeed infants. This suggests that milk oligosaccharides are able to translocate through the gut epithelial barrier into the blood circulation. Gallier et al., (2012) suggest that lipid rafts at the MFGM surface could be also implicated in MFG protection from lipolysis, as they represent a preferential site of action for pancreatic lipase-colipase complex in presence of bile salts.

While the digestion of MFG and MFGM impacts their structural integrity, glycoconjugates appears to be intact in the colon. Nevertheless, the anti-adhesive properties of these molecules against enteropathogens have yet to be established *in vivo*.

CONCLUSION

The enteropathogens prevalence–human cases paradigm could be explained by interactions between the main means/mechanisms of bacterial adhesion and free or conjugated carbohydrates. Infections rely on bacterial attachment to intestinal epithelial cells. This review shows that raw milk-derived carbohydrates and glycoconjugates could be considered as diet components that limit the adhesion of enteric pathogenic bacteria to human gut (**Figure 3**).

More generally, prevention of bacterial adhesion is now regarded as a promising strategy for reducing infectious disease without the need for antibiotics. Several specific approaches have

been investigated, including adhesion inhibition with receptor analogs or stoichiometric obstruction (Bouckaert et al., 2005). Natural receptor analogs able to inhibit pathogen adhesion to enterocytes in human gastrointestinal gut (by receptor analog or stoichiometric obstruction) are essential for human health. Blocking or inhibiting pathogens–host-cell interactions by suitable carbohydrates or their analogs (synthetic glycoclusters) for the prevention and treatment of microbial diseases is the premise behind engineered “anti-adhesion therapies” against some of these pathogens (Kelly & Younson, 2000; Ofek et al., 2003; Zopf, 1997). The potential uses of MFGM components could potentially serve as a way to investigate diet-mediated prophylaxis against gastro-intestinal tract pathogens. Development of a safe drug against enteric bacterial infection is therefore urgently required for public health and societal welfare. MFGM components make ideal candidates for anti-adhesion therapy as they are unlikely to be toxic or immunogenic. Moreover, as anti-adhesive agents do not act by killing or arresting the growth of the pathogens, it is very likely that anti-adhesive agent-resistant strains would emerge at a far slower rate than antibiotic-resistant strains.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Auvergne regional council, DRAAF Auvergne and French Ministry for Agriculture Directorate for Food Safety (DGAL) for funding this research. We apologize to any authors we were unable to cite due to lack of space.

BIBLIOGRAPHY

- Albrecht, S., Schols, H.A., van den Heuvel, E.G.H.M., Voragen, A.G.J., Gruppen, H., 2011. Occurrence of oligosaccharides in feces of breast-fed babies in their first six months of life and the corresponding breast milk. *Carbohydr. Res.* 346, 2540–50. doi:10.1016/j.carres.2011.08.009
- Blomfield, I.C., 2015. Sialic acid and N-acetylglucosamine Regulate type 1 Fimbriae Synthesis. *Microbiol. Spectr.* 3. doi:10.1128/microbiolspec.MBP-0015-2014
- Boehm, G., Stahl, B., 2007. Oligosaccharides from Milk. *J. Nutr.* 137, 847S–849.

Bouckaert, J., Berglund, J., Schembri, M., De Genst, E., Cools, L., Wuhler, M., Hung, C.S., Pinkner, J., Slättegård, R., Zavialov, A., Choudhury, D., Langermann, S., Hultgren, S.J., Wyns, L., Klemm, P., Oscarson, S., Knight, S.D., De Greve, H., 2005. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* FimH adhesin. *Mol. Microbiol.* 55, 441–455. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04415.x

Brisson, G., Payken, H.F., Sharpe, J.P., Jiménez-Flores, R., 2010. Characterization of *Lactobacillus reuteri* interaction with milk fat globule membrane components in dairy products. *J. Agric. Food Chem.* 58, 5612–9. doi:10.1021/jf904381s

Brück, W.M., Kelleher, S.L., Gibson, G.R., Graverholt, G., Lönnerdal, B.L., 2006. The effects of alpha-lactalbumin and glycomacropeptide on the association of CaCo-2 cells by enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*. *FEMS Microbiol. Lett.* 259, 158–62. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00268.x

Chaturvedi, P., Warren, C.D., Buescher, C.R., Pickering, L.K., Newburg, D.S., 2001. Survival of human milk oligosaccharides in the intestine of infants. *Adv. Exp. Med. Biol.* 501, 315–23.

Coppa, G. V., Pierani, P., Zampini, L., Bruni, S., Carloni, I., Gabrielli, O., 2001. Characterization of oligosaccharides in milk and feces of breast-fed infants by high-performance anion-exchange chromatography. *Adv. Exp. Med. Biol.* 501, 307–14.

Croxen, M.A., Finlay, B.B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 26–38. doi:10.1038/nrmicro2265

Dean, M.R., Berridge, N.J., Mabbitt, L.A., 1959. Microscopical observations on Cheddar cheese and curd. *J. Dairy Res.* 26, 77. doi:10.1017/S0022029900009705

Deeth, H.C., 1997. The role of phospholipids in the stability of milk fat globules. *Aust. J. dairy Technol.* 52, 44–46.

Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T.T., Messens, K., Van Camp, J., 2008. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int. Dairy J.* 18, 436–457. doi:10.1016/j.idairyj.2007.10.014

Domínguez Rodríguez, L., Fernández Garayzabal, J.F., Vazquez Boland, J.A., Rodríguez Ferri, E., Suarez Fernández, G., 1985. Isolation de micro-organismes du genre *Listeria* à partir de lait cru destiné à la consommation humaine. *Can. J. Microbiol.*

Ebringer, L., Ferencík, M., Krajcovic, J., 2008. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products--review. *Folia Microbiol. (Praha).* 53, 378–94. doi:10.1007/s12223-008-0059-1

EFSA, 2015. Scientific Opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA J.* 13, 3940–4035. doi:10.2903/j.efsa.2015.3940

EFSA, 2014. Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA J.* 9, 1–378. doi:10.2903/j.efsa.2014.3547

Esko, J.D., Sharon, N., 2009. Microbial Lectins: Hemagglutinins, Adhesins, and Toxins.

Evers, J.M., Haverkamp, R.G., Holroyd, S.E., Jameson, G.B., Mackenzie, D.D.S., McCarthy, O.J., 2008. Heterogeneity of milk fat globule membrane structure and composition as observed using fluorescence microscopy techniques. *Int. Dairy J.* 18, 1081–1089. doi:10.1016/j.idairyj.2008.06.001

Fantini, J., Hammache, D., Delezay, O., Yahi, N., Andre-Barres, C., Rico-Lattes, I., Lattes, A., 1997. Synthetic Soluble Analogs of Galactosylceramide (GalCer) Bind to the V3 Domain of HIV-1 gp120 and Inhibit HIV-1-induced Fusion and Entry. *J. Biol. Chem.* 272, 7245–7252. doi:10.1074/jbc.272.11.7245

Gallier, S., Ye, a, Singh, H., 2012. Structural changes of bovine milk fat globules during in vitro digestion. *J. Dairy Sci.* 95, 3579–92. doi:10.3168/jds.2011-5223

Ghosh, S., Mehla, R.K., 2012. Influence of dietary supplementation of prebiotics (mannanooligosaccharide) on the performance of crossbred calves. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 617–22. doi:10.1007/s11250-011-9944-8

- Gopal, P.K., Gill, H.S., 2000. Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *Br. J. Nutr.* 84 Suppl 1, 69–74.
- Goudedranche, H., Fauquant, J., Maubois, J.-L., 2000. Fractionation of globular milk fat by membrane microfiltration. *Lait* 80, 93–98.
- Haiko, J., Westerlund-Wikström, B., 2013. The Role of the Bacterial Flagellum in Adhesion and Virulence. *Biology (Basel)*. 2, 1242–1267. doi:10.3390/biology2041242
- Harrison, R., 2006. Milk xanthine oxidase: Properties and physiological roles. *Int. Dairy J.* 16, 546–554. doi:10.1016/j.idairyj.2005.08.016
- Jaglic, Z., Desvaux, M., Weiss, A., Nesse, L.L., Meyer, R.L., Demnerova, K., Schmidt, H., Giaouris, E., Sipailiene, A., Teixeira, P., Kačániová, M., Riedel, C.U., Knöchel, S., 2014. Surface adhesins and exopolymers of selected foodborne pathogens. *Microbiology* 160, 2561–82. doi:10.1099/mic.0.075887-0
- Jensen, R.G., Ferris, A.M., Lammi-keefe, C.J., 1992. Lipids in Human Milk and Infant Formulas. *Annu. Rev. Nutr.* 12, 417–441.
- Kai, T.M.K., Aotearoa, A., 2009. Microbiological Risk Assessment of Raw Cow Milk. *FSANZ*.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–40. doi:10.1038/nrmicro818
- Keenan, T.W., Dylewski, D.P., Woodford, T.A., Ford, R.H., 1983. Origin of milk fat globules and the nature of the milk fat globule membrane., in: *Developments in Dairy Chemistry—2*. pp. 83–118.
- Kelly, C.G., YOUNSON, J.S., 2000. Anti-adhesive strategies in the prevention of infectious disease at mucosal surfaces. *Expert Opin. Investig. Drugs* 9, 1711–21. doi:10.1517/13543784.9.8.1711
- Kim, H.H., Jimenez-Flores, R., 1995. Heat-induced interactions between the proteins of milk fat globule membrane and skim milk. *J. Dairy Sci.* 78, 24–35. doi:10.3168/jds.S0022-0302(95)76612-7
- Klemm, P., Schembri, M.A., 2000. Bacterial adhesins: function and structure. *Int. J. Med. Microbiol.* 290, 27–35. doi:10.1016/S1438-4221(00)80102-2
- Klemm, P., Vejborg, R.M., Hancock, V., 2010. Prevention of bacterial adhesion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 451–459. doi:10.1007/s00253-010-2805-y
- Kobylka, D., Carraway, K.L., 1972. Proteins and glycoproteins of the milk fat globule membrane. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 288, 282–295. doi:10.1016/0005-2736(72)90249-0
- Kuo, M.-I., Gunasekaran, S., 2009. Effect of freezing and frozen storage on microstructure of Mozzarella and pizza cheeses. *LWT - Food Sci. Technol.* 42, 9–16. doi:10.1016/j.lwt.2008.07.003
- Kvistgaard, A.S., Pallesen, L.T., Arias, C.F., López, S., Petersen, T.E., Heegaard, C.W., Rasmussen, J.T., 2004. Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections. *J. Dairy Sci.* 87, 4088–96. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73551-1
- Laloy, E., Vuilleumard, J., Sodab, M. El, Simard, R.E., 1996. Influence of the Fat Content of Cheddar Cheese on Retention and Localization of Starters 6, 729–740.
- Le, T.T., Van de Wiele, T., Do, T.N.H., Debyser, G., Struijs, K., Devreese, B., Dewettinck, K., Van Camp, J., 2012. Stability of milk fat globule membrane proteins toward human enzymatic gastrointestinal digestion. *J. Dairy Sci.* 95, 2307–18. doi:10.3168/jds.2011-4947
- Lebrero, E.A., Moreno, P.C., Arnau, S.G., Ros, G., Secretary, T., Arnau, S.G., 2015. Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Consumer Affairs , Food Safety and Nutrition (AECOSAN) on the microbiological risks associated with the consumption of raw milk and raw milk-based products. *Rev. del Com. Científico la AECOSAN* 3, 45–78.
- Lis, H., Sharon, N., 1998. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.* 98, 637–674. doi:10.1021/cr940413g
- Lopez, C., 2005. Focus on the supramolecular structure of milk fat in dairy products. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 497–511. doi:10.1051/rnd:2005034

Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., Beaucher, E., Rousseau, F., Fauquant, J., Leconte, N., Robert, B., 2011. Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. *Food Chem.* 125, 355–368. doi:10.1016/j.foodchem.2010.09.005

Lopez, C., Madec, M.-N., Jimenez-Flores, R., 2010. Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. *Food Chem.* 120, 22–33. doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.065

Lopez, C., Maillard, M.-B., Briard-Bion, V., Camier, B., Hannon, J. a, 2006. Lipolysis during ripening of Emmental cheese considering organization of fat and preferential localization of bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5855–67. doi:10.1021/jf060214l

Maldonado-Gomez, M.X., Lee, H., Barile, D., Lu, M., Hutkins, R.W., 2015. Adherence inhibition of enteric pathogens to epithelial cells by bovine colostrum fractions. *Int. Dairy J.* 40, 24–32. doi:10.1016/j.idairyj.2014.08.014

Martin, H.M., Hancock, J.T., Salisbury, V., Harrison, R., 2004. Role of Xanthine Oxidoreductase as an Antimicrobial Agent MINIREVIEW Role of Xanthine Oxidoreductase as an Antimicrobial Agent 72. doi:10.1128/IAI.72.9.4933

Martinovic, A., Moe, K.M., Romeih, E., Aideh, B., Vogensen, F.K., Østlie, H., Skeie, S., 2013. Growth of adjunct *Lactobacillus casei* in Cheddar cheese differing in milk fat globule membrane components. *Int. Dairy J.* 31, 70–82. doi:10.1016/j.idairyj.2013.02.009

Martin-Sosa, S., Martin, M.-J., Hueso, P., 2002. The Sialylated Fraction of Milk Oligosaccharides Is Partially Responsible for Binding to Enterotoxigenic and Uropathogenic *Escherichia coli* Human Strains. *J. Nutr.* 132, 3067–3072.

Mather, I.H., 2000. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *J. Dairy Sci.* 83, 203–47. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74870-3

McWilliams, B.D., Torres, A.G., 2014. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Adhesins. *Microbiol. Spectr.* 2, EHEC00032013. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0003-2013

Michalski, M.-C., Gassi, J.-Y., Famelart, M.-H., Leconte, N., Camier, B., Michel, F., Briard, V., 2003. The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties of Camembert cheese. *Lait* 83, 131–143. doi:10.1051/lait:2003003

Mills, S., Ross, R.P., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., 2011. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int. Dairy J.* 21, 377–401. doi:10.1016/j.idairyj.2010.12.011

Minke, W.E., Roach, C., Hol, W.G., Verlinde, C.L., 1999. Structure-based exploration of the ganglioside GM1 binding sites of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin for the discovery of receptor antagonists. *Biochemistry* 38, 5684–92. doi:10.1021/bi982649a

Newburg, D.S., Ruiz-Palacios, G.M., Morrow, A.L., 2005. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 37–58. doi:10.1146/annurev.nutr.25.050304.092553

Ofek, I., Hasty, D.L., Sharon, N., 2003. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38, 181–191. doi:10.1016/S0928-8244(03)00228-1

Park, E.J., Suh, M., Thomson, B., Ma, D.W.L., Ramanujam, K., Thomson, A.B.R., Clandinin, M.T., 2007. Dietary Ganglioside Inhibits Acute Inflammatory Signals in Intestinal Mucosa and Blood Induced By Systemic Inflammation of *Escherichia Coli* Lipopolysaccharide. *Shock* 28, 112–117. doi:10.1097/SHK.0b013e3180310fec

Parker, P., Sando, L., Pearson, R., Kongsuwan, K., Tellam, R.L., Smith, S., 2010. Bovine Muc1 inhibits binding of enteric bacteria to Caco-2 cells. *Glycoconj. J.* 27, 89–97. doi:10.1007/s10719-009-9269-2

- Peterson, J.A., Patton, S., Hamosh, M., 1998. Glycoproteins of the Human Milk Fat Globule in the Protection of the Breast-Fed Infant against Infections. *Biol. Neonate* 74, 143–162. doi:10.1159/000014020
- Pizarro-Cerdá, J., Cossart, P., 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124, 715–27. doi:10.1016/j.cell.2006.02.012
- Pizarro-Cerda, J., Kuhbacher, A., Cossart, P., 2012. Entry of *Listeria monocytogenes* in Mammalian Epithelial Cells: An Updated View. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a010009–a010009. doi:10.1101/cshperspect.a010009
- Quintero, M., Maldonado, M., Perez-Munoz, M., Jimenez, R., Fangman, T., Rupnow, J., Wittke, A., Russell, M., Hutkins, R., 2011. Adherence inhibition of *Cronobacter sakazakii* to intestinal epithelial cells by prebiotic oligosaccharides. *Curr. Microbiol.* 62, 1448–1454. doi:10.1007/s00284-011-9882-8
- Quintero-Villegas, M.I., Aam, B.B., Rupnow, J., Sørli, M., Eijsink, V.G.H., Hutkins, R.W., 2013. Adherence inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by chitoooligosaccharides with specific degrees of acetylation and polymerization. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2748–54. doi:10.1021/jf400103g
- Riccio, P., 2004. The proteins of the milk fat globule membrane in the balance. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 458–461. doi:10.1016/j.tifs.2003.12.005
- Rivero-Urgell, M., Santamaria-Orleans, A., 2001. Oligosaccharides: application in infant food. *Early Hum. Dev.* 65, S43–S52. doi:10.1016/S0378-3782(01)00202-X
- Rubinchik, S., Seddon, A., Karlyshev, A. V., 2012. Molecular mechanisms and biological role of *Campylobacter jejuni* attachment to host cells. *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp).* 2, 32–40. doi:10.1556/EuJMI.2.2012.1.6
- Rudolff, S., Pohlentz, G., Borsh, C., Lentze, M.J., Kunz, C., 2012. Urinary excretion of in vivo ¹³C-labelled milk oligosaccharides in breastfed infants. *Br. J. Nutr.* 107, 957–63. doi:10.1017/S0007114511004016
- Rueda, R., Sabatel, J.L., Maldonado, J., Molina-Font, J.A., Gil, A., 1998. Addition of gangliosides to an adapted milk formula modifies levels of fecal *Escherichia coli* in preterm newborn infants. *J. Pediatr.* 133, 90–94. doi:10.1016/S0022-3476(98)70184-2
- Sabharwal, H., Sjoblad, S., Lunblad, A., 1991. Affinity chromatographic identification and quantitation of blood group A-active oligosaccharides in human milk and feces of breast-fed infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 12, 474–479.
- Sánchez-Juanes, F., Alonso, J.M., Zancada, L., Hueso, P., 2009. Glycosphingolipids from bovine milk and milk fat globule membranes: a comparative study. Adhesion to enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Biol. Chem.* 390, 31–40. doi:10.1515/BC.2009.003
- Sando, L., Pearson, R., Gray, C., Parker, P., Hawken, R., Thomson, P.C., Meadows, J.R.S., Kongsuwan, K., Smith, S., Tellam, R.L., 2009. Bovine Muc1 is a highly polymorphic gene encoding an extensively glycosylated mucin that binds bacteria. *J. Dairy Sci.* 92, 5276–91. doi:10.3168/jds.2009-2216
- Schroten, H., Hanisch, F.G., Plogmann, R., Hacker, J., Uhlenbruck, G., Nobis-bosch, R., Wahn, V., 1992. Inhibition of adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to bucal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: function of mucins in the nonimmunoglobulin fraction. *Infect. Immun.* 60, 2893–2899.
- Sharma, S.K., Dalglish, D.G., 1993. Interactions between milk serum proteins and synthetic fat globule membrane during heating of homogenized whole milk. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1407–1412.
- Sharon, N., 2006. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 527–37. doi:10.1016/j.bbagen.2005.12.008
- Shimizu, M., Yamauchi, K., Kanno, C., 1979. Proteolytic digestion of milk fat globule membrane proteins. *Milchwissenschaft* 34, 666–668.

Simon, P., Goode, P., Mobasser, A., Zopf, D., 1997. Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. *Infect. Immun.* 65, 750–757.

Simon, P.M., Goode, P.L., Mobasser, A., Zopf, D., 1997. Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. *Infect. Immun.* 65, 750–757.

Sohanpal, B.K., El-Labany, S., Lahooti, M., Plumbridge, J.A., Blomfield, I.C., 2004. Integrated regulatory responses of *fimB* to N-acetylneuraminic (sialic) acid and GlcNAc in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16322–7. doi:10.1073/pnas.0405821101

Sprong, R., Hulstein, M.F., van der Meer, R., 2002. Bovine milk fat components inhibit food-borne pathogens. *Int. Dairy J.* 12, 209–215. doi:10.1016/S0958-6946(01)00139-X

Sprong, R.C., Hulstein, M.F., Van der Meer, R., 2001. Bactericidal activities of milk lipids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1298–301. doi:10.1128/AAC.45.4.1298-1301.2001

Stahlhut, S.G., Chattopadhyay, S., Struve, C., Weissman, S.J., Aprikian, P., Libby, S.J., Fang, F.C., Krogfelt, K.A., Sokurenko, E. V., 2009. Population Variability of the FimH Type 1 Fimbrial Adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 191, 1941–1950. doi:10.1128/JB.00601-08

Steil, D., Schepers, C.-L., Pohlentz, G., Legros, N., Runde, J., Humpf, H.-U., Karch, H., Muthing, J., 2015. Shiga toxin glycosphingolipid receptors of Vero-B4 kidney epithelial cells and their membrane microdomain lipid environment. *J. Lipid Res.* 56, 2322–36. doi:10.1194/jlr.M063040

Struijs, K., Van de Wiele, T., Le, T.T., Debyser, G., Dewettinck, K., Devreese, B., Van Camp, J., 2013. Milk fat globule membrane glycoproteins prevent adhesion of the còlonic microbiota and result in increased bacterial butyrate production. *Int. Dairy J.* 32, 99–109. doi:10.1016/j.idairyj.2013.05.001

Tao, N., DePeters, E.J., Freeman, S., German, J.B., Grimm, R., Lebrilla, C.B., 2008. Bovine milk glycome. *J. Dairy Sci.* 91, 3768–3778. doi:10.3168/jds.2008-1305

Virkola, R., Parkkinen, J., Hacker, J., Korhonen, T.K., 1993. Sialyloligosaccharide chains of laminin as an extracellular matrix target for S fimbriae of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 61, 4480–4484.

Walstra, P., 1995. Physical chemistry of milk fat globules. *Adv. dairy Chem.* 2, 131–178.

Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J., 2005. *Dairy Science and Technology*, Second Edition. CRC Press Taylor & Francis Group, LLC.

Wang, X., Hirno, S., Wille, R., 2001. Inhibition of *Helicobacter pylori* infection by bovine milk glycoconjugates in a BALB / cA mouse model. *Society* 50, 430–435.

Y Bao, L Zhu, D.N., 2007. Simultaneous quantification of sialyloligosaccharides from human milk by capillary electrophoresis. *Anal Biochem.* 370, 206–214. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Schematic representation of MFGM-associated glycoconjugates. Not to scale.

Figure 2: Composition of MFGM adapted from Dewettinck et al. (2008): Milk fat globules are coated with proteins (glycoproteins and enzymes), lipids (phospholipids, cholesterol) and oligosaccharides (Gopal & Gill, 2000; Goudedranche et al., 2000; Michalski et al., 2003). Proteins and glycoproteins represent 25–70% of MFGM mass but account for only 1–2% of total milk protein. These membrane proteins are present in low proportions in the aqueous phase of milk (Deeth, 1997; Dewettinck et al., 2008; Riccio, 2004; Walstra et al., 2005). 7–8 major proteins were identified and characterized by SDS-PAGE: mucin 1 (MUC1), xanthine dehydrogenase/oxidase (XDH/XO), CD36, PAS 6 and PAS7, adidophilin (ADPH) and butyrophilin (BTN). Many of these proteins present at the aqueous-phase MFGM are heavily glycosylated (Dewettinck et al., 2008; Mather, 2000). Not to scale.

Figure 3: Schematic representation of the impact of MFG/MFGM on bacterial adhesion to intestinal tissues. A: Bacteria are trapped at the MFGM/aqueous interface leading them to get eliminated from the host organism. B: Partially disrupted MFGM lead to dissemination of glycoproteins in the luminal part of the intestine. Bacteria use them as receptor-like molecules competing with natural receptors. C: Few bacteria remain free of glycoconjugates and therefore become swept away from the gastrointestinal tract. D: Bacteria adhered to intestinal tissues, leading them to disseminate and establish effective niches. Red bacteria: representation of pathogenic bacteria. Green bacteria: representation of natural microbiota. Not to scale.

FIGURES

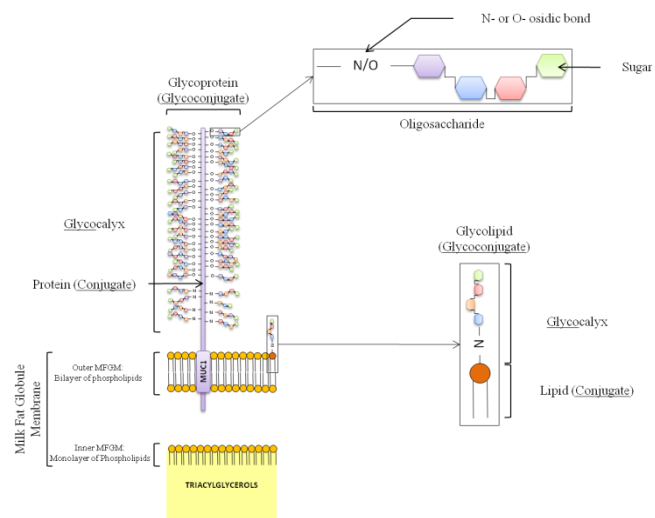


Figure 1

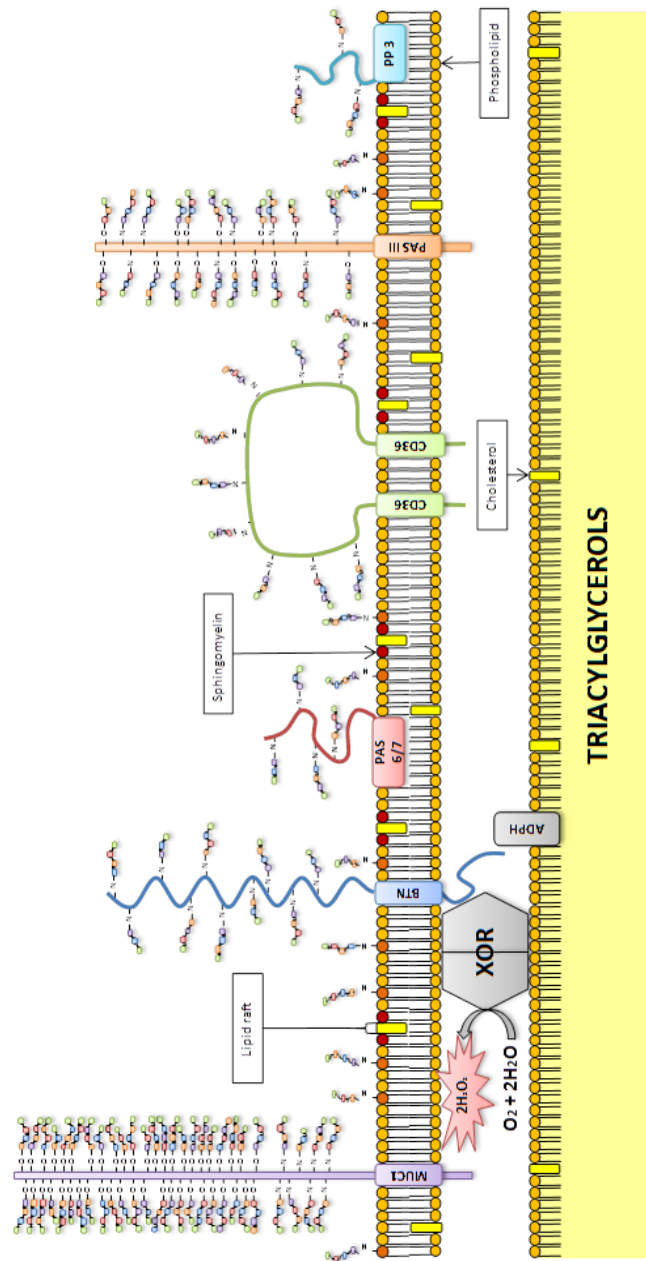


Figure 2

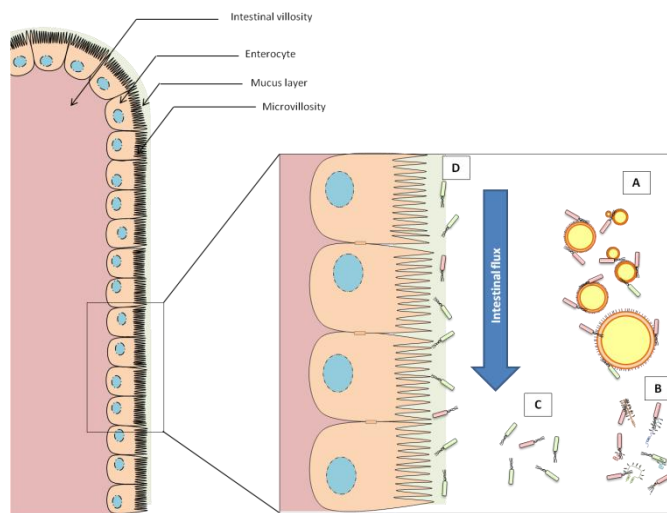


Figure 3

QUESTIONS ET HYPOTHESES DE TRAVAIL

Les STEC sont des pathogènes intestinaux potentiels, responsables de toxi-infections de grande envergure, incriminant la plupart du temps des aliments dérivés des ruminants. L'objectif global des travaux de recherche présentés dans l'étude expérimentale est d'étudier la pathogénicité des STEC isolés de produits au lait cru. Deux axes d'étude ont été privilégiés.

- Une approche génomique visant à déterminer si les STEC isolés de produits au lait cru présentent une grande biodiversité et possèdent certains des facteurs génétiques impliqués dans le déclenchement des pathologies à EHEC chez l'homme.
- Une étude des interactions STEC-matrice cherchant à définir si certains composants de la matrice laitière (e.g. glycoconjugués) induisent une diminution des capacités infectieuses des STEC à la barrière intestinale.

Initialement, un troisième objectif de cette thèse était de définir si une adaptation aux stress rencontrés dans les fromages était développée par les EHEC. Nous voulions également évaluer l'impact de ces stress sur l'expression des gènes de virulence. Au cours de ce travail de thèse, nous avons mis au point les amorces de RT-qPCR permettant le suivi d'expression de 58 gènes impliqués dans la réponse aux stress acide, thermique, oxydatif et osmotique chez les EHEC. Nous avons également mis au point des protocoles d'application *in vitro* de stress thermique et acide retrouvés dans des technologies de fabrication fromagère. Néanmoins les expérimentations sur les stress étant encore en cours, nous avons choisi de ne pas les présenter dans ce manuscrit.

ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 2. VARIABILITE GENETIQUE DES STEC ISOLEES DE PRODUITS LAITIERS

Une approche génomique, qui avait pour objectif de déterminer si les STEC isolés de produits au lait cru présentent une grande diversité génétique et possèdent certains des facteurs génétiques impliqués dans le déclenchement des pathologies à EHEC chez l'homme, a été développée dans ce premier chapitre. Les résultats ont été valorisés par la rédaction de deux articles dont un accepté dans *International Journal of Food Microbiology* et le deuxième soumis dans *Food microbiology*.

1. Etude de la biodiversité génétique des STEC isolés de produits laitiers

1.1. Introduction

La prévalence des STEC dans le lait cru, comprise entre 0% et 13.6%, est stable depuis une dizaine d'année (Farrokh et al., 2013). En France, les données issues du plan de surveillance 2009 relatives à la prévalence des STEC dans les aliments a montré des prévalences de 0,3% dans la viande hachée de boeuf et de 0,9% dans des fromages au lait cru (Loukiadis et al., 2012). Par ailleurs, des études montrent que la dose infectieuse des STEC peut être atteinte dans les fromages au lait cru expérimentalement contaminés par des STEC, même si le taux de contamination initial est bas (Nataro & Kaper, 1998 ; Mischczycha et al., 2013). Néanmoins, en France, en dépit de l'importante consommation des fromages au lait cru (2,8 kg/an/habitant; CNIEL, 2014), les épidémies pointant du doigt la consommation de

produits laitiers contaminés par des STEC sont rares (Espíe et al., 2006, 2008; Loukiadis et al., 2012).

Des analyses de typage par PFGE de souches de STEC appartenant ou non au séro groupe O157, et isolées d'humains, d'animaux et d'aliments ont montré une importante diversité génétique (indice de Simpson compris entre 0,97 et 1) (Hunter & Gaston, 1988; Ribot et al., 2006; Izumiya et al., 2010; Jenke et al., 2011; Verstraete et al., 2013). Cependant, il existe peu de données sur la diversité génétique des STEC isolés de produits laitiers.

Les souches de STEC pathogènes possèdent le plus souvent le gène *eae* codant pour l'intimine qui joue un rôle essentiel dans le développement de lésions d'attachement et d'effacement (Beebakhee et al., 1992). Les souches STEC peuvent également produire deux types de Shiga toxines (Stx1 and Stx2) (Watanabe et al., 1999) et peuvent posséder différents autres facteurs de virulence impliqués dans la pathogénicité et la colonisation du tractus gastro intestinal (Bardiau et al., 2009; Coombes, 2009; Coombes et al., 2008). Il n'en demeure pas moins qu'à ce jour, tous les facteurs de virulence et les mécanismes impliqués dans la pathogénicité des STEC ne sont pas encore connus. Par ailleurs, des différences de facteurs de virulence des souches STEC isolées de produits laitiers pourraient en partie expliquer cette faible implication dans des cas d'infections humaines.

Les objectifs de ces travaux étaient d'évaluer la diversité génétique de souches STEC isolées de produits laitiers, de viande, d'environnement de ferme laitière et de cas d'infections humaines. Ainsi, une collection a été typée par macrorestriction d'ADN génomique associée à la migration des fragments générés. Les profils des gènes de virulence des souches ont également été analysés.

1.2. Matériels et Méthodes

1.2.1. Souches de STEC utilisées

Une collection de souches de STEC issues de l'environnement de ferme laitière, de produits laitiers, de fromages et de cas humains a été sélectionnée selon différents critères: présence de facteurs de virulence (gènes *eae* et *stx*), origine, sérotype. Ces souches appartiennent aux sérotypes les plus incriminés dans les épidémies à STEC (O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28).

Pour le premier article, 197 souches de STEC et de AEEC (« *Attaching and Effacing E. coli* » ; *E. coli* possédant le gène *eae* mais aucun des gènes *stx*) appartenant aux 5 sérotypes et provenant des différentes origines décrites ci-dessus ont été typées. Cinquante huit souches, uniquement isolées de produits laitiers et appartenant aux sérogroupes O157, O26 et O103, ont été étudiées dans le deuxième article.

1.2.2. Identification du profil génétique par la méthode PFGE

La diversité génétique des STEC isolés d'environnement divers (cas humain, aliment, environnement de ferme, bovin, ...) est le plus souvent étudiée par des méthodes moléculaires de macro-restriction de l'ADN génomique total, par des enzymes de restriction à sites de coupures rares, révélée par électrophorèse en champ pulsé (PFGE, Izumiya et al., 2010). Nous avons choisi d'utiliser la PFGE car à ce jour elle reste la méthode de référence la plus discriminante pour les STEC (Ribot et al., 2006). Dans le premier article, la diversité génétique a ensuite été quantifiée par l'indice de diversité génétique D de Simpson (Hunter and Gaston, 1988). Cet indice prend en compte le nombre de souches présentant un profil

génétique identique parmi le nombre de souches étudiées. Il est compris entre 0 (faible diversité) et 1 (forte diversité) (Krause et al., 1996; Rios et al., 1999; Verstraete et al., 2013). Dans le deuxième article, les analyses de profils de macrorestriction ont permis d'identifier les relations de clonalité entre les souches.

1.2.3. Identification des profils de virulence par rt-qPCR

Des profils de gènes de virulence des souches de STEC ont été déterminés par qPCR en temps réel à haut débit.

Les gènes recherchés étaient associés aux O-Island (OI) 44, OI-48, OI -50, OI-57, OI-71 et OI-122. Ils sont impliqués dans des fonctions d'adhésion, de détournement du système immunitaire, de manipulation des effecteurs des cellules hôtes, de synthèse de toxines et des gènes décrits comme associés à des profils de souches impliquées dans le déclenchement des pathologies à EHEC (Bugarel et al., 2010; Coombes et al., 2008; Delannoy et al., 2013b) (**Tableau 10**).

Dans le premier article, les fréquences des gènes de virulence des souches isolées de produits laitiers, basées sur la présence de 49 gènes dont 23 impliqués dans la pathogénicité des souches selon Delannoy et al. (2013), ont été comparées avec des fréquences à celles de souches isolées de cas humains (vrais EHEC).

Dans le deuxième article, les fréquences d'association des gènes *espK* avec les gènes *ureD*, *espV* ou Z2098 ainsi que la présence d'autres marqueurs génétiques de la virulence (e.g. séquences CRISPR associées à l'acquisition de gènes de virulence et association de gènes pour O26) ont été calculées. Elles ont été comparées avec les données de la littérature pour des collections de souches provenant d'autres origines, et notamment de cas humains.

Tableau 10 : Gènes associés à la pathogénicité des STEC étudiés par approche rt-PCR.

Gene	Function
<i>stx1</i>	Stx1 coding gene
<i>stx2</i>	Stx2 coding gene
<i>eae</i>	Intimin coding gene
<i>eae-beta</i>	Variant eae
<i>eae-gamma</i>	Variant eae
<i>eae-epsilon</i>	Variant eae
<i>eae-theta</i>	Variant eae
<i>O26</i>	Variant Ag O
<i>O157</i>	Variant Ag O
<i>wzyO145</i>	Variant Ag O
<i>O103</i>	Variant Ag O
<i>O111</i>	Variant Ag O
<i>O121</i>	Variant Ag O
<i>O45</i>	Variant Ag O
<i>H11</i>	Variant Ag H
<i>H7</i>	Variant Ag H
<i>H28</i>	Variant Ag H
<i>H2</i>	Variant Ag H
<i>H8</i>	Variant Ag H
<i>H19</i>	Variant Ag H
<i>arcA-allele2</i>	Negative response regulator of genes in aerobic pathways
<i>pagC</i>	Probable virulence-related membrane protein, similar to virulence-related membrane proteins e.g. pagC
<i>ent</i>	Enterobactin synthesis pathway
<i>nleB</i>	NF-kB inhibitor
<i>nleE</i>	NF-kB inhibitor
<i>efa1</i>	Adhesion factor
<i>nleF</i>	Caspase inhibitor : apoptotic inhibitor
<i>nleA</i>	Eukaryotic proteins secretion inhibitor, disruption of intestinal tight junctions
<i>Z2098</i>	Gene OI-57, virulence factor
<i>Z2099</i>	Gene OI-57, virulence factor
<i>espN</i>	Gene OI-50
<i>espK</i>	Gene OI-50, phage protein, T3SS-dependant effector, colonization factor
<i>espV</i>	Gene OI-44, unknown function
<i>espM1</i>	Gene OI-71, virulence factor
<i>SP_O26_C *</i>	CRISPR
<i>SP_O26_D *</i>	CRISPR
<i>SP_O26_E *</i>	CRISPR
<i>SP_O157_A *</i>	CRISPR
<i>SP_O157_B *</i>	CRISPR
<i>SP_O157_C *</i>	CRISPR
<i>SP_O111 *</i>	CRISPR
<i>SP_O45 / O103 *</i>	CRISPR
<i>SP_O145 *</i>	CRISPR
<i>SP_O121 *</i>	CRISPR
<i>Z6065</i>	CP933-P gene, unknown function
<i>iha</i>	Adhesion factor
<i>terE</i>	Tellurite resistance
<i>ureD</i>	Urease activity
<i>wecA</i>	Sugar-phosphate transferase initiating the biosynthesis of O-specific Lipopolysaccharide

1.3. Résultats

Ce paragraphe est une synthèse des principaux résultats présentés dans les deux articles.

La comparaison des profils de macro-restrictions de l'ADN des STEC a montré, dans le premier article, une variabilité génomique élevée (Indice D de Simpson de 0,9976) : tous les isolats laitiers ont pu ainsi être différenciés. Dans le deuxième article, seulement deux souches étaient des clones.

Les différents sérotypes présentaient des profils de gènes de virulence différents. En revanche, ils étaient similaires pour des souches de différentes origines (laitière ou de cas humains). Néanmoins, le gène *stx1* (prévalence dans le lait : 72%, vs. humain : 27%) était plus fréquemment détecté chez les souches STEC O26:H11 d'origine laitière alors que le gène *stx2* était plus fréquent chez les souches d'origine humaine (article 1). Concernant les souches STEC O157:H7, les gènes *stx1*, *nleF* et *Z6065* étaient plus fréquents pour les souches humaines (respectivement : 39%, 94% et 100%) que pour celles isolées de produits laitiers (respectivement 0%, 40% et 40%). Les profils d'association de gènes pour les souches STEC O103:H2, étaient analogues à ceux de souches isolées d'autres origines que les produits laitiers (notamment de cas humains ; article 2).

La totalité des souches STEC étudiées dans l'article 2 présentaient les associations de gènes décrites par Delannoy et al. (2013) pour les EHEC (*eae* et *stx*, *espK* et *espV*, *ureD* et / ou *Z2098*).

Les souches STEC appartenant au sérotype O26:H11 possédaient l'allèle 2 du gène *arcA*, qui, associé avec certains marqueurs génétiques spécifiques, est un témoin de la virulence potentielle de ces souches. En revanche, les souches STEC O26:H11 isolées de produits laitiers présentaient une faible fréquence du gène *stx2*, *pagC* et *Z6065*.

Toutes les souches O26:H11 AEEC présentaient le CRISPR_{O26:H11} SP_O26_E et ne possédaient pas les marqueurs génétiques *espK*, *espV*, *ureD* et / ou *Z2098*.

1.4. Discussions et Conclusions

Les STEC isolés de produits laitiers présentent une forte diversité génétique. Leur profils de macro-restrictions ne les discriminent pas de ceux d'autres origines.

Nos travaux ont mis en évidence des différences de profils de virulence entre les souches STEC d'origine humaine et celles isolées des produits laitiers. Néanmoins, elles ne semblent pas suffisantes pour associer les profils électrophorétiques et les profils de gènes de virulence à des souches potentiellement moins pathogènes que les souches provenant de cas cliniques humains.

Les associations de gènes des souches O157:H7, O103:H2 et O26:H11 isolées à partir de produits laitiers ont montré des analogies avec des souches EHEC décrites par Delannoy et al. (2013). Néanmoins, ces associations de gènes caractérisent des souches O26:H11 possédant le gène *eae* uniquement (AEEC) comme STEC potentiels pouvant acquérir ou perdre le gène *stx* (phage). De plus, la présence du marqueur génétique CRISPR_SP_O26_E, en plus de l'absence des marqueurs génétiques *espK*, *espV*, *ureD*, *Z2098* chez ces souches AEEC ont permis de faire un rapprochement avec le nouveau « *French clone* » décrit en 2015 par Delannoy et al.

Les souches STEC isolées de produits laitiers ne se distinguent pas des souches EHEC définies par Delannoy et al. (2013). Cependant, il faut être prudent car la définition d'une souche EHEC employée par ces auteurs diffère de celle établie en 2010 par l'ANSES. En effet, la saisine de 2008, révisée en 2010, définit un EHEC comme une souche de STEC (*E. coli* présentant concomitamment les gènes *eae* et *stx*) ayant déclenché une pathologie chez

l'homme. Cependant, pour ces auteurs, une souche d'*E. coli* appartenant au top-5 et possédant concomitamment les gènes *eae* et *stx* est considérée comme EHEC, quelle que soit son origine d'isolement.

Pour conclure, les analyses de variations génétiques par les méthodes employées ne nous ont pas permis de différencier les souches STEC isolées de produits laitiers de celles réellement impliquées dans des épidémies. La détection des gènes de virulence et des profils d'association de gènes de virulence chez celles-ci nous indique que : soit dans l'état actuel des connaissances, ces souches sont effectivement hautement pathogènes et pourraient être impliquées dans des épidémies ou des cas sporadiques, soit ces méthodes analytiques ne sont pas applicables pour une définition claire de la pathogénicité des STEC. La définition de la pathogénicité des STEC d'un point de vue moléculaire ne prend pas en compte l'environnement de la souche et son impact sur la pathogénicité. En l'absence de modèles pertinents pour l'étude de la physiologie et de l'expression de gènes des STEC dans des conditions mimétiques de l'environnement humain, le statut de leur pathogénicité reste encore difficile à établir.

Article scientifique n°2 (Douellou et al, 2016, *International Journal of Food Microbiology*, 232, 52-62)

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dairy products—Genetic diversity and virulence gene profiles.

T. DOUËLLOU^{1, 2}, S. DELANNOY³, S. GANET^{2, 4}, P. MARIANI-KURKDJIAN⁵, P. FACH³, E. LOUKIADIS^{2, 4}, MC. MONTEL¹, D. THEVENOT-SERGENTET^{2, 4*}.

¹INRA UR Fromagères 545, 20 Cote de Reyne 15000 Aurillac, France

²Université de Lyon, “Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment” Research Group, UMR5557 Ecologie Microbienne Lyon, Université Lyon 1, CNRS, VetAgro Sup, 69280 Marcy l’Etoile

³Université Paris-Est, ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Plateforme IdentityPath, 14 rue Pierre et Marie Curie, 94701 Maisons-Alfort, France

⁴Université de Lyon, VetAgro Sup Campus Vétérinaire, Laboratoire d’études des Microorganismes Alimentaires Pathogènes –French National Reference Laboratory for *Escherichia coli* including Shiga-like toxin-producing *E. coli* (NRL-STEC), 69280 Marcy-l’Etoile, France

⁵Centre National de Référence Associé des *Escherichia coli*, AP-HP, Service de Microbiologie, Hôpital Robert-Debré, 75019 Paris, France

*corresponding author: delphine.sergentet@vetagro-sup.fr

ABSTRACT

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are widely recognized as pathogens causing food borne disease. Here we evaluate the genetic diversity of 197 strains, mainly STEC, from serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 and O145:28 and compared strains recovered in dairy products against strains from human, meat and environment cases. For this purpose, we characterized a set of reference-collection STEC isolates from dairy products by PFGE DNA fingerprinting and a subset of these by *virulence*-gene profiling. PFGE profiles of restricted STEC total DNA showed high genomic variability (0.9976 on Simpson's discriminatory index), enabling all dairy isolates to be differentiated. High-throughput real-time PCR screening of STEC *virulence* genes were applied on the O157:H7 and O26:H11 STEC isolates from dairy products and human cases. The *virulence gene* profiles of dairy and human STEC strains were similar. Nevertheless, frequency-wise, *stx1* was more prevalent among dairy O26:H11 isolates than in human cases ones (87% vs. 44%) while *stx2* was more prevalent among O26:H11 human isolates (23% vs. 81%). For O157:H7 isolates, *stx1* (0% vs. 39%), *nleF* (40% vs 94%) and Z6065 (40% vs 100%) were more prevalent among human than dairy strains. Our data point to differences between human and dairy strains but these differences were not sufficient to associate PFGE and virulence gene profiles to a putative lower pathogenicity of dairy strains based on their lower incidence in disease. Further comparison of whole-genome expression and virulence gene profiles should be investigated in cheese and intestinal tract samples.

INTRODUCTION

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are widely recognized as potential pathogens that can cause diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic–uremic syndrome (HUS) in humans and ultimately lead to death. Ruminants, particularly cattle and sheep (Gyles, 2007), are natural STEC reservoirs, which creates a risk of human disease through ingestion of contaminated meat and dairy products

(Caprioli et al., 2005). The prevalence of STEC in raw milk has not changed over the last ten years, and is typically between 0% and 13.6% (Farrokh et al., 2013). In 2009, official monitoring plans in France evaluated the prevalence of STEC as 0.3% in raw ground beef and 0.9% in cheese (Loukiadis et al., 2012). Nevertheless, physiological states of STEC and food microbiota can impact these data and lead to underestimated occurrence figures (Auvray et al., 2009; Farrokh et al., 2013; Madic et al., 2011). Certain types of experimentally-contaminated raw milk cheeses have been shown to favor growth of O157, O26, O103 and O145 STEC cells (Miszczucha et al., 2013). Due to this increased rate, the infectious dose may be reached from a single initial STEC cell contamination (Nataro & Kaper, 1998). In France, despite high consumption of raw-milk cheese (2.8 kg/year/inhabitant; CNIEL, 2014), STEC outbreaks or isolated infectious cases due to consumption of dairy products remain rare (Espíe et al., 2006, 2008; Loukiadis et al., 2012).

There are very few datasets on the diversity of dairy STEC isolates. PFGE fingerprinting of O157 and non-O157 STEC isolates from human, animal and food found high genetic diversity with Simpson discriminatory indices of between 0.97 and 1 ($0 < D \text{ index} < 1$; Hunter & Gaston, 1988; Ribot et al., 2006; Izumiya et al., 2010; Jenke et al., 2011; Verstraete et al., 2013). Interestingly, even though dairy products have been implicated in outbreaks, few studies have focused on the genetic diversity of dairy STEC isolates. Differences in the key virulence properties of dairy STEC isolates may partly explain their lower incidence on human health. Top-5 pathogenic STEC serogroups normally harbor the *eae* gene encoding the intimin surface protein (Beebakhee et al., 1992), and intimin plays an essential role in STEC attaching and effacing lesion. STEC can produce two types of Shiga toxins (Stx1 and Stx2) (Watanabe et al., 1999) and can also carry several other virulence factors involved in their pathogenicity and colonization of the gastrointestinal tract (Bardiau et al., 2009; Coombes, 2009; Coombes et al., 2008). Nevertheless, virulence factors and mechanisms involved in the pathogenicity of STEC strains are still not fully known. Specific virulence gene profiles of STEC strains isolated from dairy products have not yet been reported and may prove valuable to evaluate their pathogenicity.

This study aims to evaluate the genetic diversity of different STEC serotypes recovered in dairy products against the same strains recovered from meat, human and environment cases. For this purpose, we characterized a set of reference-collection STEC isolates from dairy products by PFGE DNA fingerprinting and a subset of these by *virulence*-gene profiling.

MATERIALS AND METHODS

PFGE DNA fingerprinting.

STEC strains—selection and culture conditions. We used 197 *E. coli* strains from different serotypes: O157:H7 (26 STEC strains), O26:H11 C (77 STEC strains) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) O26:H11 (21 strains), O103:H2 (46 STEC strains), O111:H8 (13 STEC strains) and O145:H28 (14 STEC strains). The *eae*, *stx1* and *stx2* genes were analyzed by Taqman qPCR (Madic et al., 2010; Nielsen & Andersen, 2003; Perelle et al., 2005). Serotypes were chosen based on their potential pathogenicity and their classification as seropathotypes A and B (Karmali et al., 2003). Detailed information on the STEC strains can be found in Supplementary **Table S1**.

STEC from dairy products (dairy strains). 155 strains were isolated from milk and various cheese formats (hard cheese, blue cheese, mold cheese) from dairy-industry HACCP control plans (by the National Reference Laboratory for pathogenic *Escherichia coli* in Marcy-L'Etoile, France). The origins of the strains are detailed in Table S1.

STEC from other origins. 18 STEC strains sourced from milk farm environments, 8 from meat and 16 from infected humans (human strains) were used as controls (**Table 1**). The milk farm and meat strains were isolated and kindly provided by the National Reference Laboratory for pathogenic *Escherichia coli* in Marcy-L'Etoile, France. Pathogenic STEC isolates from infected humans were provided by the French associated National Reference Center for *Escherichia coli* (Hospital Robert Debré, Paris, France).

O157, O111, O26, O103 and O145-serogroup STEC were detected and isolated according to the method described in ISO technical specification 13136:2012. All strains were kept stored at -80°C.

PFGE DNA fingerprinting. Genetic relatedness of STEC and EPEC strains was assessed by genomic comparison using the Standard PulseNet PFGE protocol for *E. coli* O157 (Ribot et al. 2006; CDC.net). We chose to use PFGE as it is often more discriminating for STEC strains than ribotyping or multilocus sequence typing (Izumiya et al., 2010; Jenke et al., 2011; Ribot et al., 2006, Foley et al, 2004). To illustrate, Foley et al. concluded that PFGE provided the most discrimination among other methods including multilocus sequence typing (MLST): PFGE identified 72 distinct PFGE profiles for the isolates whereas MLST generated just 5 profiles.

Briefly, agarose-embedded DNAs were digested overnight at 37°C with 20 U of *Xba*I enzyme (Promega Corp. Madison, WI). *Xba*I-digested DNA of *Salmonella enterica* serotype *Braenderup* strain H9812 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) was used as universal molecular size marker. Restriction fragments were resolved at 14°C in 0.5× Tris-borate-EDTA (TBE) buffer on 1% Seakem gold agarose gels (FMC Bioproducts, Rockland, ME) using a pulsed-field Chef-DR-III system (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). Gels were stained with GelRed™ (10 µg ml⁻¹; VWR International LLC, PA) then visualized by gel image digitization using Easy RH equipment (Herolab GmbH, Germany) and an image analyzer (VisioCapt-Bio1D; Fisher Bioblock Scientific, Illrisch, France). The PFGE profiles were then analyzed using BioNumerics software version 7.1 (Applied Maths, Ghent, Belgium). Dendrograms were generated using band-based Dice similarity indices (optimization: 0.5%; position tolerance: 1%) and unweighted pair grouping with arithmetic mean clustering. Clusters and subclusters were defined for 90% and 80% homology according to Verstraete et al. (2013).

Vir-gene profiling.

Strain selection. 10 O157:H7 and 36 O26:H11 STEC strains were selected according to their PFGE DNA fingerprints. These two serotypes were chosen on the basis of their implication in outbreaks and their prevalence in dairy products.

Supplementary strains belonging to STEC serotypes O157:H7 (18 strains) and O26:H11 (26 strains) and originating from infected humans (kindly provided by Robert-Debré Hospital) were used to compare their virulence-gene profiles.

DNA extraction: DNA was extracted using InstaGene matrix (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France) following the manufacturer's instructions. Briefly, each strain was cultured for 24h at 37°C on plate count agar. One colony was picked and suspended on 200 µL of InstaGene matrix. Then, the suspension was incubated for 15 min at 95°C and centrifuged for 3 min at 13 000 rpm and at room temperature. The supernatant was used as matrix for the high-throughput real-time PCR system.

High-throughput real-time PCR system. The BioMark real-time PCR system (Fluidigm, San Francisco, CA) was used for high-throughput microfluidic real-time PCR amplification using the 48.48 dynamic arrays (Delannoy et al., 2013b). PCR amplifications were used to detect genes reported as implicated in virulence, i.e. *stx1* and *stx2* genes (encoding Shiga toxins 1 and 2), *eae*, *eae-beta*, *eae-gamma*, *eae-epsilon*, and *eae-theta* (encoding intimin), *rfbEO157*, *wzxO26*, *wzxO103* (encoding O antigens) and *fliCH2*, *fliCH7*, *fliCH11* (encoding H-types) (Bugarel et al., 2011). Other virulence genes were also detected: genes encoding effector proteins translocated by the type-III secretion system (EspL2 [*ent* {or *espL2*}], NleA [*nleA*], NleB [*nleB*], NleE [*nleE*], NleF [*nleF*], Efa1 [*efA1*] (Bardiau et al., 2009), EspN [*espN*], EspK [*espK*], EspM1 [*espM1*] and EspV [*espV*], proteins associated with STEC virulence but with unknown functions encoded by Z2098, Z2099 (OI-57) and Z6065 (CP933-P) and proteins associated with O-Island 122 (*iha*, *pagC* and *efa1*) (Bugarel et al., 2011; Coombes et al., 2008; Delannoy et al., 2013a, 2013b). The genes are reported as associated with the virulence profiles of

human case-related STEC strains. Genes *iha* and *efa1* are implicated in bacterial adhesion and *pagC* is implicated in resistance to macrophage digestion. The array was also designed to detect other putative pathogenic STEC virulence factors such as *terE*, which is implicated in tellurite resistance, and *ureD*, which codes for urease (OI43/48) (Delannoy et al., 2013b). The *wecA* gene was used as a reference genetic marker of *E. coli* (Bugarel et al., 2011).

Statistical analysis.

All results were managed with BioNumerics software version 7.1. The genetic diversity of the STEC strains collection was evaluated by calculating Simpson's Diversity Index (D) on patterns obtained by PFGE analysis:

$$D = 1 - \left(\frac{\sum n(n-1)}{N(N-1)} \right)$$

where n is sum of effectives of strains that present identical patterns and N is sum of all patterns. D ranges from "0" to "1" where "0" represents weak genetic diversity and "1" represents infinite diversity (Hunter & Gaston, 1988).

Cluster analysis of gene frequency prevalences was performed using a dendrogram representation. Dendrograms were generated with the binary Dice similarity indices and the unweighted pair group method with arithmetic mean clustering with Bionumerics software version 7.1. Subclusters were defined for STEC strains presenting at least 80% homology, as described in Verstraete et al., (2013). Statistical comparisons of gene frequencies in strains belonging to PCR clusters were determined by Fisher's exact test. Unless otherwise indicated, $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

PFGE DNA fingerprints

The 197 isolates pulsed after *Xba*I macrorestriction presented 167 distinguishable PFGE pulsotypes (Figure 1). Genomic divisions of STEC strains on the basis of PFGE DNA fingerprints were correlated with serotype classification. Twenty strains presented the same PFGE pattern, suggesting that they shared similar clonal affiliation. Interestingly, even if several of these strains were isolated during the same period, strain D4-2-1 was a farm environment isolate and strain L23A was a dairy product isolate. The degree of genetic diversity (by PFGE profiling) of dairy STEC strains was high whatever the serotype, with D index ranging from 1.0000 for O157:H7 to 0.9615 for O111:H8 (Table 1). The same high levels of genetic diversity have been reported for STEC isolated from foods, cattle and humans (Izumiya et al., 2010; Madic et al., 2011; Verstraete et al., 2013).

Our study demonstrated for the first time that dairy strains exhibit a large number of DNA fingerprints. Indeed, very few strains displayed the same profile. Our results confirm that PFGE DNA fingerprinting is a valuable tool for tracking origin of contamination in the dairy supply chain, and not only during outbreaks (Pal, 2015). Public health organizations are currently using PFGE to track infections by STEC O157:H7 and other foodborne pathogens.

For O157:H7 *E. coli* strains, two main clusters divided into 3 main subclusters (C-O157:H7-Sub-Cluster [-SC] 1 to 3; Figure 2). In these sub-clusters, the strains showed 80% of homology.

O26:H11 STEC strains were classified into two clusters: C1-O26:H11 and C2-O26:H11. Human strains were mainly related to cluster C1 (16/26 O26:H11 human strains) with only a few related to cluster C2 (10/26). The grouping of O26:H11 STEC strains into two clusters fits with a previous study on O26:H11 STEC strains isolated from other origins (Miko et al., 2010; Bugarel et al., 2011). Our data showed that most of the strains in C1-O26:H11 were grouped into 17 sub-clusters in which strains shared 80% homology (C1-O26:H11-SC1 to 17). All but 6 strains carried both *eae* and *stx1* (n=67 [83.75%]) or *stx2* (n=3 [3.80%]) or *stx1* and *stx2* (n=3 [3.80%]) genes. The 6 other strains carried only

the *eae* gene (EPEC, n=6 [7.60%]). All but two C2-O26:H11 strains grouped into only one sub-cluster (C2-O26:H11-SC1). In this sub-cluster, 15 strains [78.95%] carried only the *eae*-gene and two human strains carried both the *eae* and *stx* genes (Figure 3).

O103:H2 STEC strains presented the highest diversity and were scattered across 4 clusters (C1 to 4; Figure 4). These results are consistent with Prager et al. (2002) who observed an unexpectedly high clonal diversity among 145 human strains of this serotype. They also showed homologies with strains belonging to other serogroups. C1 O103:H2 was linked to the macrohetero-cluster C-O157:H7/C2-O26:H11 with 56.0% homology (Figure 1). C3 O103:H2 strains presented 58.7% homology with the O111:H8 strains cluster. Indeed, O111:H8 STEC strains were organized into two clusters (Figure 5). C4 O103:H2 strains and O145:H28 strains cluster showed 63.2% homology. Finally, all O145:H28 strains were organized into two clusters presenting 55.8% homology (Figure 6). Sonntag et al. (2004) also observed two independent clusters for human strains of this serotype.

Vir-gene profiling:

The 90 strains possessed between 10 and 22 of the 23 virulence genes tested. All were LEE-positive and carried *ent*, *nleB*, *nleE*, *efa1* and *nleA* genes (non-LEE-encoded genes) (Figure 7). They displayed 23 distinct *vir*-gene profiles (Figure 7 and Table 3). Even if they are based on different molecular approaches, PFGE DNA fingerprinting and *vir*-gene profiling both differentiated the different serotypes. We thus conclude that high-throughput real-time PCR could be used as quick typing method for serogroup discrimination.

All O157:H7 STEC strains were grouped together. They exhibited 8 distinct *vir*-gene profiles (Figure 7). A majority of the human strains (13/18) were gathered into 5 different profiles whereas dairy strains (n=6) fell into 2 other profiles. Four dairy strains and five human strains shared the same profile. Interestingly, these strains have not been reported as related as they were not isolated the

same year (Figure 7 and Table S1). These results suggest that these dairy product STEC strains are a potential hazard. Certain genes were more prevalent in human strains than dairy strains: *stx1* (39% vs. 0%, $p\text{-value} < 0.01$), *nleF* (94% vs. 40%, $p\text{-value} < 0.001$) and *Z6065* (40% vs. 100%, $p\text{-value} < 0.001$) (Table3). Other genes (including *stx2*) showed equivalent prevalence between the human and dairy strains (Table 3).

O26:H11 STEC strains exhibited 16 distinct *vir*-gene profiles grouped into 2 clusters, O26:H11 C1 and O26:H11 C2 (Figure 7). Cluster O26:H11 C1 was composed of 45 strains, whose 33% of human strains (n=16) distinguished into 11 different *vir*-gene profiles. More precisely, 3 human strains had 3 different profiles and 3 dairy strains also 3 had different profiles. Most of the dairy and human strains (n=39) shared 5 distinct profiles. Cluster O26:H11 C2 was composed of 16 strains (10 human strains and 6 dairy strains) with only 4 *vir*-gene profiles. Two profiles grouped human strains only (5 strains each). Five dairy strains shared the same profiles that were different from those of human strains. One strain (strain 1726-1, originating from bovine raw milk) had a very different profile (Figure 7).

O26:H11 STEC strains from *vir*-gene Cluster 1 and Cluster 2 (Figure 7) did not share the same *vir*-gene profiles whatever their origins. The prevalence of genes *Z2098*, *espK*, *espV*, *iha* and *ureD* clearly distinguished the two clusters. Indeed, most of the cluster-1 strains possessed these genes whereas no cluster-2 strains did (Table 3). Delannoy et al. (2013b) reported that these virulence genes, either alone or in combination, were associated with pathogenic STEC strains isolated from infected humans (Table 3). Interestingly, *terE* gene was also more prevalent in O26:H11 strains of cluster C1 than cluster C2. Moreover, even if *terE* was more represented in pathogenic cluster-C2 strains (50%), no significant difference between the two origins was highlighted. In Cluster 1, gene prevalences were similar between human and dairy strains except for *stx1* (44% vs. 87%) and *stx2* (81% vs. 23%; Table 3). All human strains of cluster 2 had the *stx2* gene whereas none of dairy strains did (Table 3). It is important to keep in mind that Stx2 has stronger cytotoxicity than Stx1 (Rivero et al., 2010; Thompson et al., 2005). Epidemiological evidence suggests that Stx2-producing *E. coli* strains are

more frequently associated with hemolytic and uremic syndrome (HUS) than Stx1-producing strains. Indeed, Brandal et al. (2015) reported that patients infected with *stx1*-positive STEC had less risk of hospitalization than those infected with *stx2*, *eae* and *ehxA*-positive STEC. The lower prevalence of *stx2* in dairy strains may partly explain the lower number of STEC outbreaks and HUS cases linked to consumption of contaminated dairy products.

The list of virulence factors and mechanisms involved in the pathogenicity of STEC strains is not yet fully known. Indeed, Stx toxin production and colonization of the colonic mucosa are necessary but not sufficient to induce the disease in humans. Many other potential virulence factors have been described (ANSES, 2011). Our study shows that the other virulence genes were equally prevalent in dairy and human origin isolates.

Conclusion and Perspectives

This study demonstrated a very high genetic diversity of STEC strains isolated from dairy products. Virulence gene profiling was able to characterize their pathogenicity. Our data on dairy strains could help cheesemakers track STEC. Our results also help better inform the evaluation of risk, as our study highlighted out a number of differences of in dairy STEC strain virulence gene profiles. For instance, dairy O26:H11 STEC strains with *eae*, *stx1*, *Z2098*, *espK*, *espV*, *iha* and *ureD* could be considered potentially more virulent than strains without these markers. These characterizations pave the way to integrating virulence gene profiles into risk assessment approaches. Quantitative risk assessment approaches do not take into account the diversity of strains but only their level through the cheese chain from milk production to cheese making (Perrin et al., 2015). However, these approaches still need a better evaluation of the real pathogenicity of dairy strains. Better evaluation should include not only genetic characteristics of STEC strains by a deeper comparison of their whole genome but also their abilities to survive and multiply in cheese matrixes and their ability to survive and bind to the intestinal cells of the host. Further investigation should focus on the expression of metabolic genes involved in their growth and virulence genes during ingestion.

Acknowledgements

This research was funded by Auvergne regional council, DRAAF Auvergne and the French Ministry of Agriculture Directorate for Food (DGAL).

The authors thank all the staff and the French national reference laboratory and associated *E. coli* national reference center for isolation of all the field strains studied. We also thank Valérie Michel (Actalia), Caroline Chatelard–Chauvin Pôle Fromager AOP Massif Central, ANSES, Sabrina Raynaud (IDELE) and Cécile Callon (URF INRA) for input to this study via the project's scientific governance committee, and Dr Benoit Cournoyer from the University of Lyon for critically rereading the manuscript. The whole manuscript was entirely corrected by A.T.T., Clermont Ferrand (<http://www.a-t-t.fr/>).

References

- ANSES, 2011. Anses – Saisine n ° 2010-SA-0031 Le directeur général de l'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la révision de la définition des *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) majeurs typiques, 33, 27–31.
- Auvray, F., Lecureuil, C., Dilasser, F., Taché, J., Derzelle, S., 2009. Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for the screening of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 554–9. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02561.x
- Bardiau, M., Labrozzi, S., Mainil, J.G., 2009. Putative adhesins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serogroup O26 isolated from humans and cattle. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2090–6. doi:10.1128/JCM.02048-08
- Beebakhee, G., Louie, M., Azavedo, J., Brunton, J., 1992. Cloning and nucleotide sequence of the *eae* gene homologue from enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7. *FEMS Microbiol. Lett.* 91, 63–68. doi:10.1111/j.1574-6968.1992.tb05184.x
- Brandal, L.T., Wester, A.L., Lange, H., Løbersli, I., Lindstedt, B.-A., Vold, L., Kapperud, G., 2015. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Norway, 1992–2012: characterization of isolates and identification of risk factors for haemolytic uremic syndrome. *BMC Infect. Dis.* 15, 324. doi:10.1186/s12879-015-1017-6
- Bugarel, M., Beutin, L., Scheutz, F., Loukiadis, E., Fach, P., 2011. Identification of genetic markers for differentiation of Shiga toxin-producing, enteropathogenic, and avirulent strains of *Escherichia coli* O26. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2275–81. doi:10.1128/AEM.02832-10
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H., Oswald, E., 2005. Review article Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res* 36, 289–311. doi:10.1051/vetres
- CNIEL, 2014. L'économie laitière en chiffres.

Coombes, B.K., 2009. Type III secretion systems in symbiotic adaptation of pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Trends Microbiol.* 17, 89–94. doi:10.1016/j.tim.2008.11.006

Coombes, B.K., Wickham, M.E., Mascarenhas, M., Gruenheid, S., Finlay, B.B., 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, 2153–60. doi:10.1128/AEM.02566-07

Delannoy, S., Beutin, L., Fach, P., 2013a. Towards a molecular definition of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): detection of genes located on O island 57 as markers to distinguish EHEC from closely related enteropathogenic *E. coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1083–8. doi:10.1128/JCM.02864-12

Delannoy, S., Beutin, L., Fach, P., 2013b. Discrimination of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) from non-EHEC strains based on detection of various combinations of type III effector genes. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3257–62. doi:10.1128/JCM.01471-13

Espié, E., Grimont, F., Pihier, N., Debré, H.R., Pasteur, I., 2008. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurised cows cheese, France, 2005 11, 94415.

Espié, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H., Vernozzy-Rozand, C., 2006. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiol. Infect.* 134, 143–6. doi:10.1017/S0950268805004887

Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condrón, R., De Reu, K., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Mischczycha, S., Moussiegt, S., Verstraete, K., Cerf, O., 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiol.* 162, 190–212. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008

Gyles, C.L., 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* 85, E45–62. doi:10.2527/jas.2006-508

Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465–2466.

Izumiya, H., Pei, Y., Terajima, J., Ohnishi, M., Hayashi, T., Iyoda, S., Watanabe, H., 2010. New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. *Microbiol. Immunol.* 54, 569–77. doi:10.1111/j.1348-0421.2010.00252.x

Jenke, C., Lindstedt, B.A., Harmsen, D., Karch, H., Brandal, L.T., Mellmann, A., 2011. Comparison of multilocus variable-number tandem-repeat analysis and multilocus sequence typing for differentiation of hemolytic-uremic syndrome-associated *Escherichia coli* (HUSEC) collection strains. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3644–6. doi:10.1128/JCM.05035-11

Käppeli, U., Hächler, H., Giezendanner, N., Beutin, L., Stephan, R., 2011. Human infections with non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Switzerland, 2000–2009. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 180–5. doi:10.3201/eid1702.100909

Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-smith, R., Clark, C., Rahn, K., Kaper, J.B., Isaac-arenton, J., 2003. 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, 4930–40. doi:10.1128/JCM.41.11.4930

Krause, U., Thomson-Carter, F., Pennington, T., 1996. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed-field gel electrophoresis and comparison with that by bacteriophage typing. *J. Clin. Microbiol.* 34, 959–961.

Loukiadis, E., Callon, H., Mazuy-Cruchaudet, C., Vallet, V., Bidaud, C., Ferré, F., Giuliani, L., Bouteiller, L., Pihier, N., Danan, C., 2012. Surveillance des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) dans les denrées alimentaires en France (2005-2011). *Bull. Epidémiologique ANSES* 55.

Low, A.S., Holden, N., Rosser, T., Roe, A.J., Constantinidou, C., Hobman, J.L., Smith, D.G.E., Low, J.C., Gally, D.L., 2006. Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Environ. Microbiol.* 8, 1033–47. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.00995.x

Madic, J., Peytavin de Garam, C., Vingadassalon, N., Oswald, E., Fach, P., Jamet, E., 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, 1696–705. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04798.x

Madic, J., Vingadassalon, N., de Garam, C.P., Marault, M., Scheutz, F., Brugère, H., Jamet, E., Auvray, F., 2011. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, and O157:H7 in raw-milk cheeses by using multiplex real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2035–41. doi:10.1128/AEM.02089-10

Miko, A., Lindstedt, B.-A., Brandal, L.T., Løbersli, I., Beutin, L., 2010. Evaluation of multiple-locus variable number of tandem-repeats analysis (MLVA) as a method for identification of clonal groups among enteropathogenic, enterohaemorrhagic and avirulent *Escherichia coli* O26 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 303, 137–46. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01874.x

Miszczucha, S.D., Perrin, F., Ganet, S., Jamet, E., Tenenhaus-aziza, F., Thevenot-sergentet, D., Montel, M., 2013. Behavior of different Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in various experimentally contaminated raw-milk cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 150–8. doi:10.1128/AEM.02192-12

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

Nielsen, E.M., Andersen, M.T., 2003. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2884–93. doi:10.1128/JCM.41.7.2884

Pal, P., 2015. Pulsed-field gel electrophoresis as a molecular tool for characterizing genomes of certain food-borne bacterial isolates - a review. *Int. Lett. Nat. Sci.* 2, 13–23.

Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., Fach, P., 2005. Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1162–8. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02545.x

Perrin, F., Tenenhaus-Aziza, F., Michel, V., Miszczucha, S., Bel, N., Sanaa, M., 2015. Quantitative risk assessment of haemolytic and uremic syndrome linked to O157:H7 and non-O157:H7 Shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains in raw milk soft cheeses. *Risk Anal.* 35, 109–28. doi:10.1111/risa.12267

Prager, R., Liesegang, A., Voigt, W., Rabsch, W., Fruth, A., Tschäpe, H., 2002. Clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2/H– in Germany. *Infect. Genet. Evol.* 1, 265–275. doi:10.1016/S1567-1348(02)00032-1

Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., Barrett, T.J., 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 59–67. doi:10.1089/fpd.2006.3.59

Rios, M., Prado, V., Trucksis, M., Arellano, C., Borie, C., Alexandre, M., Fica, A., Levine, M.M., 1999. Clonal diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with

hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *J. Clin. Microbiol.* 37, 778–781.

Rivero, M.A., Passucci, J.A., Rodriguez, E.M., Parma, A.E., 2010. Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhoea in Argentina. *J. Med. Microbiol.* 59, 345–52. doi:10.1099/jmm.0.015560-0

Sonntag, A.-K., Prager, R., Bielaszewska, M., Zhang, W., Fruth, A., Tschape, H., Karch, H., 2004. Phenotypic and genotypic analyses of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 strains from patients in Germany. *J. Clin. Microbiol.* 42, 954–962. doi:10.1128/JCM.42.3.954-962.2004

Thompson, L.H., Giercke, S., Beaudoin, C., Woodward, D., Wylie, J.L., 2005. Enhanced surveillance of non-O157 verotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples from Manitoba. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*

Verstraete, K., DE Reu, K., VAN Weyenberg, S., Piérard, D., DE Zutter, L., Herman, L., Robyn, J., Heyndrickx, M., 2013. Genetic characteristics of Shiga toxin-producing *E. coli* O157, O26, O103, O111 and O145 isolates from humans, food, and cattle in Belgium. *Epidemiol. Infect.* 141, 2503–15. doi:10.1017/S0950268813000307

Watanabe, Y., Ozasa, K., Mermin, J.H., Griffin, P.M., Masuda, K., Imashuku, S., Sawada, T., 1999. Factory outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 424–8. doi:10.3201/eid0503.990313

Figures and Tables

Table 1: STEC and EPEC strains according to their origin and tested by PFGE.

Serotype	Origin				Total
	Dairy products	Meats	Env.	Humans	
O157:H7	12	6	3	5	26
O26:H11	86	0	6	6	98
O103:H2	38	2	5	1	46
O111:H8	9	0	2	2	13
O145:H28	10	0	2	2	14
Total	155	8	18	16	197

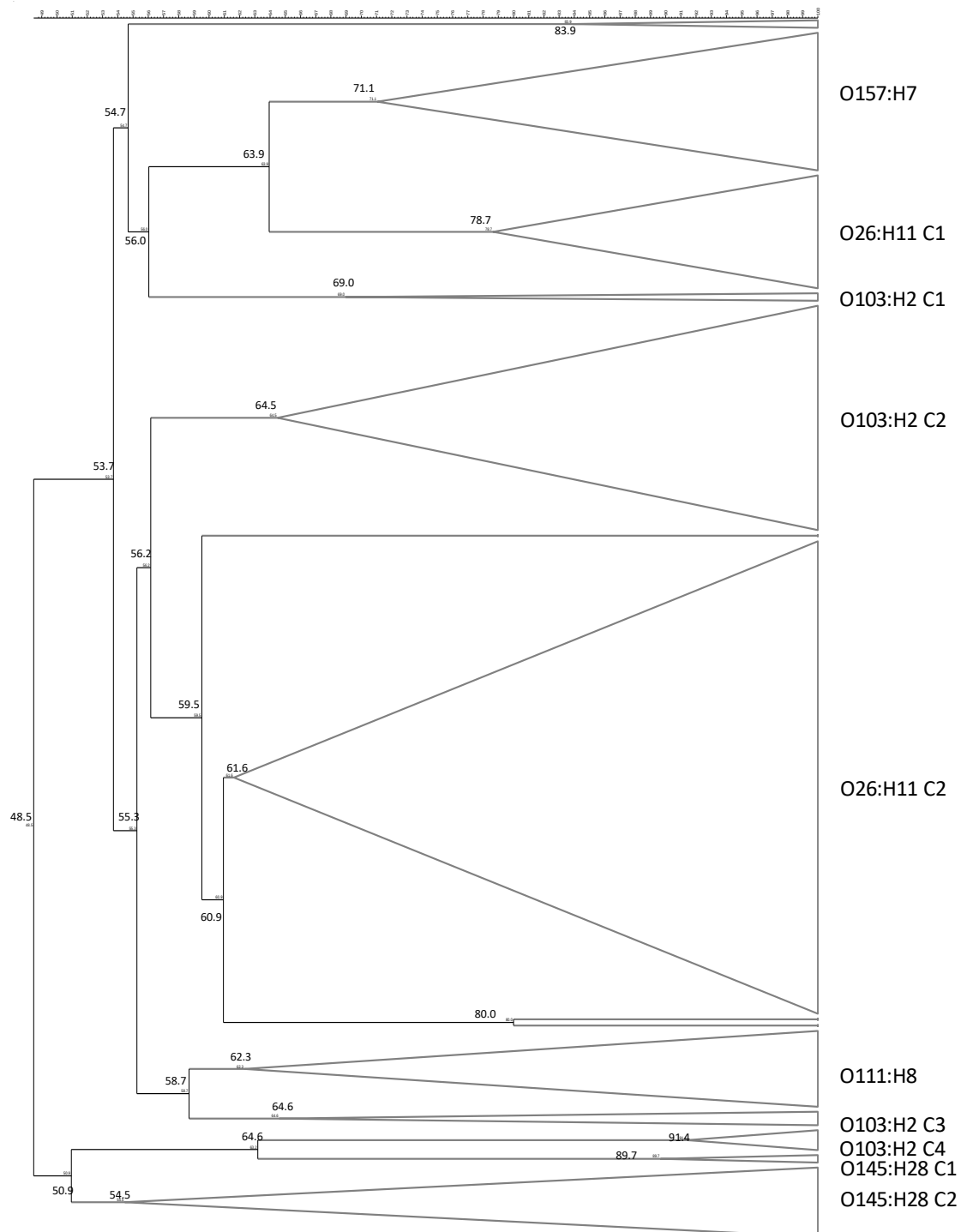


Figure 1: Simplified representation of the dendrogram of DNA fingerprints of STEC and EPEC from different serotypes (197 strains), i.e. O26:H11 (n=98), O157:H7 (n=26), O103:H2 (n=46), O111:H8 (n=13) and O145:H28 (n=14), isolated from dairy products, human cases, meat and environment.

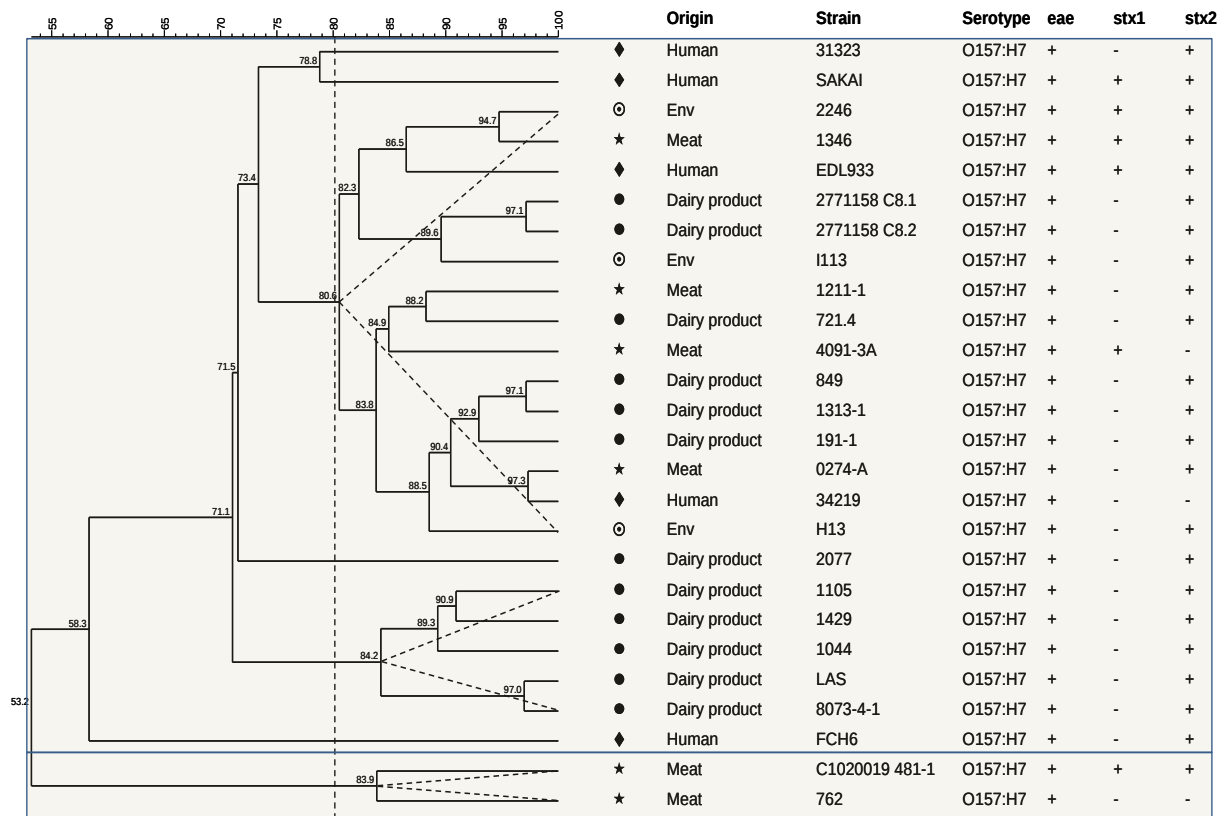


Figure 2: Dendrogram of DNA fingerprints of STEC O157:H7 (26 strains) isolated from different origins. Symbols define origins as dairy products (n=12 [circles]), human cases (n=5 [diamonds]), meat (n=6 [stars]) and environment (n=3 [target]). More precise details of strain origins can be found in Table S1

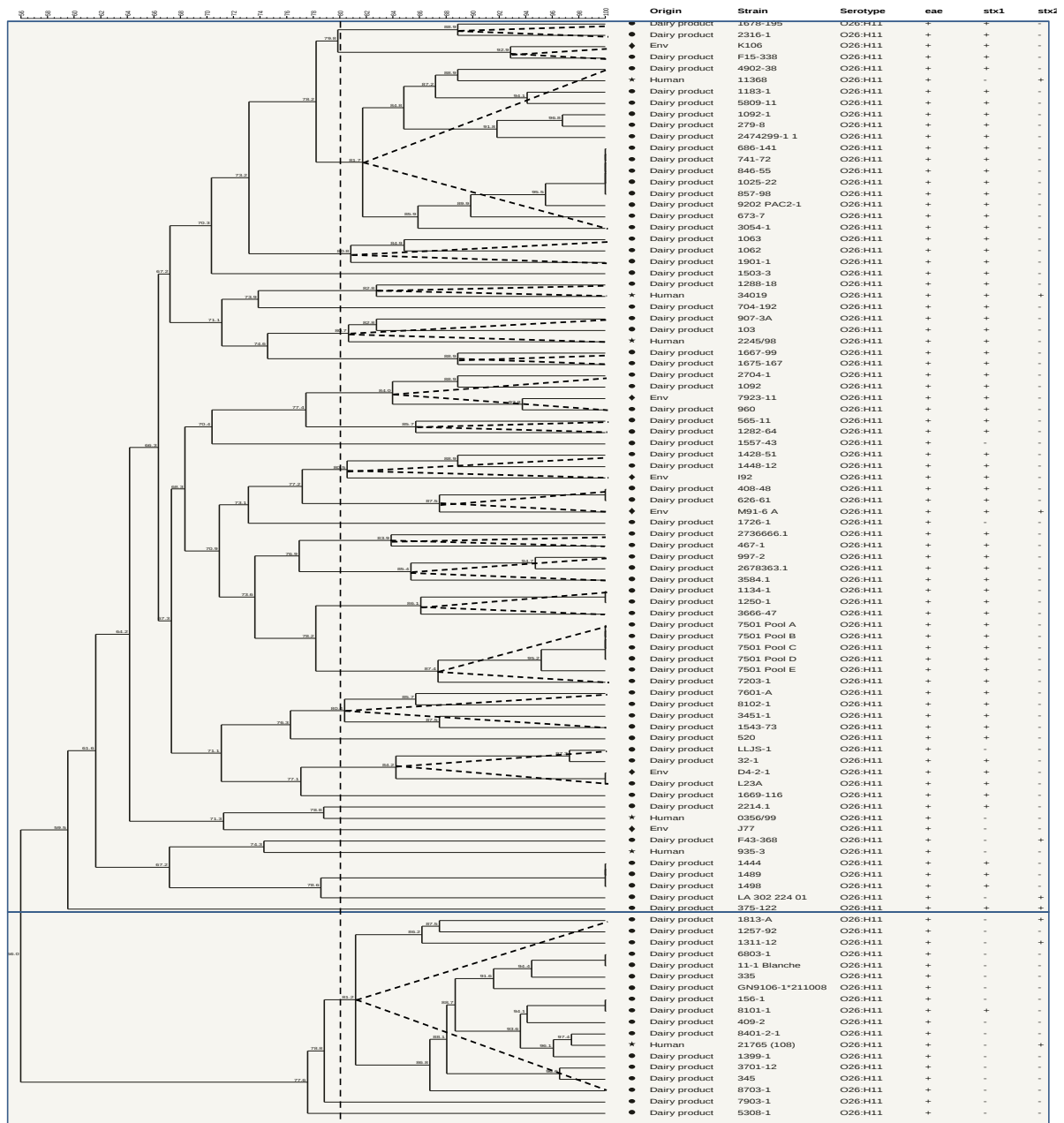


Figure 3: Dendrogram of DNA fingerprints of STEC and EPEC O26:H11 (98 strains) isolated from different origins. Symbols define origins as dairy products (n=86 [circles]), human cases (n=6 [stars]) and environment (n=6 [diamonds]). More precise details of strain origins can be found in Table S1

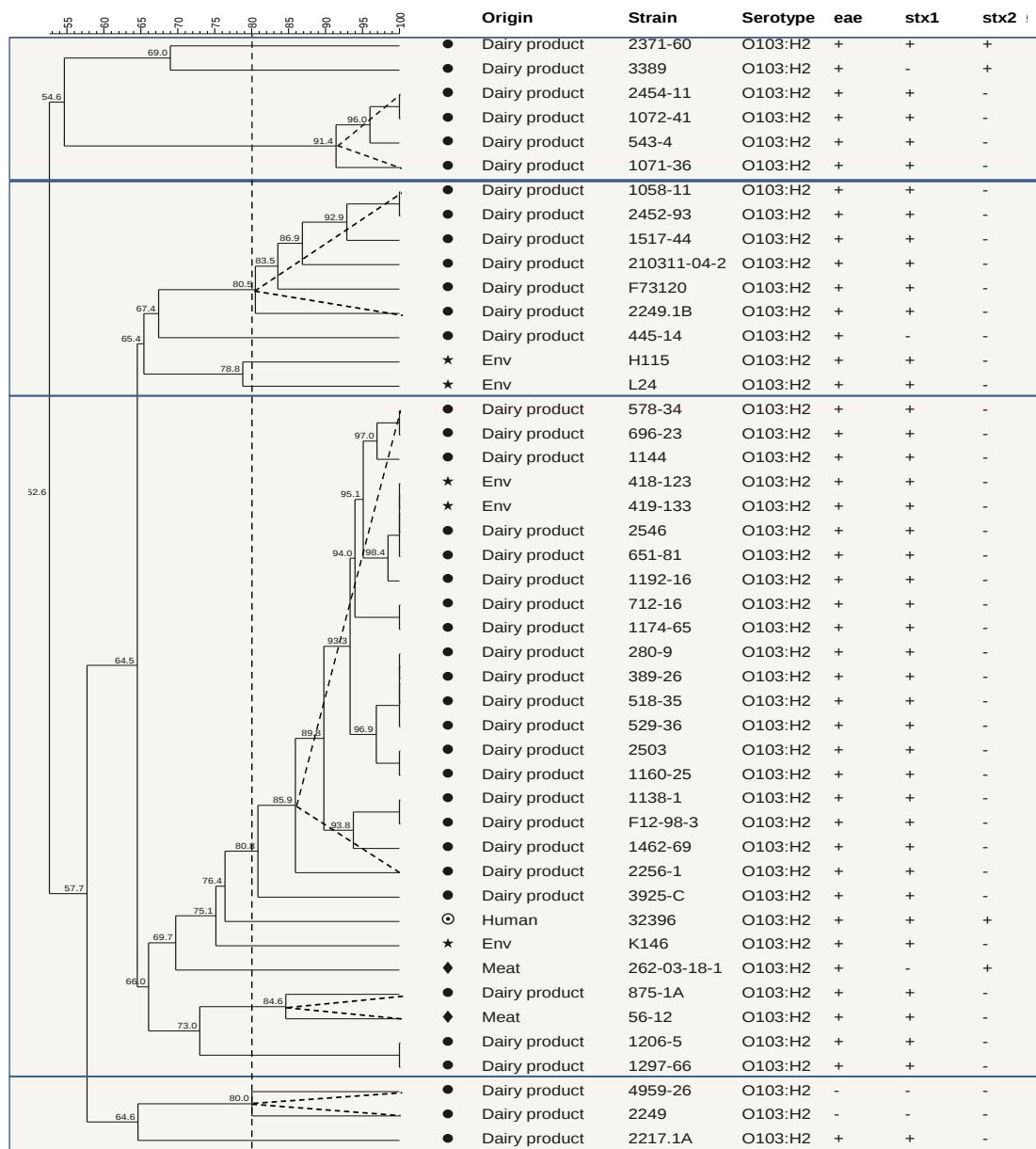


Figure 4: Dendrogram of DNA fingerprints of 46 O103:H2 STEC strains isolated from different origins.

Symbols define origins as dairy products (n=38 [circles]), human cases (n=1 [target]), meat (n=2 [diamonds]) and environment (n=5 [stars]). More precise details of strain origins can be found in Table S1

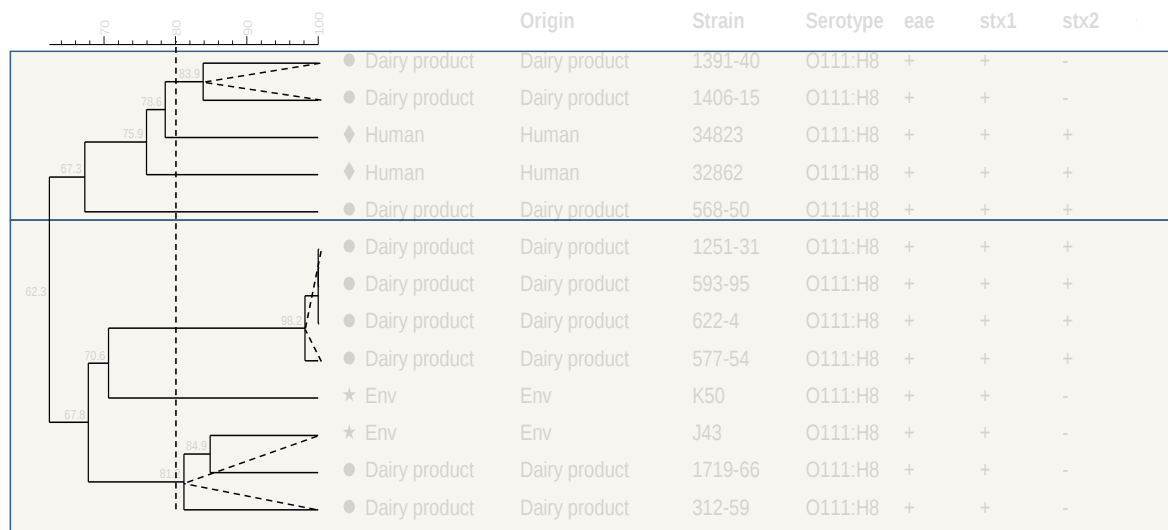


Figure 5: Dendrogram of DNA fingerprints of 13 O111:H8 STEC strains isolated from different origins. Symbols define origins as dairy products (n=9 [circles]), human cases (n=2 [diamonds]) and environment (n=2 [stars]). More precise details of strain origins can be found in Table S1

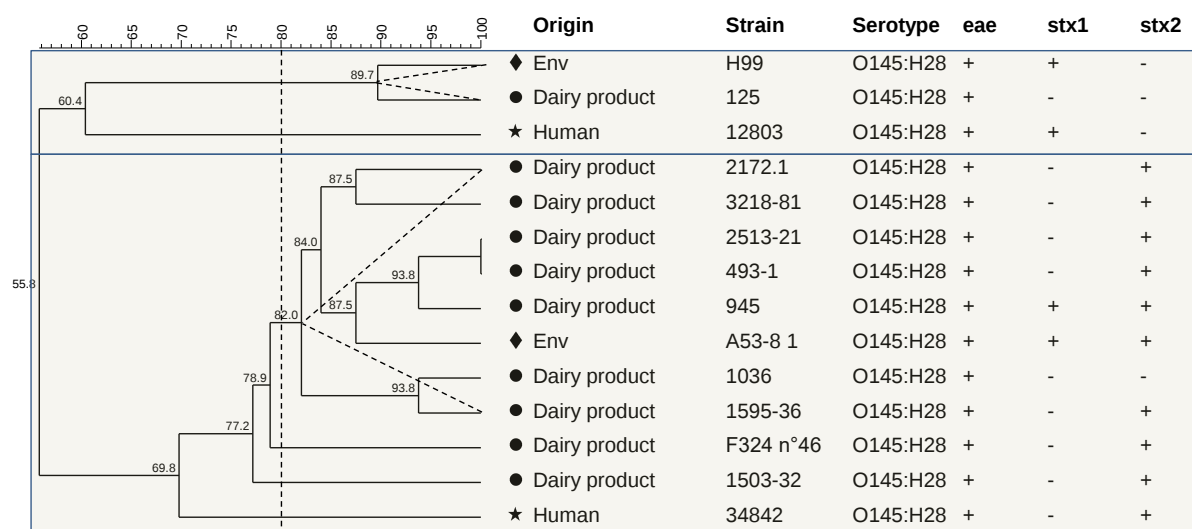


Figure 6: Dendrogram of DNA fingerprints of 14 O145:H28 STEC strains isolated from different origins. Symbols define origins as dairy products (n=10 [circles]), human cases (n=2 [stars]) and environment (n=2 [diamonds]). More precise details of strain origins can be found in Table S1.

Table 2: Genetic diversity of STEC strains based on Simpson's Diversity Index D from PFGE STEC and EPEC strain genome analyses. D: Simpson's Diversity Index. Square brackets: PFGE STEC strain profiles used to calculate D index.

Serotype	Clusters	D [SubCluster]	D [Cluster]	D [All-strain]	D [Dairy products]	D [All-STE C Dairy products]
O157:H7	O157:H7	1.0000	1.0000	0.9976	1.0000	0.9965
O26:H11	O26:H11 C1	0.9929	0.9951		0.9936	
	O26:H11 C2	0.9883				
O103:H2	O103:H2 C1	1.0000	0.9816		0.9794	
	O103:H2 C2	0.9730				
	O103:H2 C3	1.0000				
	O103:H2 C4	0.8333				
O145:H28	O145:H28	0.9890	0.9890		0.9778	
O111:H8	O111:H8	0.9615	0.9615		0.9167	

O157:H7 isolated from dairy products (targets) or human cases (diamonds). Black square: presence of the gene; white square: absence of the gene.

Table 3: Virulence-related gene frequencies in STEC and EPEC strains isolated from dairy products (DP) or from human cases (H) and belonging to serotypes O26:H11 and O157:H7. Gene prevalences in strains of both origins and belonging to cluster C1 or C2 of O26:H11 (**Figure 7**) are also charted. Frequencies are shown in a three-color scale as described in the legend.

		DP O157:H7		H O157:H7		DP O26:H11 C1		H O26:H11 C1		DP O26:H11 C2		H O26:H11 C2	
Toxins	<i>stx1</i>	0%	39%	87%	44%	0%	0%						
	<i>stx2</i>	100%	100%	23%	81%	0%	100%						
	<i>ent</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%						
Effacement	<i>eae</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%						
	<i>eae-β</i>	0%	0%	100%	100%	100%	100%						
	<i>eae-γ</i>	100%	100%	0%	0%	0%	0%						
	<i>efa1</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%						
	<i>iha</i>	100%	100%	100%	100%	0%	0%						
Resistance	<i>pagC</i>	100%	100%	0%	0%	0%	0%						
	<i>terE</i>	100%	100%	97%	88%	0%	50%						
	<i>ureD</i>	100%	100%	93%	94%	0%	0%						
System secretion	<i>espK</i>	100%	94%	100%	100%	0%	0%						
	<i>espM1</i>	100%	100%	97%	94%	100%	100%						
	<i>espN</i>	100%	94%	100%	94%	17%	0%						
	<i>espV</i>	100%	100%	90%	88%	0%	0%						
	<i>nleA</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%						
	<i>nleB</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%						
	<i>nleE</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%						
	<i>nleF</i>	40%	94%	93%	94%	100%	100%						
Other	<i>Z6065</i>	40%	100%	0%	0%	0%	0%						
	<i>Z2098</i>	100%	67%	97%	100%	0%	0%						
	<i>Z2099</i>	100%	72%	97%	100%	17%	0%						
	<i>wecA</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%						

Three-color scale

0%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

Article scientifique n°3 (*Soumis dans Food Microbiology*)

Molecular characterization of O157:H7, O26:H11 and O103:H2 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy products.

T. DOUËLLOU^{1, 2, *}, S. DELANNOY³, S. GANET^{2, 4}, P. FACH³, E. LOUKIADIS^{2, 4}, MC. MONTEL¹, D. SERGENTET-THEVENOT^{2, 4}

¹ Institut National de Recherche Agronomique, Unité de Recherches Fromagères, 15000 Aurillac, France

² Université de Lyon, Research Group “Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment”, UMR5557 Ecologie Microbienne Lyon, Université Lyon 1, CNRS, VetAgro Sup, 69280 Marcy l’Etoile

³ Université Paris-Est, ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Plateforme IdentityPath, 14 rue Pierre et Marie Curie, 94701 Maisons-Alfort, France

⁴ Université de Lyon, VetAgro Sup Campus Vétérinaire, Laboratoire d’études des Microorganismes Alimentaires Pathogènes –French National Reference laboratory for *Escherichia coli* including Shiga toxin producing *E. coli* (NRL-STEC), 69280, Marcy l’Etoile

*corresponding author: tdouellou@gmail.com

ABSTRACT

Pathogenic Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) are recognized worldwide as food-borne pathogens notably transmitted by ingestion of ready-to-eat food such as raw milk-derived products. While a large prevalence of STEC in dairy products, only few epidemic cases have been related to consumption of such matrices. We aimed to identify by rt-qPCR the virulence potential of O157, O26 and O103 STEC strains isolated from raw milk dairy products by analyzing frequencies and association of virulence-related genes associated with O-Island (OI) 44, OI-48, OI-50, OI-57, OI-71 and OI-122. Results showed that 100% of STEC strains investigated harbored genes associated with EHEC-related

virulence profiles patterns (*eae* and *stx*, with either *espK*, *espV*, *ureD* and/or *Z2098*). Results obtained concerning virulence-related genes content for O157:H7 and O103:H2 STEC strains were analogous to strains isolated from other origins than dairy products and especially from human cases. STEC strains of the serotype O26:H11 investigated possessed *arcA-allele 2* gene associated with specific genetic markers. These profiles are associated with STEC belonging to the high virulent seropathotype A. However, the weak frequency of *stx2* gene associated with absence of other virulence genes in O26:H11 isolated from dairy products remain a way of investigation for estimate their real pathogenicity. All O26:H11 Attaching-Effacing *E. coli* (AEEC) strains harbored the CRISPR_{O26:H11} *SP_O26_E* and the absence of genetic markers *espK*, *espV*, *ureD* and/or *Z2098* associated with the potentially high virulent “*new French clone*” described recently. These strains had been considered as potential “*EHEC-like*” strains because they may acquire (or have loss) *stx*. Here, O157:H7, O103:H2 and O26:H11 STEC strains isolated from dairy products were assigned as potential pathogens. Nevertheless, the impact of dairy products environment and process on the real pathogenicity of such strains have to be investigated.

KEYWORDS

Dairy products; O157 STEC; non-O157 STEC; virulence genetic markers; PFGE macroprofiling.

ABBREVIATIONS

AEEC: Attaching and Effacing *Escherichia coli*

EHEC: Enterohemorrhagic *Escherichia coli*

STEC: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

1. INTRODUCTION

Pathogenic Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), also known as Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), are food-borne pathogens responsible for aqueous diarrhea, hemorrhagic colitis, hemolytic uremic syndrome and, in few cases, of humans death (Beutin, Geier, Steinruck, Zimmermann, & Scheutz, 1993; Werber, Beutin, Pichner, Stark, & Fruth, 2008). Because cattle (Gyles, 2007) are

natural reservoirs, STEC infections are often attributed to the consumption of food products contaminated by feces (Caprioli, Morabito, Brugère, & Oswald, 2005). Strains belonging to serogroups O157, O26 and O103 serogroups are the most frequently associated with outbreaks related to STEC (Brooks et al., 2005a). Monitoring program on STEC prevalence in raw milk cheeses conducted in 2009 showed that 0.9% of tested products were contaminated by STEC (Loukiadis et al., 2012). Interestingly, it appears that O157:H7 STEC in dairy products are lesser represented than non-O157 STEC strains such as O26 and O103 STEC strains (Farrokh et al., 2013). In 2013, Miszczycha *et al.* showed by challenge test that O157 and non-O157 STEC strains are able to survive and grow during raw milk cheese manufacturing of different type of cheeses. Nevertheless, only few epidemic cases occurred in France due to raw milk cheeses (Espié et al., 2006; Espié, Grimont, Pihier, Debré, & Pasteur, 2008) despite their large consumption in France (near 2.8 kg/year/inhab; CNIEL, 2014). While rigorous controls of dairy products are practiced, the pathogenicity of STEC strains eventually present in raw milk cheeses is still questionable.

ANSES defined in 2008 that EHEC are a STEC responsible of human disease. Then, STEC belonging to the well defined top-5 (O157, O26, O111, O103, and O145) and harboring *stx* gene and *eae*-variant related to respective serogroup is substantiated as potential high virulent STEC (Afssa, 2010; saisines 2008-SA-0122 and 2010-SA-0031). STEC carry several virulence factors to survive into the gastrointestinal tract and to develop infectious niches. Some of these genes are well described, such as Shiga toxin type 1 and 2 coding genes and the *eae* gene implicated in attaching and effacing lesions. Nevertheless, other virulence related genes, such as O-island related genes, are essential in the establishment of an ecological niche that enhances EHEC pathology (Bardiau, Labruzzo, & Mainil, 2009; Coombes, 2009; Coombes et al., 2008; Delannoy, Beutin, & Fach, 2013b). Only a few studies determined the virulome of STEC strains based on other virulence related genes than *stx1/2* and *eae* (Delannoy, Beutin, & Fach, 2013a; Delannoy, Mariani-Kurkdjian, Bonacorsi, Liguori, & Fach, 2015; Ison et al., 2015). Complementary studies aimed to define useful genetic markers to discriminate STEC strains to EHEC or avirulent *E. coli*. These works showed that the combination of gene *espK* with either *espV*, *ureD*, or *Z2098* could be used to identify typical EHECs which are *stx* and *eae*

positive (Bugarel, Beutin, & Fach, 2010; Bugarel, Beutin, Scheutz, Loukiadis, & Fach, 2011; Delannoy et al., 2013a, 2015).

To date, and to the best of our knowledge, despite the fact that dairy products might be involved in outbreaks worldwide, there is a lack of information on STEC strains isolated from dairy products. More precisely, details on potential pathogenicity of O157, O26 and O103 strains have not been studied before even if they are most important serogroups highlighted into outbreaks and the most frequent into dairy products (Farrokh et al., 2013) (<http://agriculture.gouv.fr/Role-DGAL-gestion-du-risque>).

This study was designed to characterize and compare the virulence-related genes profiles of O157:H7, O26:H11 and O103:H2 STEC strains isolated from raw milk-derived dairy products and to estimate the potentialities of such strains to be implicated into human disease.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. STEC strains and culture conditions.

In this work, according to the ANSES definitions (saisines 2008-SA-0122 and 2010-SA-0031), STEC were defined as strains harboring *stx* gene, EHEC strains were identified as STEC incriminated into human clinical infection, and AEEC correspond to *E. coli* strains that own *eae* gene but do not possess *stx* genes. Fifty-six *E. coli* O157:H7 (n=10), *E. coli* O26:H11 (n=35; comprising Attaching and Effacing *Escherichia coli* O26 [AEEC] strains (n=6) that do not possess *stx* genes) and *E. coli* O103:H2 (n=11) strains isolated in French dairy products were used in this work. Strains were previously isolated between 2008 and 2012 from food samples according to the ISO TS 13136:2012 method by the National Reference Laboratory for pathogenic *Escherichia coli* in Marcy L'Etoile, France. They were chosen according to their potential pathogenicity as described by Karmali *et al.* 2003. All strains carried the virulence genes *eae* and either *stx1* and/or *stx2*, except for O26:H11 AEEC strains. The presence of genes coding for O-antigen, H-antigen, *eae*, *stx1* and *stx2* was investigated by Taqman qPCR as previously described (Madic et al., 2010; Nielsen & Andersen, 2003;

S Perelle, Dilasser, Grout, & Fach, 2005; Sylvie Perelle, Dilasser, Grout, & Fach, 2004). The strains characteristics are reported in **Table 1**.

Frozen cultures were revived in 9 ml brain heart infusion (BHI; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) by incubation at 37°C for 24 h before isolation on plate-count agar (PCA; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) by incubation at 37°C for 24h. One colony of each strain was picked and cultured on BHI at 37°C for 24h. Fresh cultures derived from the frozen stock were used for each of the procedures carried out in this study.

2.2. PFGE typing.

Genetic relatedness of STEC strains was assessed by genomic comparison using the Standard PulseNet pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) protocol for *E. coli* O157 described by Ribot et al. 2006 (CDC.net). Agarose-embedded DNAs were digested overnight at 37°C with 20 U of *Xba*I enzyme (Promega Corp. Madison, WI). *Xba*I-digested DNA of *Salmonella enterica* serotype *Braenderup* strain H9812 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) was used as a universal molecular size marker. Restriction fragments were resolved at 14°C in 0.5× Tris-borate-EDTA (TBE) buffer on 1% Seakem gold agarose gels (FMC Bioproducts, Rockland, ME) using a pulsed-field Chef-DR-III system (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). After being stained with gel red (10 µg ml⁻¹; VWR International LLC, Pennsylvania, USA), gels were visualized by gel image digitization using Easy RH equipment (Herolab GmbH, Germany) and an image analyzer (VisioCapt-Bio1D; Fisher Bioblock Scientific, Illrisch, France). The PFGE profiles were then analyzed using Bionumerics software version 7.1 (Applied Maths, Ghent, Belgium). Dendrograms were generated using the band-based Dice similarity indices (Optimization: 0.5%; position tolerance: 1%) and the unweighted pair group method with arithmetic mean clustering.

2.3. DNA extraction.

DNA extraction was performed using the InstaGene matrix (Bio-Rad Laboratories, Marnes la Coquette, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, for each strain, one colony obtained by a 24h culture at 37°C on plate count agar was picked and suspended on 200 µL of

InstaGene matrix. Then, suspensions were incubated 15 min at 95°C. They were centrifuged 3 min at 13000 rpm and supernatants were used as matrices for high-throughput real-time PCR assays.

2.4. High-throughput real-time PCR assays.

The BioMark real-time PCR system (Fluidigm, San Francisco, CA) was used for high-throughput microfluidic real-time PCR amplification using the 48.48 dynamic arrays (Fluidigm). PCR amplifications were used to detect genes encoding Shiga toxins 1 and 2 (*stx1* and *stx2*), intimin variants (*eae-beta*, *eae-gamma*, *eae-epsilon*, and *eae-theta*) derived from the Locus of Enterocytes Effacement (LEE), effectors proteins translocated by the type III secretion system (genes of O-Island OI-122 : EspL2 [*ent* {or *espL2*}], NleB [*nleB*], NleE [*nleE*], Efa1 [*efa1*], genes of OI-50 : EspN [*espN*], EspK [*espK*], genes of OI-71 : NleA [*nleA*], EspM1 [*espM1*], NleF [*nleF*], and gene of OI-44: EspV [*espV*]), proteins associated with STEC virulence but unknown functions encoded by Z2098, Z2099 (OI-57) and Z6065 (*nleG*; CP933-P, OI-71), proteins associated with bacterial adhesion (*iha* [OI-48] and *efa1* [OI-122]) and several clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) sequences (SP_O26_C, SP_O26_D, SP_O26_E, SP_O157_A, SP_O157_B, SP_O157_C and SP_O45 / O103). The array was also designed for the detection of other putative EHEC virulence factors, such as *terE* (OI-48), implicated into tellurite resistance, *pagC* (OI-122), implicated into macrophages phagocytosis resistance, *ureD*, coding for urease (OI43/48) and for the allelic type 2 of the *arcA* housekeeping gene [*arcA-allele 2*]. The gene *wecA* was used as a reference genetic marker of *E. coli*. Cluster analysis of prevalence frequency of genes among the different serotypes was performed using a similarity coefficient (Dice correlation) and the unweighted pair group method with arithmetic mean clustering (UPGMA) graphic method using the Bionumerics software version 7.1 (Applied Maths, Ghent, Belgium). Cluster analyses of strain characters were done using the Dice similarity coefficient.

2.5. Statistics analysis

All results were treated with Bionumerics software version 7.1 (Applied Maths, Ghent, Belgium). Statistical comparisons were determined using Fisher's exact test based on the frequency of virulence

genes to define differences between gene prevalence among the different serotypes or clusters. Unless otherwise indicated, $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Macrorestriction

The phylogenetic relationship of the 56 STEC strains investigated by macrorestriction and revealed by PFGE is presented in **Figures 1, 2 and 3** (patterns of O157:H7, O103:H2 and O26:H11 strains, respectively). Except for two *E. coli* O26:H11 strains (686-141 and 857-98), none presented identical patterns. *E. coli* O157:H7 strains show the highest degree of similarity (73.0%, **Figure 1**), followed by O26:H11 strains (54.6%, **Figure 2**) and O103:H2 (48.0%, **Figure 3**). O157:H7 STEC strains were organized into four clusters presenting 90% of similarity, while O103:H2 and O26:H11 STEC strains were organized into two and seven sub-clusters respectively as defined for 80% of homology (**Figure 3**). Interestingly, all O26:H11 AEEC were clustered or associated with the sub-cluster G. No correlation was noted between PFGE patterns clusterization and year of isolation.

3.2. Virulence-related genes

A dendrogram which compares STEC virulence-related genes profiles is presented in **Figure 4**. The strains harbored between 12 and 27 genes (among the 38 genes investigated) organized into 22 distinct virulence-related gene profiles. The Analysis of these genes shows a clusterization of the different strains according to their serotypes. *E. coli* O157:H7 isolates (n=10) presented the highest degree of similarity (94%) whereas O103:H2 STEC isolates (n=11) showed 92.3% of similarity. Strains from these two serotypes presented 4 and 6 distinct virulence-related genes profiles, respectively. Two clusters were observed for *E. coli* O26:H11 strains. These clusters presented a degree of similarity of 93.3% for cluster C1 and 91.1% for cluster C2. These strains (n=35) had 12 distinct virulence gene profiles: cluster C1 presented 9 profiles (n=29) while cluster C2 (n=6) was organized into 3 profiles (**Figure 4 and Table 2**).

3.2.1. Virulence-related genes prevalence

All strains possessed a unique variant of LEE PAI *eae* gene correlated with their respective serotype: *eae-gamma* for O157:H7, *eae-beta* for O26:H11 and *eae-epsilon* for O103:H2. Gene *stx1* was present in 87% of O26:H11 STEC strains and 91% of *E. coli* O103:H2 strains but was absent from all but one *E. coli* O157:H7 strains (1/10, **Table 2**). The gene *stx1* and *stx2* were totally absent from *E. coli* O26:H11 strains in the cluster C2. The *stx2* gene was more prevalent in O157:H7 STEC strains (90%) than in all other strains studied (serotypes O26:H11 (23%) and O103:H2 (9%, $p\text{-value} < 0.001$, data not shown, **Figure 4** and **Table 2**)). Differences of virulence related genes profile were observed between the two clusters of *E. coli* O26:H11 strains.

All STEC strains studied carried the OI-122 genes *ent*, *nleB*, *nleE* and *efa1*. Data showed that the gene *pagC*, implicated into resistance against macrophages bacteriolysis, was more represented in O157:H7 STEC strains (100%) than in O103:H2 strains (45%, $p\text{-value} < 0.05$, data not shown, **Table 2**). In contrary, none *E. coli* O26:H11 strains investigated possessed this gene.

No difference of prevalence for the genes in OI-44, OI-48, OI-50 and OI-57 was noted between the three STEC serotypes studied. Nevertheless, none of these genes but two (*espN* [OI-50; 17%] and *Z2098* [OI-57; 17%]) were carried by AEEC strains in the O26:H11 Cluster C2 (**Table 2**).

O26:H11 strains did not possess the gene *Z6065* among OI-71 genes (**Table 2**). Our work shows that this gene was more prevalent in O103:H2 strains (92%) than in O157:H7 strains (40%, $p\text{-value} < 0.05$, data not shown, **Figure 4** and **Table 2**). The *nleF* gene, implicated into modulation of eukaryotic apoptosis, was significantly more prevalent in O26:H11 STEC strains than O157:H7 STEC strains (**Table 2**, $p\text{-value} < 0.001$, data not shown). *E. coli* O103:H2 did not carry the genes *nleF*, *nleA* nor *espM1* genes (OI-71). These two last genes were present in 100% of both *E. coli* O26:H11 and O157:H7 strains (**Figure 4** and **Table 2**).

3.2.2. Genetic markers association

All STEC O157:H7 strains isolated from dairy products possess *espK*, *Z2098*, *espV* and *ureD* (**Table 3**). All O103:H2 strains but one, lacking the *espK* gene, owned concomitantly *espK*, *ureD*, *Z2098* and *espV* (**Table 3**). All O26:H11 STEC strains from the cluster C1 carried the gene *espK*, *ureD* and *Z2098*. Two strains in this cluster C1 did not harbor *espV*. None of strains in the cluster C2 harbored *espK*, *espV*, *ureD* and *Z2098* genes (**Figure 4 and Table 3**).

3.2.3. CRISPR

All STEC strains investigated possess CRISPR polymorphisms into their genome according to their serotype. All O157:H7 STEC strains are positive for the *SP_O157_A* CRISPR_{O157:H7}, *SP_O157_B* CRISPR_{O157:H7} and *SP_O157_C* CRISPR_{O157:H7} PCR tests (**Figure 4**). All O103:H2 STEC strains gave a positive reaction with the *SP_O45 / O103* CRISPR_{O45 / O103} PCR test. The CRISPR_{O26:H11} PCR tests presented different results. Indeed, the CRISPR_{O26:H11} PCR tests *SP_O26_C* and *D* were positive in 25/29 of strains of cluster C1 but were negative in AEEC strains in cluster C2. Two strains of this cluster C1 were positive for *SP_O26_C* only and two other strains for *SP_O26_D* only. Conversely, the CRISPR_{O26:H11} *SP_O26_E* PCR test detected 100% of the strains from cluster C2 while none of strains from cluster C1 owned this gene (**Table 2**).

4. Discussion

The subject of the present work was to give more information related to the genetic diversities and to the potential of pathogenicity of STEC strains isolated from dairy products matrices.

PFGE patterns of STEC strains investigated revealed that they were not related, except for two *E. coli* O26:H11. These two strains were isolated from the same place and at the same time. Data obtained by virulome analysis defined them as clones since they presented identical genetic markers profiles. These data also demonstrated a high diversity of macroprofiles in the three serotypes investigated. While certain unrelated strains were isolated at same period, several profiles were detected by PFGE pulsotyping. These data suggested that several STEC clones circulated among the French dairy

products in same time. The virulome analysis showed that strains of the same serotype presented analogous virulence-related genes profiles independently to the fact that they were not associated to the same PFGE phylotype and that they had not been isolated at the same period. Interestingly, O26:H11 strains which are grouped in C2-cluster by PCR analysis also belonged to cluster G by PFGE.

It was estimated that combination of several genes may be a signature of EHEC pathotypes. Indeed, Delannoy et al., 2013a and 2013b showed that the combinations of the following genetic markers: *espK* and/or *ureD*, *espK* and/or *Z2098*, *espK* and/or *espV* was detected in 98.8%, 97.9% and 98.5% of EHEC strains, respectively. No strain investigated in our study was related to outbreaks. Nevertheless, these three combinations of genetic markers were detected into 100% (50/50) of STEC strains investigated. In our study, these genetic markers were not detected in the 6 AEEC O26:H11 strains. Nevertheless, STEC strains isolated from dairy product investigated in our work carried the signatures related to EHEC pathotype and suggest that that they are potentially virulent.

More precisely, STEC O157:H7 isolates carried more virulence genes than STEC O26:H11 strains which carried more virulence genes than O103:H2 strains. Similar data have been observed in STEC/EHEC strains isolated from other origins than dairy products (Brooks et al., 2005b; FSIS, 2012; Ogura et al., 2009). STEC strains investigated in this study also possessed different *eae* subtypes and CRISPR based PCR results which are correlated with their serotypes. Such data have also been described elsewhere for EHEC strains (Beutin, Krause, Zimmermann, Kaulfuss, & Gleier, 2004; Delannoy, Beutin, & Fach, 2012; Shen et al., 2015).

The absence of genetic markers *stx*, *espK*, and *arcA* associated with O26 *wzx* and *eae-beta* in O26:H11 AEEC strains can be used to discriminate EHEC and EHEC-like from avirulent *E. coli* (Bugarel et al., 2011; Miko, Lindstedt, Brandal, Løbersli, & Beutin, 2010). In our study, presence of this pattern for 86.7% of O26:H11 STEC strains investigated demonstrate the potential hazard of STEC strains in dairy products (Bugarel et al., 2011; Delannoy et al., 2013a, 2015; Neto et al., 2011). The fact that *arcA-allele2* gene was detected in 100% of O26:H11 STEC and 50% of AEEC strains studied suggest

that they may belong to the potentially “*highly virulent*” cluster A (Miko et al., 2010). In addition, O26:H11 STEC strains appear to be depleted for *pagC*, a gene that enhanced STEC survival into macrophages (Vieira et al., 2010). This gene, associated with other genes of the PAI OI122, has been described to be highly associated with virulence and disease severity (Karmali et al., 2003). O26:H11 STEC strains remain the major serotype isolated from dairy products. Such depletion, associated with a low proportion of *stx2* gene in these strains might be a way to investigate in order to elucidate a potential diminution of pathogenicity. The presence of CRISPR_{O26:H11} *SP_O26_C* and/or *SP_O26_D* in all O26:H11 STEC also substantiates their classification as potential high virulent strain for humans (Delannoy et al., 2012, 2015). A recent study identified a new pathogenic O26:H11 clone (ST29) emerging in France (called ‘French clone’), that tested positive for both the CRISPR *SP_O26_E* and for either the *stx2a* or *stx2d* gene but negative for the genetic markers *espK*, *Z2098*, *ureD* and *espV* (Delannoy et al., 2015). Presence of this newly virulent O26:H11 ‘French clone’ has already been reported in foodstuffs by our team (Ganet et al., 2014, 2015). None of the O26 AEEC strains tested in this study neither possessed genes *espK*, *Z2098*, *ureD*, *espV* nor *stx2* but all of them harbored *SP_O26_E*. A recent study in the US on O26 AEEC strains revealed the same profile and has underlined the similarity of such O26 AEEC strains with the new virulent ‘French clone’ (Ison et al., 2015). *E. coli* O26 strains are well known to present a high genomic plasticity that facilitates the loss or acquisition of genetic mobile element such as the *stx* genes carried by phages (Bugarel et al., 2011; Delannoy et al., 2015; Ison et al., 2015; Miko et al., 2010). However, similarity of the genetic profiles between these O26 AEEC strains and the ‘French clone’ substantiates their classification as EHEC-like strains.

All O157:H7 STEC strains isolated from dairy products owned all virulence-related genes investigated. The genes *nleF* and *Z6065* from OI-71 were detected in 40% of STEC O157:H7. Bugarel *et al* (2010) showed the same genes variation among O157:H7/NM strains isolated from other origins than dairy products (human, cattle farm environment and food; Bugarel et al., 2010). Association of genetic markers-related to EHEC pattern (*espK/espV*, *espK/ureD* and *espK/Z2098*) was present for 100% of our strains. This indicates that O157:H7 strains isolated from dairy products presented

virulence profiles analogies with EHEC and STEC isolated from other sources. Nonetheless, it is important to underline that this serotype appears to be less frequently isolated in dairy products than other non-O157 STEC strains (e.i. O26:H11 and O103:H2; Farrokh et al., 2013).

Even if *E. coli* O103:H2 strains are associated with severe human illness, they are less characterized in the literature than O157:H7 and O26:H11 STEC isolates. (Loukiadis et al., 2012; Mariani-Kurkdjian et al., 1993; Tarr et al., 1996). PCR primers targeting the main variant of *nleA* gene (Bugarel et al., 2010; Creuzburg & Schmidt, 2007) did not allowed its detection in the studied strains. NleA is a protein implicated into shunt of eukaryotic cell secretion in order to maintain EHEC extracellular lifestyle (Kim et al., 2007). A depletion of this gene might diminish pathogenicity of O103:H2 STEC isolated from dairy products. In addition, the absence of O1-71-borne gene *nleF* and *espM1* was described for O103:H2 STEC isolated from other origins than dairy products, including human cases-related strains (Bugarel et al., 2010). Therefore, it is for the first time described for strains originated from raw milk dairy products. Nevertheless it is interesting to note that among this O-Island, only Z6065 was represented in strains of this serotype. The fact that 100% of strains investigated were found positive for the combination *espK/ureD*, *espK/espV* and *espK/Z2098* EHEC-related patterns indicate that the virulence profile of O103:H2 STEC strains isolated from dairy products was similar to that of O103:H2 clinical isolates.

5. Conclusions

In conclusion, our results on PCR-based analysis shows that the virulence gene profiles of O157:H7, O26:H11 and O103:H2 STEC strains isolated from dairy products were similar to the profiles of strains isolated from human isolates (Bugarel et al., 2011; Delannoy et al., 2012, 2013a). Analysis of the combinations of genetic markers highly associated with typical EHEC (Delannoy et al., 2013a) would suggest that STEC O157:H7, O26:H11 and O103:H2 investigated and isolated from dairy products might be potential highly pathogenic. These data also implement knowledge on STEC strains isolated from dairy products and could be useful to establish suitable risk assessment.

Acknowledgments

This research was funded by la region Auvergne, DRAAF Auvergne CPER and the Direction Generale de l'Alimentation (DGAL) from French ministry of Agriculture. We also want to thanks all the staff of the French pathogenic *E. coli* National Reference Laboratory for isolation of strains investigated in this work.

References

- Afssa. (2010). Afssa – Saisine n ° 2010-SA-0031 Saisine liée n ° 2008-SA-0122 de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis Afssa du 15 juillet 2008. Afss.
- Bardiau, M., Labrozzi, S., & Mainil, J. G. (2009). Putative adhesins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serogroup O26 isolated from humans and cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(7), 2090–6. doi:10.1128/JCM.02048-08
- Beutin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S., & Scheutz, F. (1993). Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.*, 31(9), 2483–2488. Retrieved from <http://jcm.asm.org/content/31/9/2483.short>
- Beutin, L., Krause, G., Zimmermann, S., Kaulfuss, S., & Gleier, K. (2004). Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Human Patients in Germany over a 3-Year Period. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), 1099–1108. doi:10.1128/JCM.42.3.1099-1108.2004
- Brooks, J. T., Sowers, E. G., Wells, J. G., Greene, K. D., Griffin, P. M., Hoekstra, R. M., & Strockbine, N. A. (2005a). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(8), 1422–9. doi:10.1086/466536
- Brooks, J. T., Sowers, E. G., Wells, J. G., Greene, K. D., Griffin, P. M., Hoekstra, R. M., & Strockbine, N. A. (2005b). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(8), 1422–9. doi:10.1086/466536
- Bugarel, M., Beutin, L., & Fach, P. (2010). Low-density microarray targeting non-locus of enterocyte effacement effectors (nle genes) and major virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): A new approach for molecular risk assessment of STEC isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), 203–211. doi:10.1128/AEM.01921-09
- Bugarel, M., Beutin, L., Scheutz, F., Loukiadis, E., & Fach, P. (2011). Identification of genetic markers for differentiation of Shiga toxin-producing, enteropathogenic, and avirulent strains of *Escherichia coli* O26. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2275–81. doi:10.1128/AEM.02832-10
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H., & Oswald, E. (2005). Review article Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission, 36, 289–311. doi:10.1051/vetres
- CNIEL. (2014). L'économie laitière en chiffres.
- Coombes, B. K. (2009). Type III secretion systems in symbiotic adaptation of pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Trends in Microbiology*, 17(3), 89–94. doi:10.1016/j.tim.2008.11.006
- Coombes, B. K., Wickham, M. E., Mascarenhas, M., Gruenheid, S., Finlay, B. B., & Karmali, M. A. (2008). Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-

producing *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 2153–60. doi:10.1128/AEM.02566-07

Creuzburg, K., & Schmidt, H. (2007). Molecular characterization and distribution of genes encoding members of the type III effector *nleA* family among pathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(8), 2498–507. doi:10.1128/JCM.00038-07

Delannoy, S., Beutin, L., & Fach, P. (2012). Use of clustered regularly interspaced short palindromic repeat sequence polymorphisms for specific detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of serotypes O26:H11, O45:H2, O103:H2, O111:H8, O121:H19, O145:H28, and O157:H7 by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12), 4035–40. doi:10.1128/JCM.02097-12

Delannoy, S., Beutin, L., & Fach, P. (2013a). Discrimination of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) from non-EHEC strains based on detection of various combinations of type III effector genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), 3257–62. doi:10.1128/JCM.01471-13

Delannoy, S., Beutin, L., & Fach, P. (2013b). Towards a molecular definition of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): detection of genes located on O island 57 as markers to distinguish EHEC from closely related enteropathogenic *E. coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(4), 1083–8. doi:10.1128/JCM.02864-12

Delannoy, S., Mariani-Kurkdjian, P., Bonacorsi, S., Liguori, S., & Fach, P. (2015). Characteristics of emerging human-pathogenic *Escherichia coli* O26:H11 strains isolated in France between 2010 and 2013 and carrying the *stx2d* gene only. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(2), 486–92. doi:10.1128/JCM.02290-14

Espié, E., Grimont, F., Pihier, N., Debré, H. R., & Pasteur, I. (2008). Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurised cows cheese , France , 2005, 11(0), 94415.

Espié, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H., & Vernozy-Rozand, C. (2006). *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiology and Infection*, 134(1), 143–6. doi:10.1017/S0950268805004887

Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., ... Cerf, O. (2013). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*, 162(2), 190–212. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008

FSIS. (2012). Risk Profile for Pathogenic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, (May).

Ganet, S., Mariani-Kurkdjian, P., Delannoye, S., Fach, P., Bonacorsi, S., & Loukiadis, E. (2014). Etude des caractérisations génétiques et phénotypiques des souches STEC isolées en France, chez l'homme, l'animal et les aliments (TYPSTEC). Convention de Recherche et Développement (CRD) ANSES/VETAGRO SUP/Hôpital Robert Debré, 2012-CRD-0.

Ganet, S., Mariani-Kurkdjian, P., Delannoye, S., Fach, P., Bonacorsi, S., & Loukiadis, E. (2015). Genetic and phenotypic characteristics of STEC strains isolated in human, food, and animal reservoir in France during the period 2011- 2012. VTEC Symposium 2015.

Gyles, C. L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science*, 105(13 Suppl), E45–62. doi:10.2527/jas.2006-508

Ison, S. A., Delannoy, S., Bugarel, M., Nightingale, K. K., Webb, H. E., Renter, D. G., ... Fach, P. (2015). Genetic Diversity and Pathogenic Potential of Attaching and Effacing *Escherichia coli* O26:H11 Strains Recovered from Bovine Feces in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(11), 3671–8. doi:10.1128/AEM.00397-15

Karmali, M. A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-smith, R., ... Isaac-renton, J. (2003). 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 Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocyto. doi:10.1128/JCM.41.11.4930

Kim, J., Thanabalasuriar, A., Chaworth-Musters, T., Fromme, J. C., Frey, E. A., Lario, P. I., ... Gruenheid, S. (2007). The bacterial virulence factor NleA inhibits cellular protein secretion by disrupting mammalian COPII function. *Cell Host & Microbe*, 2(3), 160–71. doi:10.1016/j.chom.2007.07.010

Loukiadis, E., Callon, H., Mazuy-Cruchaudet, C., Vallet, V., Bidaud, C., Ferré, F., ... Danan, C. (2012). Surveillance des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) dans les denrées alimentaires en France (2005-2011). *Bulletin épidémiologique ANSES*, 55.

Madic, J., Peytavin de Garam, C., Vingadassalon, N., Oswald, E., Fach, P., Jamet, E., & 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. *Journal of Applied Microbiology*, 109(5), 1696–705. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04798.x

Mariani-Kurkdjian, P., Denamur, E., Milon, A., Picard, B., Cave, H., Lambert-Zechovsky, N., ... Elion, J. (1993). Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of hemolytic-uremic syndrome in France. *J. Clin. Microbiol.*, 31(2), 296–301. Retrieved from <http://jcm.asm.org/content/31/2/296.short>

Miko, A., Lindstedt, B.-A., Brandal, L. T., Løbersli, I., & Beutin, L. (2010). Evaluation of multiple-locus variable number of tandem-repeats analysis (MLVA) as a method for identification of clonal groups among enteropathogenic, enterohaemorrhagic and avirulent *Escherichia coli* O26 strains. *FEMS Microbiology Letters*, 303(2), 137–46. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01874.x

Miszczyscha, S. D., Perrin, F., Ganet, S., Jamet, E., Tenenhaus-Aziza, F., Montel, M.-C., & Thevenot-Sergentet, D. (2012). Behavior of Different Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes in Various Experimentally Contaminated Raw-Milk Cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 150–158. doi:10.1128/AEM.02192-12

Neto, M., Delannoy, S., Auvray, F., Oswald, E., Fach, P., & Loukiadis, E. (2011). Public health significance of *E. coli* O26 isolated from foodstuffs: toward genetic predictors of their virulence. In *Zoonoses and Public Health* (Vol. 59, p. 32).

Nielsen, E. M., & Andersen, M. T. (2003). Detection and Characterization of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* by Automated 5' Nuclease PCR Assay Detection and Characterization of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* by Automated 5J Nuclease PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7). doi:10.1128/JCM.41.7.2884

Ogura, Y., Ooka, T., Iguchi, a., Toh, H., Asadulghani, M., Oshima, K., ... Hayashi, T. (2009). Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(42), 17939–17944. doi:10.1073/pnas.0903585106

Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., & 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. *Molecular and Cellular Probes*, 18(3), 185–192. doi:10.1016/j.mcp.2003.12.004

Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., & Fach, P. (2005). Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, 98(5), 1162–8. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02545.x

Ribot, E. M., Fair, M. A., Gautom, R., Cameron, D. N., Hunter, S. B., Swaminathan, B., & Barrett, T. J. (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(1), 59–67. doi:10.1089/fpd.2006.3.59

Shen, J., Rump, L., Ju, W., Shao, J., Zhao, S., Brown, E., & Meng, J. (2015). Virulence characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from food, human and animals. *Food Microbiology*. doi:10.1016/j.fm.2015.02.007

Tarr, P. I., FOUSSER, L. S., STAPLETON, A. E., WILSON, R. A., KIM, H. H., VARY, J. C., & CLAUSEN, C. R. (1996). Hemolytic–Uremic Syndrome in a Six-Year-Old Girl after a Urinary Tract Infection with Shiga-Toxin–Producing *Escherichia coli* O103:H2 — NEJM. *The New England Journal of Medicine*. Retrieved September 24, 2015, from <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199608293350905>

Vieira, M. A. M., Salvador, F. A., Silva, R. M., Irino, K., Vaz, T. M. I., Rockstroh, A. C., ... Gomes, T. A. T. (2010). Prevalence and characteristics of the O122 pathogenicity island in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1452–5. doi:10.1128/JCM.01944-09

Werber, D., Beutin, L., Pichner, R., Stark, K., & Fruth, A. (2008). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in food and patients, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 14(11), 1803–6. doi:10.3201/eid1411.080361

Table 1: Details of STEC strains used in this study

Figure 1: Dendrogram of *Xba*I macrorestriction genomic profiles comparison of O157:H7 STEC strains isolated from dairy products.

Figure 2: Dendrogram of *Xba*I macrorestriction genomic profiles comparison of O103:H2 STEC strains isolated from dairy products.

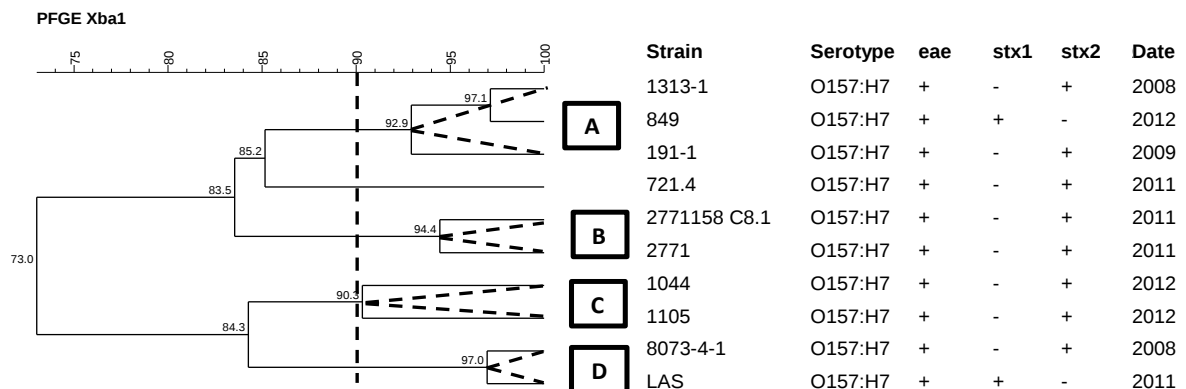
Figure 3: Dendrogram of *Xba*I macrorestriction genomic profiles comparison of O26:H11 STEC strains isolated from dairy products.

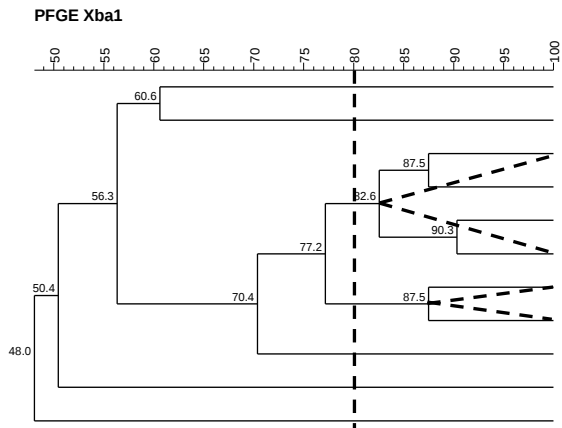
Figure 4: Dendrogram representatives to the virulence-related genes profiles of strains belonged to serotypes O157:H7 (n=10, [Diamonds]), O26:H11 (n=35, [Circles]) and O103:H2 (n=11, [Stars]) and isolated from raw dairy products. Grey square: presence of the gene; White square: absence of the gene.

Table 2: STEC strains virulence genes prevalence comparison between STEC strains isolated from dairy products and belonging to serotypes O157:H7, O26:H11 and O103:H2. Virulence genes prevalence of the three serotypes investigated according to their clusterization (**Figure 4**). Frequencies are shown in a three-color scale as described in the legend. **OI**: O-Island; **Hk**: Housekeeping gene.

Table 3: Frequencies of combination of genes in accordance to the serotype investigated. Association of genetic markers related to EHEC O26:H11 strains.

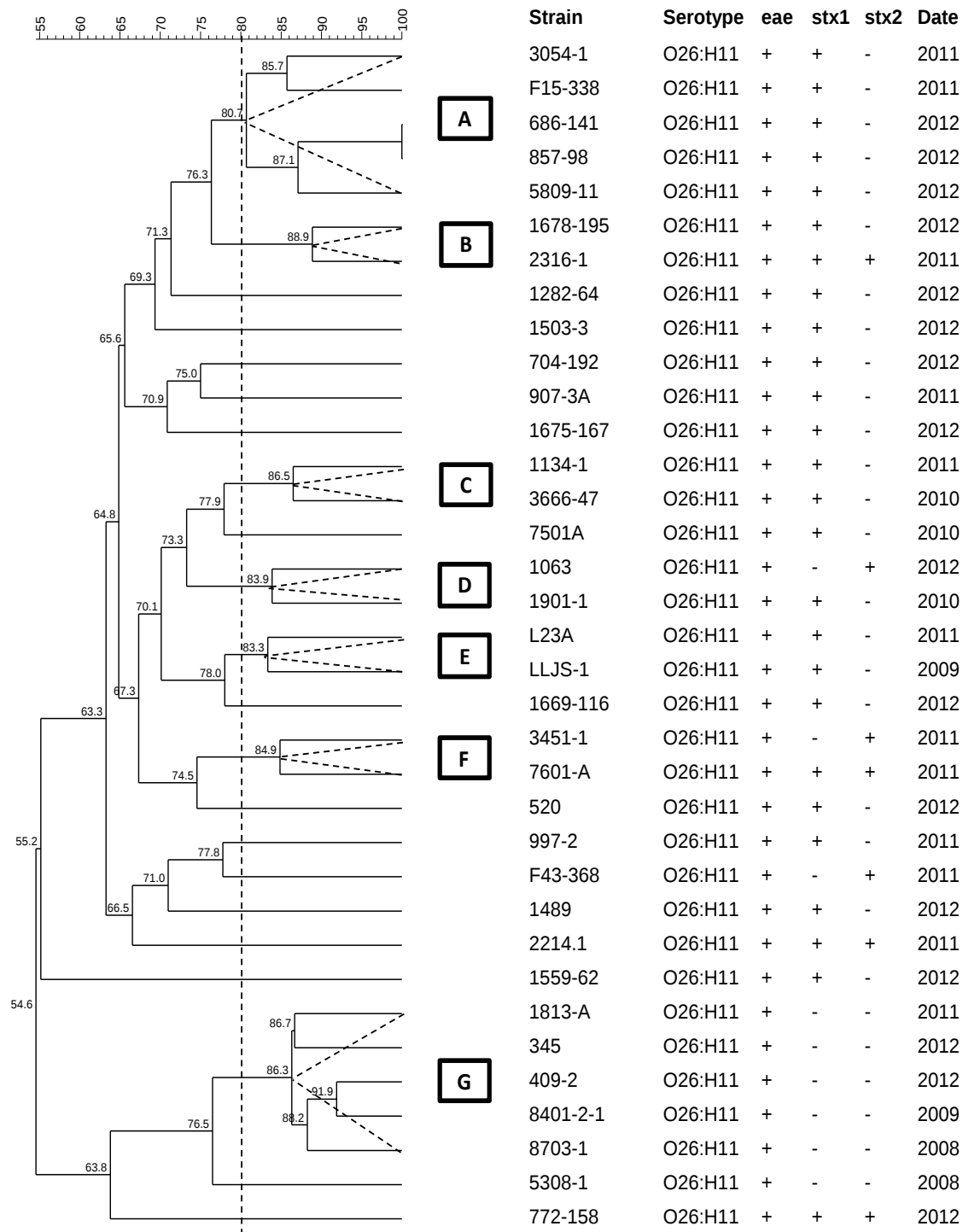
Strain	Serotype	eae	stx1	stx2	Origin	Year	Strain	Serotype	eae	stx1	stx2	Origin	Year
1144	O103:H2	+	-	+	Sheep Raw Milk Cheese	2012	1559-62	O26:H11	+	+	-	Bovine Raw Milk Cheese	2012
1260-8-1	O103:H2	+	+	-	Sheep Raw Milk	2011	1669-116	O26:H11	+	+	-	Bovine Raw Milk Cheese	2012
1407-21	O103:H2	+	+	-	Raw Milk Cheese	2012	1675-167	O26:H11	+	+	-	Bovine Raw Milk Cheese	2012
1517-44	O103:H2	+	+	-	Bovine Raw Milk Cheese	2012	1678-195	O26:H11	+	+	-	Bovine Raw Milk Cheese	2012
2217-1A	O103:H2	+	+	-	Sheep Raw Milk	2011	1813-A	O26:H11	+	-	-	Bovine Raw Milk	2011
2454-11	O103:H2	+	+	-	Raw Milk Cheese	2011	1901-1	O26:H11	+	+	-	Bovine Raw Milk Cheese	2010
280-9	O103:H2	+	+	-	Bovine Raw Milk	2012	2214.1	O26:H11	+	+	+	Sheep Raw Milk	2011
3925-C	O103:H2	+	+	-	Raw Milk Cheese	2010	2316-1	O26:H11	+	+	+	Raw Milk Cheese	2011
875-1A	O103:H2	+	+	-	Bovine Raw Milk	2011	3054-1	O26:H11	+	+	-	Raw Milk Cheese	2011
F12-98-3	O103:H2	+	+	-	Raw Milk Cheese	2011	3451-1	O26:H11	+	-	+	Bovine Raw Milk Cheese	2011
F73120	O103:H2	+	+	-	Raw Milk Cheese	2011	3666-47	O26:H11	+	+	-	Bovine Raw Milk	2010
849	O157:H7	+	+	-	Raw Milk Cheese	2012	409-2	O26:H11	+	-	-	Raw Milk Cheese	2012
1044	O157:H7	+	-	+	Raw Milk Cheese	2012	5308-1	O26:H11	+	-	-	Bovine Raw Milk Cheese	2008
1105	O157:H7	+	-	+	Raw Milk Cheese	2012	5809-11	O26:H11	+	+	-	Raw Milk Cheese	2012
2771	O157:H7	+	-	+	Raw Milk Cheese	2011	686-141	O26:H11	+	+	-	Raw Milk Cheese	2012
1313-1	O157:H7	+	-	+	Bovine Raw Milk Cheese	2008	704-192	O26:H11	+	+	-	Sheep Raw Milk Cheese	2012
191-1	O157:H7	+	-	+	Raw Milk Cheese	2009	7501A	O26:H11	+	+	-	Raw Milk Cheese	2010
2771158 C8.1	O157:H7	+	-	+	Raw Milk Cheese	2011	7601-A	O26:H11	+	+	+	Raw Milk Cheese	2011
721.4	O157:H7	+	-	+	Raw Milk	2011	772-158	O26:H11	+	+	+	Bovine Raw Milk Cheese	2012
8073-4-1	O157:H7	+	-	+	Raw Milk Cheese	2008	8401-2-1	O26:H11	+	-	-	Bovine Raw Milk	2009
LAS	O157:H7	+	+	-	Sheep Raw Milk Cheese	2011	857-98	O26:H11	+	+	-	Raw Milk Cheese	2012
345	O26:H11	+	-	-	Bovine Raw Milk Cheese	2012	8703-1	O26:H11	+	-	-	Raw Milk	2008
520	O26:H11	+	+	-	Sheep Raw Milk Cheese	2012	907-3A	O26:H11	+	+	-	Bovine Raw Milk	2011
1063	O26:H11	+	-	+	Bovine Raw Milk Cheese	2012	997-2	O26:H11	+	+	-	Bovine Raw Milk Cheese	2011
1489	O26:H11	+	+	-	Bovine Raw Milk Cheese	2012	F15-338	O26:H11	+	+	-	Raw Milk Cheese	2011
1134-1	O26:H11	+	+	-	Raw Milk Cheese	2011	F43-368	O26:H11	+	-	+	Raw Milk Cheese	2011
1282-64	O26:H11	+	+	-	Raw Milk Cheese	2012	L23A	O26:H11	+	+	-	Raw Milk	2011
1503-3	O26:H11	+	+	-	Bovine Raw Milk Cheese	2012	LLJS-1	O26:H11	+	+	-	Bovine Raw Milk	2009





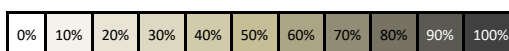
Strain	Serotype	eae	stx1	stx2	Date
1407-21	O103:H2	+	+	-	2012
2217.1A	O103:H2	+	+	-	2011
1517-44	O103:H2	+	+	-	2012
F73120	O103:H2	+	+	-	2011
1144	O103:H2	+	-	+	2012
F12-98-3	O103:H2	+	+	-	2011
280-9	O103:H2	+	+	-	2012
3925-C	O103:H2	+	+	-	2010
875-1A	O103:H2	+	+	-	2011
2454-11	O103:H2	+	+	-	2011
1260-8-1	O103:H2	+	+	-	2011

PFGE Xba1



		O157:H7	O103:H2	C1-O26:H11	C2-O26:H11
LEE PAI	<i>eae-gamma</i>	100%	0%	0%	0%
	<i>eae-epsilon</i>	0%	100%	0%	0%
	<i>eae-beta</i>	0%	0%	100%	100%
OI-122	<i>efa1</i>	100%	100%	100%	100%
	<i>ent</i>	100%	100%	100%	100%
	<i>pagC</i>	100%	42%	0%	0%
	<i>nleB</i>	100%	100%	100%	100%
	<i>nleE</i>	100%	100%	100%	100%
OI-44	<i>espV</i>	100%	100%	93%	0%
OI-48	<i>iha</i>	100%	92%	100%	0%
	<i>terE</i>	100%	100%	100%	0%
	<i>ureD</i>	100%	100%	97%	0%
OI-50	<i>espK</i>	100%	92%	100%	0%
	<i>espN</i>	100%	92%	100%	17%
OI-57	Z2098	100%	100%	100%	0%
	Z2099	100%	100%	100%	17%
OI-71	<i>espM1</i>	100%	0%	97%	100%
	<i>nleA</i>	100%	0%	100%	100%
	<i>nleF</i>	40%	0%	97%	100%
	Z6065	40%	92%	0%	0%
CRISPR	SP_O157_A	100%	0%	0%	0%
	SP_O157_B	100%	0%	0%	0%
	SP_O157_C	100%	0%	0%	0%
	SP_O45 / O103	0%	100%	0%	0%
	SP_O26_C	0%	0%	93%	0%
	SP_O26_D	0%	0%	93%	0%
	SP_O26_E	0%	0%	0%	100%
Hk	<i>arcA-allele2</i>	100%	0%	100%	50%

Three color scale legend:



Genes association	All strains	STEC strains (Without AEEC)	O103:H2	O157:H7	C1-O26:H11	C2-O26:H11
<i>espK/ureD</i>	89.3%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	0,0%
<i>espK/Z2098</i>	89.3%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	0,0%
<i>espK/espV</i>	89.3%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	0,0%
SP_O26_E	10.7%	-	-	-	0%	100%

CHAPITRE 3. INTERACTIONS STEC-MATRICE LAITIERE : GLOBULES GRAS ET OLIGOSACCHARIDES ASSOCIES

Ce chapitre vise à déterminer si les globules gras du lait réduisent les capacités d'adhésion des STEC à la barrière intestinale.

1. Inhibition de l'adhésion des EHEC à la barrière intestinale liée aux interactions bactéries-glycoconjugués associés à la membrane des globules gras du lait

1.1. Introduction

La liste des facteurs de virulence et mécanismes impliqués dans la pathogénicité des EHEC n'est pas encore totalement connue. Même si les Shiga toxines (Stx) sont des facteurs de virulence « *sine qua non* » chez les EHEC, des propriétés complémentaires, y compris la capacité à adhérer à l'épithélium intestinal et à coloniser l'intestin, contribuent indéniablement au processus de pathogénicité. Pour coloniser efficacement le tractus digestif humain et provoquer des symptômes, de nombreuses bactéries pathogènes ont développé des stratégies d'attachement ou d'adhésion aux cellules hôtes (Ofek et al., 2003; Nataro et al., 2005). L'adhésion est nécessaire aux micro-organismes afin qu'ils ne soient pas éliminés par les mécanismes naturels de défense de l'hôte. En conséquence, la plupart des souches EHEC typiques sont définies par la présence du gène *eae*. Celui-ci code une protéine de la membrane externe (intimine) responsable de la fixation et de l'interaction entre les bactéries et les cellules épithéliales de l'intestin, conduisant à la formation de lésions d'attachement (AE). De

nombreuses autres adhésines participant à l'adhésion des EHEC ont été décrites (Klemm et al. 2010, Bouckaert et al., 2005).

Des composés alimentaires agissent en tant qu'inhibiteurs de l'adhésion des bactéries pathogènes intestinales. Différentes études ont montré que le lait et les fromages possèdent une grande variété de composés bénéfiques pour la santé comme les carbohydrates (Boehm & Stahl, 2007; Lis & Sharon, 1998; Rivero-Urgell & Santamaria-Orleans, 2001; Tao et al., 2008). En effet, il a été montré que les glycanes du lait inhibent l'adhésion des bactéries puisqu'ils contiennent des oligo saccharides similaires à ceux retrouvés sur les récepteurs des cellules intestinales (Bao & Zhu 2007; Newburg et al. 2005). A ce jour, aucune étude scientifique n'a étudié les propriétés anti adhésives des globules gras (GG) contre les EHEC. En France, les données issues du plan de surveillance de 2009 montrent une prévalence de souches STEC de 0,9%. Néanmoins, les fromages au lait cru ont rarement été impliqués dans une épidémie (www.invs.sante.fr/). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que des souches EHEC pourraient être associées aux globules gras des produits laitiers. Cette association entrainerait une diminution de l'adhésion des EHEC aux entérocytes.

Les objectifs de nos travaux étaient (i) d'étudier l'association des EHEC avec les globules gras du lait, et (ii) d'évaluer les propriétés anti-adhésives des globules gras du lait et du fromage dans l'environnement digestif. L'association des EHEC avec les globules gras du lait a été étudiée par des expérimentations de décantation de laitensemencé par des EHEC et par des observations microscopiques de lait. Les capacités anti adhésives des globules gras de lait et de fromage en environnement digestif ont été évaluées grâce à des modèles complémentaires *in vitro* et *in vivo*.

1.2. Matériels et méthodes

1.2.1. Souches bactériennes utilisées

Les souches EHEC O157:H7 EDL933 et O26:H11 21765 ainsi que des mutants naturellement résistants à 225 µg/mL de streptomycine en Bouillon Cœur Cerveau (BHI; BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) de ces souches, O157:H7 EDL933 SR225 et O26:H11 21765 SR225, ont été utilisées pour cette étude.

1.2.2. Localisation des EHEC dans les phases de lait

Afin d'observer s'il existe des associations physiques entre les EHEC et les GG du lait, des observations au microscope à épifluorescence de lait contaminé par les EHEC marqués par des anticorps spécifiques couplés au FITC (fluorescein isothiocyanate) ont été mises en oeuvre. Par ailleurs, pour définir quelle proportion de la population d'EHEC se retrouve au niveau de la matière grasse du lait, des expériences de décantations passives de lait cru (séparation de la phase grasse de la phase écrémée) contaminé par différents taux d'EHEC O26:H11 ou O157:H7 ont été réalisées pour séparer la phase grasse de la phase écrémée.

1.2.3. Effet des GG du lait sur les capacités d'adhésion des EHEC à des cellules intestinales Caco-2 et HT29-MTX (9.1) co-cultivées *in vitro*

Des tests d'adhésion des EHEC O26:H11 et O157:H7, en présence de lait entier ou de lait écrémé cru ou UHT, à des cellules Caco-2 et HT29-MTX en co-culture ont été réalisés pour définir les capacités anti-adhésives des GG du lait à la barrière intestinale. Par ailleurs, afin de déterminer l'impact des glycoconjugués associés au GG sur l'adhésion des EHEC, nous avons contaminé expérimentalement différents types de laits : du lait entier (présence de GG) et du lait écrémé (absence de GG) et ayant subi différents process : lait cru (GG natif) ou lait UHT (GG dont les sucres sont détruits).

Le tropisme des EHEC pour les mucines a également été déterminé par des observations au microscope à épifluorescence d'un tapis cellulaire Caco-2/HT29-MTX (9.1) contaminé avec du lait cru contenant 7 log UFC/mL de O26:H11 21765.

1.2.4. Effet des GG du fromage sur les capacités d'adhésion des EHEC au tractus digestif de souris traitées à la streptomycine

Des tests d'adhésion au tractus digestif d'EHEC dans une matrice fromagère appauvrie ou non en GG ont été réalisés en modèle souris traitées à la streptomycine. Les animaux ont été habitués à manger du fromage contenant ou non des globules gras pendant une semaine dans des cages individuelles, sans litière et avec du matériel de nidification papier. A J-2 et jusqu'à la fin de l'expérience (J7), l'eau de boisson des animaux a été remplacée par une solution de sulfate de streptomycine à 5 g/L afin de diminuer leur flore intestinale anaérobie

facultative. A J0, les souris ont été placées dans des cages propres et leur alimentation a été remplacée par 2 à 3g de fromage contenant ou non des GG et contaminé avec les souches d'EHEC O157:H7 EDL933 SR225 ou O26:H11 21765 SR225 pendant 12h. Les souris ont ensuite eu accès à l'aliment *ad libitum*.

Les mécanismes impliqués dans l'inhibition de l'adhésion des EHEC à la barrière intestinale murine ont été étudiés sur des animaux préalablement nourris avec du fromage contenant ou non des globules gras. Une partie de ces animaux a été inoculée avec une suspension d'EHEC O157:H7 EDL933 par voie intra-gastrique, les autres par ingestion de fromage contenant ou non des globules gras et artificiellement contaminés avec EDL933. L'excrétion des EHEC a été suivie par rt-qPCR de l'antigène O sur des prélèvements de fèces quotidiens.

Les fèces des souris ont été récoltées quotidiennement à heure fixe et les cages des animaux ont été nettoyées de manière à ce que les fèces n'aient pas plus de 24h. A J7, les animaux ont été euthanasiés et les intestins de la jonction recto-anale au duodenum ont été prélevés.

1.2.5. Analyses

Le nombre d'EHEC et de bactéries totales dans le tractus digestif des souris a été estimé chaque jour par rt-qPCR sur fèces (détection du gène codant pour l'antigène O et le gène ADNr 16S, respectivement). Le même protocole a été appliqué pour dénombrer les EHEC adhérees à la surface du tractus digestif 7 jours post alimentation. La localisation d'implantation des EHEC dans le TGI murin en fonction du taux de matière grasse des fromages a été observée sur des coupes d'intestin grêle et de côlon préparé en « Swiss roll », 7

jours post alimentation. Les coupes histologiques (4 μm d'épaisseur) ont été marquées au DAPI et les EHEC ont été marqués avec des anticorps spécifiques couplés au FITC. Les coupes ont été entièrement scannées et numérisées avec un axioscan Z.1 (Zeiss, Allemagne). La longueur de l'intestin et la localisation des EHEC ont été relevées à la main utilisant le logiciel Zen Blue (Zeiss). Les coordonnées (x ; y) des points ont permis de générer une représentation graphique virtuelle de l'intestin et de la localisation des bactéries. La courbe d'intestin a servi d'abscisse curviligne dont la longueur a été mesurée en $\mu\text{m}/\text{pixel}$. La localisation des EHEC en fonction de la longueur d'intestin a été obtenue en ramenant sa localisation sur l'abscisse curviligne la plus proche en direction du centre de la spirale (duodenum) en utilisant une programmation MATLAB (réalisé par le Dr. Bastien, Max-Planck Institute for Ornithology, Département Couzin, Germany). Les distances des EHEC de la jonction recto-anal ont été exprimées en cm. Un exemple d'image de coupe histologique et des analyses effectuées est présenté en ANNEXE 8.

1.3. Résultats et discussions

1.3.1. Localisation des EHEC dans les phases de lait

Les données ont montré que les EHEC des deux sérotypes présentent un tropisme pour les GG du lait et que ce phénomène est à la fois souche et dose dépendant. La localisation des EHEC dans les compartiments du lait (phase grasse, phase écrémée) a été modélisée par un modèle polynomial de 3^{ème} degré.

1.3.2. Effet des GG du lait sur les capacités d'adhésion des EHEC à des cellules intestinales Caco-2 et HT29-MTX (9.1) co-cultivées *in vitro*

Nos données ont montré que la matière grasse du lait cru induit une diminution significative des capacités d'adhésion des EHEC aux cellules intestinales en culture. De plus, une différence significative d'adhésion entre les deux souches étudiées a été mise en évidence.

Les observations microscopiques de la localisation d'*E. coli* O26:H11 sur des co-cultures cellulaires (HT29-MTX/Caco-2) ont montré que ces souches se retrouvent préférentiellement au niveau du mucus intestinal, riche en glycoprotéines. Cette souche présente donc un tropisme pour les glycoprotéines de la famille MUC.

Les tests d'adhésion d'une souche d'EHEC au tapis cellulaire en présence de lait entier (cru ou UHT) et de lait écrémé (cru ou UHT) ont montré que la destruction des glycoprotéines du lait par chauffage permet de restituer le phénotype d'adhésion des EHEC à la barrière intestinale. Ceci suggère que la forme native du globule gras du lait est une condition essentielle à ce phénomène d'inhibition de l'adhésion des EHEC à la barrière intestinale.

1.3.3. Effet des GG du fromage sur les capacités d'adhésion des EHEC au tractus digestif de souris traitées à la streptomycine

Les études de colonisation du tractus intestinal de souris nourries avec du fromage contaminé par les souches de EHEC O26:H11 ou O157:H7 et à deux taux de GG ont montré que la présence des GG induit un retard d'excrétion des EHEC de 1 jour. En revanche, 7 jours

après l'inoculation, aucune différence de densité des EHEC n'a pu être observée pour les deux souches et les deux concentrations de MG des fromages.

L'observation microscopique des intestins et la localisation des EHEC au niveau du TGI murin ont montré que bien qu'aucune différence de densité ne soit observée, les EHEC O26:H11 et O157:H7 en absence de matière grasse s'implantent plus en amont (6 cm) dans le tractus digestif murin qu'en présence de GG. La présence des GG dans la matrice fromage utilisée pour l'inoculation des animaux induit également une variation du site majeur d'implantation des souches au niveau du côlon.

Un régime riche en GG préalable à l'inoculation de souches d'EHEC ne protège pas les souris de la colonisation par les EHEC. Ces données indiquent que les glycoconjugués de la membrane des globules gras du lait agissent comme des compétiteurs des sites naturels d'adhésion des EHEC.

1.4. Conclusions

Les globules gras du lait cru et les glycoconjugués associés sont impliqués dans une diminution du pouvoir pathogène des EHEC.

Article scientifique n°4 (En préparation)

Milk Fat Globule Plays A Role Against Adhesion Properties Of Enterohaemorrhagic *E. Coli* To Enterocytes In Vitro And In Vivo.

T. DOUËLLOU^{1, 2}, W. GALIA², S. KERANGART², T. MARCHAL³, N. MILHAU³, R. BASTIEN, M. BOUVIER^{2, 4}, S. BUFF, MC. MONTEL¹, D. THEVENOT^{2, 4*}.

¹ Institut National de Recherche Agronomique, Unité de Recherches Fromagères, 15000 Aurillac, France.

² Université de Lyon, Research Group “Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment”, UMR5557 Ecologie Microbienne Lyon, Université Lyon 1, CNRS, VetAgro Sup, 69280 Marcy l’Etoile.

³ Pathology Laboratory, Département des Animaux de Compagnie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 1 Avenue Bourgelat, B.P. 83, Marcy L’Etoile 69280, France

⁴ Université de Lyon, VetAgro Sup Campus Vétérinaire, Laboratoire d’études des Microorganismes Alimentaires Pathogènes –French National Reference laboratory for *Escherichia coli* including Shiga toxin producing *E. coli* (NRL-EHEC), 69280, Marcy l’Etoile.

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

En dépit de la forte prévalence des STEC dans les fromages au lait cru, un faible nombre de cas d'infections à STEC semble lié à leur consommation. Outre les plans de maîtrise sanitaire qui permettent de réduire la commercialisation de fromages contaminés, nous avons émis l'hypothèse que les STEC dans les fromages seraient peu virulents soit de par leur patrimoine génétique, soit de par la composition biochimique des fromages, en particulier de la matière grasse. Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont été orientés dans deux axes principaux : la caractérisation génétique des souches isolées de produits laitiers et l'impact des globules gras sur les capacités d'adhésion des EHEC aux entérocytes.

1- Variabilité génétique et profils de virulence des STEC isolés de produits laitiers.

Notre première hypothèse était que les souches STEC isolées de produits laitiers sont génétiquement différentes des souches impliquées dans les épidémies, et que ces différences étaient à l'origine d'une moindre pathogénicité de ces souches.

Les profils PFGE des souches STEC isolées des produits laitiers sont apparus très divers (indices de Simpson proche de 1). Les souches ont été classées en fonction de leur sérotype. Néanmoins, cet outil n'a pas permis de les distinguer de souches d'autres origines (viande, cas humain...). Néanmoins, nous avons montré que les souches d'*E. coli* O157:H7, O111:H8 et O145:H28 s'organisent en un cluster bien défini alors que celles d'O26:H11 s'organisent en 2 clusters en fonction de la présence (EPEC) ou non des gènes *stx*. Les souches d'O103:H2,

quant à elles, se séparent en 4 clusters. Cette diversité de profils PFGE de souches laitières n'avait jamais été rapportée dans la littérature même si des travaux similaires ont été publiés pour des souches STEC isolées d'autres environnements (Verstraete et al., 2013) et notamment de cas humains (Izumiya et al., 2010).

La comparaison des profils de virulence des souches STEC isolées de produits laitiers avec des profils d'EHEC a montré que ces souches présentent de très fortes similarités même si quelques différences ont été observées. En effet, bien que les souches de *E. coli* O157:H7 présentent une prévalence équivalente pour le gène *stx2*, nous avons observé une prévalence plus importante des gènes *stx1*, *nleF* et *Z6065* pour les souches originaires de cas humains. Les souches STEC O26:H11 humaines présentent une plus forte prévalence pour le gène *stx2* que celles isolées de produits laitiers. *A contrario*, les souches de STEC isolées de produits laitiers semblent présenter une plus forte prévalence pour les gènes *stx1* et *espN* que les EHEC O26:H11 isolées de cas humains. Ainsi, les profils « de virulence » des souches de STEC isolées de produits laitiers ne semblent pas différer de manière significative de celles impliquées dans les pathologies humaines. Les résultats concernant la présence de gènes de virulence et l'association de marqueurs génétiques ont montré que ces STEC laitiers présentent des profils de virulence associés aux souches pathogènes. De plus, ces associations de gènes ont permis de caractériser des souches d'*E. coli* O26:H11 possédant le gène *eae* uniquement (EPEC) comme STEC potentiels pouvant acquérir ou avoir perdu le gène *stx* (phage). Une recherche complémentaire basée sur les reliquats viraux au sein des CRISPR de ces souches devrait permettre la distinction entre STEC ayant perdu le phage Stx et EPEC pouvant l'acquérir. De plus, la présence du marqueur génétique CRISPR_SP_O26_E, en plus de l'absence des marqueurs génétiques *espK*, *espV*, *ureD*, *Z2098* chez ces souches EPEC ont permis de faire un rapprochement avec le nouveau « French clone » (Delannoy et al., 2015). Ces résultats suggèrent que les fromages au lait cru pourraient être des sources potentielles de

contamination de l'homme par ces souches. A notre connaissance, ces données sont le premier rapport de la présence de telles souches dans les produits au lait cru.

La notion de patho-adaptation permet d'estimer l'impact d'un environnement sur l'histoire évolutive d'un micro organisme pathogène. De nombreux cas de pathoadaptations consécutives de l'histoire évolutive liée aux pressions de sélection de l'environnement chez d'autres souches pathogènes ont été décrits dans la littérature (Cools et al., 2003; Poppe et al., 2001; Thévenot et al., 2005). Ces adaptations peuvent se traduire par des pertes et des acquisitions de fonctions. Certains environnements présentent des conditions physico-chimiques et biotiques complexes, variables dans le temps, ayant ainsi un impact sur la survie, la croissance et le développement bactérien. Les produits laitiers, et plus particulièrement les fromages, sont des aliments fermentés dont les conditions biotiques (microbiote laitier) et abiotiques (conditions physico-chimiques au cours de la transformation du lait) varient au cours du temps (Montel et al., 2014). Ces variations sont des sources de stress importants pour les micro-organismes. Ainsi, pour survivre et se maintenir dans de tels environnements, les micro-organismes mettent en place des mécanismes adaptatifs efficaces, parfois au détriment de certaines fonctions. L'impact de ces matrices complexes sur les capacités adaptatives des STEC, au niveau génétique, pourrait induire une diminution de la pathogénicité potentielle de ces souches par délétion/extinction de certaines fonctions de virulence non essentielles à leur survie dans ces matrices (Elena and Lenski, 2003). Cependant, la détection d'un gène ne renseigne ni sur son expression, ni sur l'effectivité de sa fonction potentielle. Ainsi, la présence d'un facteur génétique reporté comme étant impliqué dans la virulence des STEC, ou contribuant au déclenchement de pathologie, ne peut suffire à déterminer la pathogénicité réelle d'un STEC tant que celui-ci n'a pas été responsable de pathologie. Bien que des différences de profils entre les STEC laitiers et humains existent, aucune conclusion claire sur la pathogénicité des souches de STEC isolées de produits laitiers n'a pu être établie.

En perspective à ce travail, l'étude fine des séquences génomiques centrées sur les séquences des gènes de virulence que nous avons étudiés chez les STEC isolés de produits laitiers pourrait permettre dans un premier temps d'identifier de potentiels événements d'insertion/délétion de nucléotides conduisant à l'extinction des gènes de virulence (décalage du cadre de lecture).

Les notions de virulence et de pathogénicité sont des mécanismes complexes imbriquant de nombreuses voies moléculaires nécessitant une approche d'étude globale. L'étude de l'expression de ces gènes serait une piste de choix à explorer pour comprendre les interactions fines existant entre les différents effecteurs de la virulence des STEC. Les avancées en biologie moléculaire permettent en 2016, ce type d'étude par l'intermédiaire des technologies de séquençage à haut débit appliquées aux ARN (transcriptomique). L'étude des interactions des produits de gènes impliqués dans le déclenchement des pathologies (« *virulomique* ») permettrait d'améliorer les connaissances concernant les mécanismes fins de la pathogénicité de ces souches. De telles connaissances seraient un atout pour les gestionnaires du risque alimentaire dans la filière lait.

2- Interactions EHEC-globules gras du lait

Une de nos hypothèses était que les STEC, lors des premières étapes de fabrication des fromages, se retrouvaient fixés à la surface des globules gras et que cette interaction diminuerait les capacités d'adhésion des pathogènes à la surface de la barrière intestinale.

Nos résultats ont montré que les EHEC O26:H11 et O157:H7 se fixent à la surface des globules gras, tel que montré auparavant pour d'autres entéro-pathogènes (Lopez et al., 2006; Ly-Chatain et al., 2010). Cette fixation semble à la fois souche et dose dépendante. Ces

résultats ne peuvent être comparés à ceux de la littérature car aucune donnée n'est disponible sur les EHEC. De plus, cette fixation des EHEC aux GG du lait est dépendante de l'intégrité des sucres associés aux membranes des globules gras du lait, même si l'implication de liaisons faibles pourrait également intervenir dans cette inhibition (Brisson et al., 2010). Cette association des EHEC avec les globules gras du lait induit une diminution significative de l'adhésion des STEC aux entérocytes étudiés grâce à un modèle *in vitro*. La présence de ces globules gras dans des fromages au lait cru induit également, *in vivo*, une implantation des EHEC plus en aval dans le tractus digestif de souris nourris avec des fromages contaminés qu'en absence de GG. Ceci suggère que les EHEC fixés aux GG sont entraînés tout au long du tractus digestif. A notre connaissance, ce travail est le premier sur l'utilisation de modèles complémentaires d'étude de la pathogénicité des EHEC entre autres pour apprécier l'impact des glycoconjugués/GG du lait sur leurs capacités anti adhésives.

Cette thèse a porté sur les globules gras du lait bovin. La composition des laits étant très différentes d'une espèce animale à l'autre (Yao et al., 2016), l'association EHEC/MFGM pourrait également être étudiée sur des laits crus de brebis et chèvre ainsi que des fromages au lait cru fabriqués avec les trois types de lait.

Les appendices des EHEC impliqués dans la reconnaissance des glycoconjugués des GG du lait n'ont pas été identifiés dans ce travail. L'étude des capacités d'adhésion de mutants EHEC isogéniques pour la synthèse de ces appendices permettrait de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans cette inhibition.

Il est contre indiqué d'administrer des antibiotiques lors d'infections à EHEC (Wong et al., 2001). Le développement de stratégies de thérapie sûres contre les infections à EHEC est par conséquent requis d'urgence pour la santé publique. L'emploi d'analogues de récepteurs dans les aliments afin d'inhiber l'adhésion des EHEC aux cellules entérocytaires dans le

tractus intestinal humain est donc essentiel pour les médecins, scientifiques, et les gestionnaires de danger et de risque. Dans le cadre d'une thérapie « anti adhésive », l'emploi de saccharides présente des avantages car ils ne présentent aucune toxicité et n'entraînent pas de réponse immunitaire (Kelly and Younson, 2000; Ofek et al., 2003; Simon et al., 1997). De plus, puisque les agents anti adhésifs n'entraînent pas la destruction ou n'arrêtent pas le développement des pathogènes, il est très probable que les résistances qui émergeront soient à des taux nettement inférieurs à celles des antibiotiques. Une telle approche peut également être un moyen attrayant de gestion des maladies bactériennes en diminuant les taux de rejet d'antibiotiques dans l'environnement. Enfin, cette stratégie de lutte contre l'adhésion des EHEC par des saccharides n'a jamais été étudiée.

Enfin, la mise en évidence de ce phénomène d'association EHEC/globule gras permet d'envisager une utilisation potentielle en diagnostic. En effet, les méthodes de détections actuelles des STEC en produits laitiers sont longues (Conrad et al., 2016). Effectuer la détection des STEC sur la matière grasse du lait permettrait de concentrer les bactéries sans avoir recours à une étape d'enrichissement.

3- Impact des conditions physico-chimiques des technologies de fabrication fromagère sur la réponse aux stress des EHEC.

D'après les données de la littérature, les STEC peuvent être stressés lorsqu'ils se trouvent dans les fromages (cf **paragraphe 4.2.5**). En effet, durant la fabrication fromagère les stress acides, thermiques, oxydatifs et osmotiques peuvent être un frein à la croissance, la survie et l'intégrité cellulaire des STEC (Peng et al., 2011). Cependant peu de données

existent à ce jour concernant les *E. coli* et leurs réponses au stress dans les fromages. L'expression des toxines Stx, condition essentielle à l'établissement des complications systémiques des pathologies à EHEC, est directement reliée à la capacité de la bactérie à répondre efficacement au stress (Schüller, 2011). En effet, les gènes codant pour ces toxines sont portés par un virus à l'état de prophage intégré au niveau chromosomique de ces bactéries. Les protéines de transduction des signaux associées au stress cellulaire activent l'expression des toxines Stx. La protection croisée (« *cross protection* ») est un phénomène bactérien adaptatif permettant de conférer, suite à l'exposition de la bactérie à un premier stress, un état physiologique de réponse accru à des stress auxquels cette bactérie n'a pas été confrontée (Mackey and Seymour, 1987). L'étude des gènes impliqués dans les réponses aux stress des STEC dans le tractus digestif humain, ayant résisté aux différents stress rencontrés au cours de la fabrication fromagère, permettrait de mieux comprendre les mécanismes physiologiques de la pathogénicité de souches contaminant les fromages. Des travaux de recherche basés sur ces hypothèses sont actuellement en cours au sein du laboratoire et nécessitent encore de nombreuses mises au point pour statuer de manière claire sur de tels impacts.

4- Conclusions générales

En conclusion, les résultats de ce travail de thèse montrent que la pathogénicité des EHEC isolés de produits au lait cru est complexe et multifactorielle. Deux facteurs pourraient agir de manière synergique sur les EHEC et seraient impliqués dans la diminution de leur virulence (intensité et pathologies induites): 1) les variations de fréquences des gènes de virulence, 2) la diminution de leurs capacités d'adhésion au TGI par l'intermédiaire des interactions globules gras-bactéries. Cependant, bien que d'un point de vue génomique, ces souches semblent posséder l'arsenal génétique permettant le déclenchement des pathologies, les résultats de ce travail suggèrent que la notion de pathogénicité des STEC isolés de produits laitiers ne peut être encore bien définie. Des études complémentaires sur l'expression de l'ensemble des gènes des STEC dans des conditions mimétiques de la digestion, après leur passage dans des fromages au lait cru, sont encore nécessaires pour statuer sur une réelle diminution du pouvoir pathogène des STEC dans les produits laitiers. Ces connaissances seront une aide précieuse pour les industriels et les gestionnaires du risque. Néanmoins, ces souches devraient encore être considérées comme des bactéries potentiellement hautement pathogènes pouvant impacter sérieusement les conditions de vie humaine et dont la maîtrise dans les environnements laitiers doit rester une priorité de santé publique.

ANNEXE 1 : Communications orales

Date	Intervention	Lieu
11/07/2013	Comité de Thèse	Marcy L'Etoile
24/09/2013	Présentation de Thèse CNIEL	Maison Alfort
15/11/2013	Animation scientifique équipe BPOE	Lyon
21/02/2014	Comité de pilotage STECLAIT	Clermont Ferrand
04/04/2014	Comité de pilotage STECPATH	Maison Alfort
14/04/2014	Animation scientifique équipe BPOE	Marcy L'Etoile
10/06/2014	Animation scientifique UMR5557	Lyon
11/07/2014	Animation scientifique équipe BPOE	Lyon
07/10/2014	Comité de pilotage STECLAIT	Clermont Ferrand
14/10/2014	Présentation Biomerieux	Marcy L'Etoile
10/10/2014	Comité de pilotage STECPATH	Maison Alfort
04/12/2014	Animation scientifique équipe BPOE	Lyon
06/02/2015	Animation scientifique URF	Visio conférence
23/02/2015	Comité de Thèse	Marcy L'Etoile
13/03/2015	Animation scientifique URF	Marcy L'Etoile
02/04/2015	Animation scientifique LMAP	Marcy L'Etoile
08/04/2015	Présentation Biomerieux	Marcy L'Etoile
07/05/2015	Animation scientifique équipe BPOE	Marcy L'Etoile
04/06/2015	Comité de pilotage STECLAIT	Clermont Ferrand
03/09/2015	Comité de pilotage STECPATH	Maison Alfort
23/09/2015	Présentation ICLB	Marcy L'Etoile
25/01/2016	Présentation AG UMR5557	Lyon
31/01/2016	Animation scientifique LMAP	Marcy L'Etoile
10/03/2016	Comité de pilotage STECPATH	Maison Alfort

ANNEXE 2 : Contribution_Article scientifique

Variable tellurite resistance profiles of clinically-relevant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) influence their recovery from foodstuffs

(In press in Food Microbiology)

Variable tellurite resistance profiles of clinically-relevant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) influence their recovery from foodstuffs

Stéphane Kerangart ¹, Thomas Douëllou ^{1,2}, Sabine Delannoy ³, Patrick Fach ³, Lothar Beutin ⁴, Delphine Sergentet-Thévenot ^{1,5}, Benoit Cournoyer ¹, Estelle Loukiadis ^{1,5*}.

¹University of Lyon, Research group on «Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment», UMR5557 Microbial Ecology, University Lyon 1, CNRS, VetAgro Sup, 69622 Villeurbanne cedex, France.

²Institut National de Recherche Agronomique, Unité de Recherches Fromagères, 15000 Aurillac, France.

³Université Paris-Est, ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Plateforme IdentityPath, 14 rue Pierre et Marie Curie, 94701 Maisons-Alfort, France.

⁴ National Reference Laboratory for *Escherichia coli* (including VTEC), Department of Biological Safety, Federal Institute for Risk Assessment (BfR), D-12277, Berlin, Germany.

⁵University of Lyon, VetAgro Sup, LMAP Laboratory, National Reference Laboratory for *Escherichia coli* (including VTEC), Marcy l'Etoile, France.

* corresponding author

Abstract

Tellurite (Tel)-amended selective media and resistance (Tel-R) are widely used for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from foodstuffs. Tel-R of 81 O157 and non-O157 STEC strains isolated from animal, food and human was thus investigated. Variations of STEC tellurite minimal inhibitory concentration (MIC) values have been observed and suggest a multifactorial and variable tellurite resistome between strains. Some clinically-relevant STEC were found highly susceptible and could not be recovered using a tellurite-based detection scheme. The *ter* operon was highly prevalent among highly Tel-R STEC but was not always detected among intermediately-resistant strains. Many STEC serogroup strains were found to harbor sublines showing a gradient of MIC values. These Tel-R sublines showed statistically significant log negative correlations with increasing tellurite concentration. Whatever the tellurite concentration, the highest number of resistant sublines was observed for STEC belonging to the O26 serogroup. Variations in the number of these Tel-R sublines could explain the poor recovery of some STEC serogroups on tellurite amended media especially from food products with low levels of contamination. Comparison of tellurite MIC values and distribution of virulence-related genes showed Tel-R and virulence to be related.

Keywords: STEC; tellurite resistance; *ter* genes; selective media; foodstuff.

Abbreviations:

CDS: Coding DNA Sequence; **CFU:** Colony-Forming Units; **CT-SMAC:** Cefixime Tellurite MacConkey Sorbitol agar; ***eae*:** Enteropathogenic *E. coli* attachment/effacement (intimin encoding gene); **K₂TeO₃:** potassium tellurite; **LB-Te:** Luria Bertani agar supplemented with K₂TeO₃; **LEE:** Locus of Enterocyte Effacement; **MIC:** Minimal Inhibitory Concentration; **mRBA[®]:** modified Rainbow[®] Agar; **Nle:** Non LEE-encoded effector; **OI:** chromosomal O Island; **PCA:** Plate Count Agar; **RBA:** Rainbow[®] agar; **SF:** Sorbitol fermenting; **STEC:** Shiga toxin producing *E. coli*; **stx:** Shiga Toxin encoding gene; **TBX:** Tryptone Bile X-Glucuronide; **Tel-I:** strains intermediately susceptible to K₂TeO₃; **Tel-R:** strains resistant to K₂TeO₃; **Tel-S:** strains susceptible to K₂TeO₃; **TS:** Tryptone Salt; **UPGMA:** Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean.

1. Introduction

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains are major worldwide occurring food-borne pathogens, causing large outbreaks of hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic uremic syndrome (HUS) (Kaper et al., 2004). HUS is the leading cause of acute renal failure among young children and is potentially fatal or results in a high rate of renal and non-renal sequelae in survivors (Tarr et al., 2005). The key virulence trait of STEC is their ability to produce Shiga toxin (Stx) (Karmali, 2009). Besides the *stx* genetic determinants, typical pathogenic strains possess the locus of enterocyte effacement (LEE) on a pathogenicity island which includes *eae* encoding the adhesin intimin and genes for several secreted proteins responsible for intimate adherence of STEC to intestinal cells. These properties will favor lesion effacement at the site of attachment (Franzin and Sircili, 2015). Nevertheless, other STEC strains lacking the LEE were also found to cause HC and HUS in humans and the inventory and precise functions of several STEC virulence factors are still to be resolved (Karmali et al., 2010). Epidemiological studies have shown that a large variety of STEC serogroups have been linked to foodborne illnesses but just ten of them have been consistently associated with severe cases (namely O157, O26, O45, O91, O103, O104, O111, O113, O145, and O121) (Caprioli et al., 2005 ; Mathusa et al., 2010).

Ruminants, especially cattle, are the main reservoirs of pathogenic STEC, and food-borne outbreaks are typically acquired through the consumption of undercooked ground beef,

unpasteurized milk and derived products such as raw milk cheeses and raw vegetables (Karmali et al., 2010). As very few STEC cells (from 10 to 100) are able to provoke disease after their ingestion (Strachan et al., 2001; Teunis et al., 2004; Teunis et al., 2007), monitoring STEC strains is required at all steps along the food chain in order to identify and prevent contamination of food. Detection of STEC in foods remains highly problematic mainly due to low levels of contamination and to the limited numbers of common biochemical characteristics that distinguish pathogenic STEC from the other commensal *E. coli* (Beutin and Fach, 2014).

Standardized STEC detection procedures (ISO 16654:2001; ISO TS 13136:2012; USDA/FSIS MLG5B) require the use of selective differential media such as cefixime tellurite sorbitol MacConkey agar (CT-SMAC), or modified Rainbow[®] agar (mRBA[®]) for strain isolation. These media contain selected concentrations of potassium tellurite (K_2TeO_3) (2.5 μ g/mL for CT-SMAC and 0.15 mg/L for mRBA[®]), which are supposed to exert an antimicrobial action only against other enteric bacteria possibly present in the food sample and not to affect the growth of targeted O157 and non-O157 STEC strains (Zadik et al., 1993). Tellurite can produce bacterial oxidative bursts and it was shown that O157:H7 STEC strains exhibit a higher resistance to K_2TeO_3 than non-STEC strains (Taylor et al., 2002; Zadik et al., 1993). Several tellurite resistance processes have been reported (Prigent-Combaret et al., 2012; Taylor, 1999; Turner et al., 2001) but tellurite resistance in STEC is mainly attributed to the presence of the chromosomal *ter* cluster (Bielaszewska et al., 2005; Orth et al., 2006; Taylor et al., 2002). Worryingly, some clinically relevant non-O157 STEC such as O91 and O113 strains were unable to grow on standard media containing 2.5 μ g/mL of K_2TeO_3 (Orth et al., 2007). Evaluation of commercial media using K_2TeO_3 as a primary selective agent also showed significant inhibition of non-O157 STEC, such as O103, O111, O121 and O145 strains (Gouali et al., 2013; Hirvonen et al., 2012; Tillman et al., 2012; Tzschoppe et al., 2012).

The goal of our study was to determine the tellurite resistance profiles (Tel-R profile) of a large panel of STEC strains of priority serogroups isolated from natural matrices. Our working hypothesis was that the tellurite resistome generates variable Tel-R profiles, which impact the recovery of hazardous STEC from contaminated foodstuffs. The 81 clinically-relevant STEC investigated showed variable tellurite minimal inhibitory concentration (MIC) values, and led to the first description of Tel-R sublines among single strain populations.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and preparation of inocula

The STEC seropathotype classification of Karmali et al. (2003) was used to assess the clinical and public health risks associated with STEC strains and to select a panel of clinically-relevant strains. This classification is based on the reported frequency of seropathotypes in human STEC diseases, their known association with outbreaks and the severity of their outcome including HUS and HC. A total of 81 field strains of STEC was chosen from the German and French national reference laboratories' collections (VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France and BfR, Berlin, Germany) and were kept at -80°C in Microbank™ beads (Pro-Lab Diagnostics, Neston, UK) (list and general features are described in Table S1). This collection included O157:H7 and non-O157 STEC strains (including their non-motile derivatives): O26 (n=10), O45 (n=1), O91 (n=10), O103 (n=9), O111 (n=9), O113 (n=10), O121 (n=9), O145 (n=9), O157 (n=12), and O104 (n=2; O104:H4). Particular attention was paid to build a collection representative of the STEC diversity within a same seropathotype and even within a same serotype. All O157 STEC strains were isolated according to the ISO 16654 and the non-O157 ones according to the ISO TS 13136:2012. It is noteworthy that all but two O157:H7 isolates were recovered on CT-SMAC, a tellurite-amended culture medium. These tellurite-sensitive O157:H7 STEC strains were sorbitol-fermenting (SF) strains isolated from minced beef on non-selective agar (TBX) (King et al., 2014). The other strains were recovered on TBX, on cefixime-tellurite rhamnose MacConkey agar (CT-RMAC) (Hiramatsu et al., 2002) or Björn Possé medium (Possé et al., 2008). Fifty two strains were isolated from food, twenty from humans and nine from animals. All human strains were isolated from HUS or HC cases. Nine strains have been associated with food outbreaks linked to ingestion of contaminated meat (King et al., 2014, 2009; Perna et al., 2001), raw milk cheeses (Espíé et al., 2006) or sprouts (Hayashi, 2001; King et al., 2012). Eleven other STEC strains have been previously described in the literature (Bibbal et al., 2015; Grad et al., 2012; Mariani-Kurkdjian et al., 1993; Perna et al., 2001; Vernozy-Rozand et al., 2004; Zhang et al., 2002; Zimmerhackl et al., 2010) and were included in this panel. Two control strains were included *i. e.* *E. coli* K12 MG1655 which is susceptible to tellurite, and *E. coli* pCPP9 which is tellurite-resistant by a Te-volatilization process (Prigent-Combaret et al., 2012).

Prior to performing the tellurite susceptibility tests toward tellurite, all *E. coli* strains were transferred into a broth of Brain Heart Infusion (BHI) (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)

and incubated overnight under aerobic and static conditions at 37°C. Ampicillin (Sigma, St. Louis, MO) at 100 µg/mL was added to BHI before growing *E. coli* pCPP9. For inoculum preparation, overnight cultures were diluted in a tryptone salt (TS) solution (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) to 10^5 , 10^3 , 10^2 and 10^1 colony-forming units per milliliter (CFU/mL). Inoculum levels were checked on plate count agar (PCA) (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

2.2. Growth on commercial solid media

The ability of strains to grow on commercial solid media containing K_2TeO_3 was tested by inoculating 10^3 CFU from overnight BHI cultures. Media tested were CT-SMAC (K_2TeO_3 2.5 µg/mL; cefixime 0.05 µg/mL, according to the ISO 16654 and ISO TS 13136) (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom), CHROMagar™ STEC (CHROMagar Microbiology, Paris, France), chromID® EHEC (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) (K_2TeO_3 2.5 µg/mL; cefixime 0.05 µg/mL), RBA® (Biolog, Hayward, CA) (K_2TeO_3 0.80 µg/mL; Novobiocine 10 µg/mL) and mRBA® (RBA® base complemented with cefixime 0.05 µg/mL; K_2TeO_3 0.15 µg/mL and Novobiocine 5 µg/mL, according to USDA/FSIS MLG5B). Luria Bertani (LB) agar (pH 7; 5 g NaCl, 5 g yeast extract and 10 g tryptone) (Oxoid, Basingstoke, UK) was supplemented with the appropriate concentrations of tellurite from filter sterilized aqueous K_2TeO_3 (LB-Te) (potassium tellurite hydrate; Aldrich Chemical Co., St Louis, USA).

2.3. Determination of tellurite susceptibility

Tellurite minimal inhibitory concentrations (MICs) were measured in LB broth or on LB agar. Each strain was tested in triplicate and in two independent experiments. For LB broth experiments, the potassium tellurite MICs were measured in 96-well microtiter plates using an inoculum of 10^5 CFU per well and serial dilutions of K_2TeO_3 in LB broth (from 20 to 1000 µg/mL). The plates were incubated for 24h at 37°C. The lowest dilution of potassium tellurite that inhibited growth (no turbidity or color change) after 24h at 37°C was recorded as the MIC. All MICs were performed under aerobic growth conditions.

For the LB agar experiments, susceptibility of *E. coli* strains and sublines to K_2TeO_3 was measured according to Prigent-Combaret *et al.* (2012). Drops (10 µl) of cells at 10^5 CFU/mL of LB broth were spotted in triplicate on LB-Te agar containing serial two-fold dilutions of K_2TeO_3 from 0.5 to 20 µg/mL. The plates were incubated at 37°C for 24 h. The lowest dilution of potassium tellurite that totally inhibited growth after 24h of incubation was recorded as the MIC-Te on LB agar. A survival percentage on LB-Te was determined for all

strains. This percentage was computed from the number of Tel-R sublimes growing on LB-Te over the number of cells growing on PCA.

2.3. Mutation frequency

To determine if the strains used in this study were hypermutable, their mutation frequencies were determined by measuring the proportion of variants in a broth being spontaneously resistant to rifampin, as described by LeClerc *et al.* (1996). Briefly, two independent cultures of the tested strains (14 O26:H11 and 7 O157:H7) were grown overnight in BHI at 37°C. Two milliliters of bacterial broths adjusted to 10⁸ CFU/mL in TS, were pelleted and resuspended in 200 µL of TS. A 100 µL aliquot was plated on LB agar containing rifampicin (100 µg/mL) (Euromedex, souffelweyersheim, France). To confirm the number of CFU/mL in the bacterial suspension, 10-fold serial dilutions were prepared in sterile saline solution, and 100 µL of the dilutions were plated on LB agar. After 24h, the number of CFU was estimated. The mutation frequency was calculated by dividing the number of resistant CFUs by the number of CFUs present in the inoculum.

2.4. Molecular characterization of relevant *E. coli* genes

Total DNA was extracted from all strains by a boiling method using the InstaGeneTM Matrix (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) according to the manufacturer instructions. Briefly, one isolated colony on PCA of each strain was resuspended in 200 µL of InstaGene matrix and incubated at 95°C for 15 min. The suspension was then centrifuged for 3 min at 13 000 rpm and the supernatants were used as templates for PCR tests.

DNA of each STEC strain was subjected to the *ter* PCR screenings according to Taylor *et al.* 2002: TerA1/TerA2 (*terA*), TerB1/TerB2 (*terB*), TerC1/TerC2 (*terC*), TerD1/TerD2 (*terD*), TerE1/TerE2 (*terE*), TerF1/TerF2 (*terF*), TerZ1/TerZ2 (*terZ*). Secondly, the BioMark real-time PCR system (Fluidigm, San Francisco, CA) was used for high-throughput microfluidic real-time PCR amplification using 48x48 dynamic arrays (Fluidigm). CDS (coding sequences) of effector proteins translocated by the type III secretion system (*nleA*, *nleB*, *nleE*, *nleF*, *efA1*, *espN*, *espK*, *espM1* and *espV*), of proteins associated with STEC virulence but of unknown functions (Z2098, Z2099 (OI-57)), of proteins associated with bacterial adhesion (*pagC*, *iha*, *efa1* and *efa2*), were PCR amplified. The array was also designed for the detection of other putative EHEC virulence factors such as *ureD* encoding a urease (OI43/48) (Delannoy *et al.*, 2013). The gene *wecA* was used as a reference marker of *E. coli*.

2.5. Statistical analysis

Cluster analysis of tellurite MICs of STEC was performed using a dendrogram generated with the Cambera metric coefficient without square root conversion (Lance & Williams, 1966) and the unweighted pair group method with arithmetic mean representation (UPGMA, Sokal & Michener, 1958) using Bionumerics software version 7.1 (Applied Maths, Ghent, Belgium). Binary Dice similarity indices representative of virulence genes distribution patterns between strains were computed, and used to build a cladogram by the UPGMA approach (Bionumerics 7.1). Boxplot representations, Spearman's correlation tests, and other statistical tests were performed using the R package (version 3.0.1, R Core Team., 2013). Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Bacterial growth on standard and commercial STEC selective media

Growth properties of the 81 clinically-relevant STEC strains were studied on selective standard and commercially available media (CT-SMAC, CHROMagarTM STEC, chromID[®] EHEC, RBA[®] and mRBA[®]). After a 24h incubation period, three patterns were observed: growth (+), no growth (-) and growth limited to the presence of bacterial sublines with higher MICs than dominant wild type cells (+/-) (Figure 1). Table 1 summarizes the observations made per serogroup, and the complete data sets are shown in Table S1.

All but two O157 (*i.e.* 80%) strains could grow on CT-SMAC because of the methodology used for their isolation. Surprisingly, the two SF O157 showed Tel-I cells with a slow growth on CT-SMAC (2.5 µg/mL of K₂TeO₃) and could grow on chromID[®] EHEC (2.5 µg/mL of K₂TeO₃) and mRBA[®] (0.15 µg/mL of K₂TeO₃). Nevertheless, these two SF O157 Tel-I STEC could not grow on CHROMagarTM nor on RBA[®] (0.8 µg/mL of K₂TeO₃). These two strains were thus considered variably susceptible towards tellurite according to the formulation of the plating media. Interestingly, the Tel-I phenotype was only observed on the reference CT-SMAC agar for O157:H7 detection (ISO 16654:2001) (Table 1). All non-O157 STEC strains were able to grow on mRBA[®] (0.15 µg/mL of K₂TeO₃) and chromID[®] EHEC (2.5 µg/mL of K₂TeO₃) (including three O91 and six O113 Tel-I strains) while a greater variability was observed for the other media, which can include higher concentration of K₂TeO₃. All clinically-relevant O26, O45, O104, O111 and O145 STEC strains tested (n=31 strains) could grow on all five media tested, whatever their formulation and concentration of K₂TeO₃ (ranging from 0.15 to 2.5 µg/mL). Two strains (O103 PMK5 and O121 11671) could neither

grow on CHROMagarTM STEC nor on RBA[®]. Neither the O103 PMK5 strain, nor the O121 11671 STEC and the two O113 14032 and 14233 strains could grow on CT-SMAC. Notably, all STEC belonging to serogroups O91 and O113 were unable to grow on CHROMagarTM STEC and RBA[®], except strain 13790 (O113:H21). The origin of these twenty-five Tel-S STEC strains did not explain their growth behavior (Table 1).

3.2. Direct effect of tellurite on STEC growth

To further investigate the sole impact of K₂TeO₃ on the growth of clinically-relevant STEC, their tellurite MIC on LB agar was examined. Results obtained are shown in a dendrogram, classifying strains according to their MIC-Te on LB agar (Figure 2). Three large clusters (named A, B, and C) were inferred by the UPGMA approach. Cluster A grouped the STEC most resistant to K₂TeO₃ (Tel-R), showing a MIC-Te on LB agar ranging from 12 µg/mL to more than 20 µg/mL. Cluster C showed strains with MICs varying between 0.5 and 2 µg/mL, and was defined as the Tel-S cluster. Cluster B grouped strains with MIC-Te ranging from 2.5 µg/mL to 8 µg/mL, and was considered to define the intermediately susceptible strains to K₂TeO₃ (Tel-I). Origin, serogroups and number of strains within each cluster are indicated in Table 2. Notably, even if most of the O157:H7 strains studied fell into the Tel-R cluster, two of them were sensitive to K₂TeO₃ and were part of cluster C. All of the O26:H11, O45:H2 and O104:H4 STEC as well as most of O103:H2 and O145:H28 strains studied belonged to the Tel-R cluster. On the other hand, all O91 STEC and most of the O113 strains tested grouped in the Tel-S cluster. All O111:H8 STEC strains and most of the O121 strains belonged to the Tel-I cluster.

All Tel-R strains of cluster A, and all but two Tel-I strains of cluster B harbored the entire *ter* operon, whereas all but two strains of the Tel-S cluster did not harbor the *ter* operon. The two Tel-I strains that did not harbor any of the seven genes of the *ter* operon are strains J43 (O111:H8) and 11671 (O121:H7). The two Tel-S strains that possessed the entire *ter* operon belonged to serotype O121:H19 (strains 12658 and 12664).

Growth conditions (*i.e.* solid versus liquid media) have been found to induce distinct cellular reactions and change significantly the tellurite MIC values (Prigent-Combaret et al., 2012). Consequently, MIC values were also determined in LB broth (Table S1). General patterns observed in LB broth were globally in line with those inferred from LB-Te agar. However, biofilm development and cell aggregation likely impacted these results obtained with LB broths. In fact, some hyper-resistant STEC strains were detected, and showed MIC values greater than 400 µg/mL in LB-Te broth. Nevertheless, none of the 24 LB-Te agar cluster C

susceptible STEC strains, including the two *ter* positive strains (Figure 2), showed significant growth in LB-Te broth (Table S1).

When investigating the MIC on LB-Te agar, some highly Tel-R sublines (MIC values >80 µg/mL in LB-Te agar) were recovered but at a variable frequency (Table 3). These STEC colonies on tellurite-amended LB agar were black (Te deposits) and did not produce a garlic smell typical of dimethyl telluride (Figure 3). The proportion of Tel-R sublines with an increased MIC among cluster A (Tel-R) and cluster B (Tel-I) strains according to tellurite concentrations was estimated (Figure 3). Even at a low concentration of tellurite (0.5 µg/mL), the number of Tel-R sublines able to grow was lower than the inoculum levels. This phenomenon is likely to impact the recovery of Tel-I and even Tel-R STEC strains using a tellurite-based detection scheme. As shown in Figure 3, at 2.5 µg/mL of K₂TeO₃, this Tel-R subline effect varied (from 0.36% to 15.98% for cluster A and from 0% to 8.10% for cluster B) and was more important for the cluster B Tel-I strains (17 strains- median of survival percentage values: 0.27%) than for the cluster A Tel-R strains (27 strains- median of survival percentage values: 3.17%). For each serogroup tested, an exponential decrease in the number of sublines with a high Tel-R phenotype detected in LB-Te agar was negatively correlated to the K₂TeO₃ concentration used (Table 3). Numbers of Tel-R sublines per strain varied from one serogroup to another, with O26 producing the highest numbers and most resistant ones. O121 cells were the most sensitive, and the other serogroups yielded similar numbers of Tel-R sublines per K₂TeO₃ concentration up to about 15 µg/mL. From this concentration, significant differences could be detected between O157 and O145.

To investigate if these sublines with higher MIC were derived from the initial STEC clone because of high mutational frequencies, the frequencies of hypermutators in STEC inocula were determined. However, classical mutation rates were observed, with about one spontaneous rifampicin resistant cell per 10⁸ cells.

3.3. Virulence CDS PCR profiling

Virulence attributes of the 81 clinically-relevant STEC were analyzed by high-throughput qPCR screening of 23 virulence-related genes (vir-related CDS). Figure 4 shows a UPGMA dendrogram illustrating the differences between the virulence profiles of Tel-R, Tel-I and Tel-S strains. Between 1 and 23 positive CDS PCR signals (over 23 PCR assays) could be recovered per strain. A total of 28 profiles was obtained and divided, according to their similarities, into two large clusters, A and B, grouping respectively 58 (71%) and 23 strains, and matching the separation between LEE-positive and LEE-negative STEC strains,

irrespective of their origin. Cluster A grouped 85% of STEC isolated from HUS or HC cases (*i.e.* all LEE-positive human strains; n=17/20) while cluster B included the three LEE-negative human STEC (B2F1 (O91:H21), O104 Meyer (O104:H4) and Zucker-1 (O104:H4) strains). All but four LEE-positive STEC strains of cluster A harbored the OI-122-encoded genes *ent* (95%), *nleB* (97%), *nleE* (97%), *efa1* (97%), *efa2* (98%), *Z4331* (98%); the *Z2121* (97%) gene (OI-57) and the *nleH1-2* (98%) gene (OI-71). More than 50% of cluster A strains possessed all 24 screened vir-related CDS or showed only one vir-related CDS negative PCR result. Cluster A showed 22 distinct PCR profiles and grouped all STEC of seropathotypes A and B (O157:H7; O26:H11 O103:H2; O145:H28; O111:H8; O121:H19 strains) plus the O45 STEC strain. A total of 23 STEC strains were PCR negative for the OI-122-encoded *pagC* genes (the ten O26:H11 STEC studied, and six out of nine O103:H2 and seven out of nine O145:H28 strains). Cluster A included all but three of the Tel-R STEC strains studied (36/39), and all but one of the Tel-I strains (16/17) while only 6 of the Tel-S STEC (6/25) grouped in this cluster. Notably, three of the 4 *ter* negative strains of cluster A were also PCR negative for the OI-43/48 vir-related genes and had a Tel-S profile. These three strains were the 2 SF-O157:H7 and the O103:H2 PMK5 strains.

The 23 STEC strains of cluster B showed nine different virulence PCR profiles, with only 2 to 4 positive vir-related CDS PCR signals. This cluster grouped all LEE-negative STEC of seropathotype C and D (O113:H21; O91:H21 strains O113:H4 STEC respectively), and all O104:H4 (n=2/2), O91:H14 (n=1/1) and O121:H7 (n=1/1) STEC strains. Strikingly, most STEC of cluster B had the OI-43/48-encoded *iha* gene (83%) and the OI-122-encoded *pagC* gene (74%). Most of Tel-S STEC (n= 20/25) were found among cluster B whereas only 4 Tel-R and Tel-I STEC belonged to this group (the 2 O104:H4 Meyer and Zucker-1 strains, the O113:H21 13790 and the O121:H7 11671 STEC).

4. Discussion

Epidemiological surveys in the United-States suggest that over 200 000 STEC cases per year can be attributed to serotypes other than O157 (Scallan et al., 2011). This led to the definition of a zero tolerance policy in foodstuffs for clinically-relevant non-O157 STEC. One difficulty for detecting STEC in food is that they show few specific metabolic and phenotypic properties distinguishing them from other *E. coli*. Current standards for detecting clinically relevant STEC serotypes rely on the use of selective agar and can lead to false negative results, as recently documented by Kase et al. (2015). This led to the proposal of the use of

multiple STEC media with different selective agents (Kase et al., 2015). However, these investigations were performed on a small number of strains per serotype and were not including all serotypes of health concern. Here, growth behavior on tellurite-amended media of clinically relevant O157 and non-O157 STEC were compared. Relations between these datasets and the *ter* and virulence profiles of the strains were then investigated. Our working hypothesis was that tellurite is preventing the recovery of some hazardous STEC strains because of genetic differences impacting their respective tellurite resistome. This hypothesis was validated. STEC serogroups were found to generate a distinctive number of Tel-R sublines with increased MIC when exposed to tellurite. Concentration of these higher Tel-R sublines among STEC populations appeared to be predictable per serogroup but to decrease exponentially with increasing tellurite concentrations. Their proportion would need to be considered while estimating the reliability of a tellurite-amended medium for a particular STEC serogroup.

Five commercially available media containing potassium tellurite were tested for detection of STEC strains in this study. Even though all O157 and non-O157 STEC strains studied were able to grow on mRBA[®] and chromID[®] EHEC, the use of at least nine strains per serogroup, except for O45 and O104, showed great intra and inter-serotype variations in STEC physiological responses towards some of these selective media. Most of the media tested were not suitable for isolation of all O103, O121, O91 and O113 STEC studied here. Notably, O91 STEC were not able to grow on CHROMagar[™] STEC and RBA[®]. This was in agreement with previously reported datasets (Hirvonen et al., 2012). Nevertheless, all media, independent on their composition and concentrations of K₂TeO₃, were suitable for growing O26, O45, O104, O111 and O145 STEC strains, as previously described (Tzschoppe et al., 2012). The selective media chromID[®] EHEC was less selective than CT-SMAC despite the fact that it contains the same concentrations of cefixime and tellurite (2.5 µg/mL of K₂TeO₃). CHROMagar[™] STEC was found to have a recovery rate of about 70%, which is in line with other studies such as the one of Gouali *et al.* (2013). Kase *et al.* (2015) also observed that a majority of O91, O103 and O113 STEC tested could not grow or grew slowly on RBA[®] even in its modified version. RBA contains 0.80 µg of K₂TeO₃/mL while the modified version (mRBA[®]) has 0.15 µg/mL. Here, the mRBA[®] was one of the best growing medium for all the STEC tested. This is in agreement with the results of Tilmann *et al.* (2012), which showed this medium to be highly efficient at growing O26, O103 and O111 strains. These serotypes were found to encompass tellurite sensitive strains. However, one could question the

specificity of mRBA[®]. The 0.15 µg/mL tellurite concentration is far from being sufficient to inactivate other bacteria that can be found in food products.

As expected, CT-SMAC, which is the standard media for isolation of O157:H7 STEC recommended by the ISO 16654 method, could support the growth of all the O157:H7 STEC tested except the 2 SF ones. These SF strains were unable to grow on CHROMagar[™] STEC and RBA[®]. These data confirm that the sole use of CT-SMAC, CHROMagar[™] STEC or RBA[®] may prevent the recovery of SF O157 and that the use of a second non selective medium is necessary for isolation of these highly virulent SF O157 STEC genotypes, as recommended in the ISO TS 13136. The tellurite susceptibility of SF O157 has already been documented (Bielaszewska et al., 2005) but it is the first time that SF O157 are reported as variably susceptible towards tellurite according to the formulation of the plating media. In fact, they could grow on chromID[®] EHEC (2.5 µg/mL of K₂TeO₃) and mRBA[®] (0.15 µg/mL of K₂TeO₃) and were found to give rise to Tel-R sublines on CT-SMAC (2.5 µg/mL of K₂TeO₃). These *ter*-negative O157:H7 strains appear to have expressed other properties allowing a certain tolerance towards tellurite.

Comparison of growth ability of STEC on selective commercial media and on tellurite-amended LB media confirmed that the major selective agent of commercial media remains tellurite. This confirms previous observations of Bielaszewska *et al.* (2005), who studied tellurite impact with or without cefixime in LB-Te and CT-SMAC, and concluded that selective properties of media were principally due to tellurite (Bielaszewska et al., 2005). Nevertheless, although most of O157:H7 STEC are able to grow on CT-SMAC containing 2.5 µg/mL K₂TeO₃, some of them showed a MIC of only 0.5 µg/ml in LB-Te agar. These data thus suggest that CT-SMAC formulation has a beneficial impact on Tel-R. This formulation could be improving the tellurite resistome or changing tellurite bio-availability. These modifications could be related to changes in the *ter* gene expression profiles but also of other genes such as those involved in some efflux systems, as reported by Prigent-Combaret *et al.* (2012) in *E. coli*. It is also well established that the toxicity of tellurite is due to the production of reactive oxygen species (ROS) (e. g. (Turner et al., 2007)). Superoxide dismutases could thus contribute at the implementation of the tellurite resistome (Cabiscol et al., 2000). The SoxR regulons (Lushchak, 2011) could also play part in defense responses against such oxidative stresses. However, so far, neither expression of these processes among STEC strains nor a demonstration of the impact of a commercial formulation on their expression, have been reported.

Nevertheless, most of the *ter*-positive strains could grow on tellurite-amended media whereas *ter*-negative ones could not. Variation of tellurite resistance among O157 but also non-O157 STEC strains was thus mainly dependent upon the presence of the *ter* operon, as previously reported (Bielaszewska et al., 2005; Orth et al., 2007; Taylor et al., 2002). Still, our data showed that tellurite resistance and *ter* operon are not strictly correlated. Some STEC strains (J43 (O111:H8) and 11671 (O121:H7)) were PCR negative for the 7 genes of the *ter* operon that were investigated and still managed to grow on tellurite amended media. Furthermore, some *terABCDEFZ*-positive STEC did not grow on Tel-amended media (O121:H19 human strains 12658 and 12664). Interestingly, some *ter*-positive STEC strains that grew on solid tellurite-amended media could not grow in a tellurite-amended broth, suggesting that other activities were essential. In fact, Prigent-Combaret *et al.* (2012) showed that the synthesis of flagella and fimbriae were required because of their contribution in the formation of cell aggregates and biofilms. Such properties could be essential for the expression of a *ter*-dependent resistome among STEC. In line with these inferences, this work led to the observation of Tel-R sublines with higher MIC than the averaged cells found among a growing STEC population; even at a low concentration such as 0.5 µg of K₂TeO₃/mL. These data suggest that the strains are mixed populations of cells with differing expression of some activities/properties playing part in tellurite-resistance. The proportion of cells expressing efficient tellurite-resistomes could be quite low in a STEC population, e. g. 0.1% at 0.5 µg of K₂TeO₃/mL, and even lower at 2.5 µg of K₂TeO₃/mL *i.e.* the concentration recommended for CT-SMAC. This observation signifies that a contaminated food with low STEC cells per gram might not be detected on CT-SMAC if the strain belongs to a lineage of poor producers of these Tel-R sublines.

It is noteworthy that these Tel-R sublines with higher MIC among a STEC cell population did not seem to have emerged from the initial STEC culture by high rate of mutation; hypermutability was not observed. A variable expression of the tellurite resistome among a cell population appears more likely to have occurred. The best expression network of tellurite resistance processes would have led to the observed Tel-R sublines. After this initial selection process, these clones were resistant to high tellurite concentrations (>500 µg of tellurite/mL), and had doubling rates similar to other STEC cells. Such a highly variable implementation of the tellurite resistome among a STEC population is likely to have affected STEC prevalence analyses performed on food products.

The *ter* clusters in O157 and non-O157 STEC were found to be closely associated with LEE, as previously reported in the literature (Orth et al., 2007). However, the two O104:H4 STEC

strains, including one associated with the EU outbreak that occurred in 2011 (King et al., 2012), were *ter* positive but LEE negative. These latter strains did not harbor any of the other STEC-specific virulence markers. This is in line with the idea that these particular O104:H4 pathogenic clones have evolved separately from the typical pathogenic STEC strains (Mellmann et al., 2011; Navarro-Garcia, 2014).

The underlying genetic basis of virulence in STEC remains poorly understood and horizontal acquisitions of pathogenicity islands are likely to have contributed to the observed variations (Karmali, 2010). Thus, the seropathotype classification (Karmali et al., 2003) combined with the molecular risk assessment tools described in the literature (Coombes et al., 2008; Delannoy et al., 2013) to characterize the virulence profiles of our tellurite resistant and susceptible STEC strains were used. Our results confirmed the strong association between OI-122, OI-43/48 and OI-57 with LEE-positive STEC strains, as previously reported (Ju et al., 2013), and showed these highly virulent STEC strains to be tellurite resistant. Deletion of the OI-122-encoded *pagC* gene in some of these virulent strains has been reported, particularly for O26:H11 strains (Ju et al., 2013). However, most LEE-negative STEC that harbored incomplete pathogenicity islands were found to be sensitive to tellurite. Most of them possessed the OI 43/48-encoded *iha* gene and the OI 122-encoded *pagC* gene, confirming that these two genes are not primarily associated with LEE-positive strains (Ju et al., 2013). The conservation of this association between tellurite resistance and increased virulence potential suggests likely benefits during the STEC epidemiological cycle, including their passage from human and animal dependent phases to a host independent phase when present in foodstuffs.

5. Conclusion

This comprehensive study of an extended collection of STEC offers greater understanding of tellurite resistance of the major clinically relevant STEC serogroups. The selectivity offered by incorporating tellurite into agar media was appropriate for isolating most but not all relevant serogroups and serotypes. Exposure to increasing concentrations of tellurite in solid agar and broth media revealed that some strains of some serogroups contained sublines with distinct numbers dependent upon their tellurite MICs. These MICs were not always reflective of the *ter* CDS content of the strains, and sublines appeared an important feature in the recovery of STEC cells from foodstuffs. Moreover, great variations in STEC tellurite susceptibilities were found related to the formulation of the selective media, suggesting the importance of STEC physiological conditions in these detection schemes. Tellurite resistance in the studied strains thus appeared multi-factorial and not dependent solely upon tellurite concentration. More work on the STEC tellurite resistome will be required to identify key

growth conditions improving the recovery of tellurite-resistant sublines in a STEC population recovered from food products.

Acknowledgements

This work was funded by bioMérieux through a thesis grant and financial support. The French Ministry of Agriculture, CNRS, University Lyon 1 and VetAgro Sup have supported all other related charges.

We thank M. Bielaszewska (Institute of Hygiene, National Consulting Laboratory on Hemolytic Uremic Syndrome, University of Münster, Germany) for providing *E. coli* O26 human strains 2245/98; 1833/98 and 3073/00. We also thank P. Mariani- Kurkdjian (CNR associé *E. coli-Shigella*, Service de Microbiologie, Université Paris- Diderot, Hôpital Robert Debré, Paris France) for providing the 2 O104:H4 strains, O104 Meyer and O104:H4 Zucker-1. We are also grateful to H. Brugère and D. Bibbal (INSERM UMR1043, INRA USC1360, Université de Toulouse, INP, ENVT, Toulouse, France) for collaboration that allow to isolate animal strains J43 and K50. We would like to thank the reviewers of this paper which made several constructive suggestions for improving the wording of this paper. We finally sincerely thank the French and the German NRL teams for *E. coli* for isolation of all field strains studied.

References

- Beutin, L., Fach, P., 2014. Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Nonhuman Sources and Strain Typing. *Microbiology spectrum* 2, 299–319. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0001-2013.
- Bibbal, D., Loukiadis, E., Kérouredan, M., Ferré, F., Dilasser, F., Peytavin de Garam, C., Cartier, P., Oswald, E., Gay, E., Auvray, F., Brugère, H., 2015. Prevalence of carriage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among slaughtered adult cattle in France. *Applied and environmental microbiology* 81, 1397–1405. doi:10.1128/AEM.03315-14.
- Bielaszewska, M., Tarr, P.I., Karch, H., Zhang, W., Mathys, W., 2005. Phenotypic and Molecular Analysis of Tellurite Resistance among Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 and Sorbitol-Fermenting O157: NM Clinical Isolates 43, 452–454. doi:10.1128/JCM.43.1.452.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J., 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 3, 3–8.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H., Oswald, E., 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary research* 36, 289–311. doi:10.1051/vetres:2005002.
- Coombes, B.K., Wickham, M.E., Mascarenhas, M., Gruenheid, S., Finlay, B.B., Karmali, M.A., 2008. Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing

Escherichia coli strains. *Applied and environmental microbiology* 74, 2153–60. doi:10.1128/AEM.02566-07.

Delannoy, S., Beutin, L., Fach, P., 2013. Discrimination of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) from non-EHEC strains based on detection of various combinations of type III effector genes. *Journal of clinical microbiology* 51, 3257–62. doi:10.1128/JCM.01471-13.

Espié, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H., Vernozzy-Rozand, C., 2006. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiology and infection* 134, 143–6. doi:10.1017/S0950268805004887.

Franzin, F.M., Sircili, M.P., 2015. Locus of Enterocyte Effacement: A Pathogenicity Island Involved in the Virulence of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Subjected to a Complex Network of Gene Regulation. *BioMed Research International* 2015, 1–10. doi:10.1155/2015/534738.

Gouali, M., Ruckly, C., Carle, I., Lejay-Collin, M., Weill, F.-X., 2013. Evaluation of CHROMagar STEC and STEC O104 chromogenic agar media for detection of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* in stool specimens. *Journal of clinical microbiology* 51, 894–900. doi:10.1128/JCM.03121-12.

Grad, Y.H., Lipsitch, M., Feldgarden, M., Arachchi, H.M., Cerqueira, G.C., Fitzgerald, M., Godfrey, P., Haas, B.J., Murphy, C.I., Russ, C., Sykes, S., Walker, B.J., Wortman, J.R., Young, S., Zeng, Q., Abouelleil, A., Bochicchio, J., Chauvin, S., Desmet, T., Gujja, S., McCowan, C., Montmayeur, A., Steelman, S., Frimodt-Møller, J., Petersen, A.M., Struve, C., Krogfelt, K. a, Bingen, E., Weill, F.-X., Lander, E.S., Nusbaum, C., Birren, B.W., Hung, D.T., Hanage, W.P., 2012. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 3065–70. doi:10.1073/pnas.1121491109.

Hayashi, T., 2001. Complete Genome Sequence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Genomic Comparison with a Laboratory Strain K-12. *DNA Research* 8, 11–22. doi:10.1093/dnares/8.1.11.

Hiramatsu, R., Matsumoto, M., Miwa, Y., Suzuki, Y., Saito, M., Miyazaki, Y., 2002. Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26 Strains and Establishment of Selective Isolation Media for These Strains. *Journal of clinical microbiology* 40, 922–925. doi:10.1128/JCM.40.3.922.

Hirvonen, J.J., Siitonen, A., Kaukoranta, S.-S., 2012. Usability and performance of CHROMagar STEC medium in detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Journal of clinical microbiology* 50, 3586–90. doi:10.1128/JCM.01754-12.

Ju, W., Shen, J., Toro, M., Zhao, S., Meng, J., 2013. Distribution of pathogenicity islands OI-122, OI-43/48, and OI-57 and a high-pathogenicity island in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* 79, 3406–12. doi:10.1128/AEM.03661-12.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology* 2, 123–40. doi:10.1038/nrmicro818.

Karmali, M. a, Gannon, V., Sargeant, J.M., 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary microbiology* 140, 360–70. doi:10.1016/j.vetmic.2009.04.011.

Karmali, M.A., 2009. Host and pathogen determinants of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome. *Kidney international. Supplement* S4–7. doi:10.1038/ki.2008.608.

Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-smith, R., Isaac-renton, J., Clark, C., Rahn, K., Kaper, J.B., 2003. 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. *Journal of clinical microbiology* 41, 4930–4940. doi:10.1128/JCM.41.11.4930.

Kase, J. a, Maounounen-Laasri, A., Son, I., Lin, A., Hammack, T.S., 2015. Comparison of eight different agars for the recovery of clinically relevant non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from baby spinach, cilantro, alfalfa sprouts and raw milk. *Food microbiology* 46, 280–7. doi:10.1016/j.fm.2014.08.020.

King, L.A., Loukiadis, E., Mariani-Kurkdjian, P., Haeghebaert, S., Weill, F.-X., Baliere, C., Ganet, S., Gouali, M., Vaillant, V., Pihier, N., Callon, H., Novo, R., Gailliot, O., Thevenot-Sergentet, D., Bingen, E., Chaud, P., de Valk, H., 2014. Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:[H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20, O1136–44. doi:10.1111/1469-0691.12736.

King, L.A., Mailles, A., Mariani-Kurkdjian, P., Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., Grimont, F., Pihier, N., Devalk, H., Perret, F., Bingen, E., Espié, E., Vaillant, V., 2009. Community-wide outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with consumption of frozen beef burgers. *Epidemiology and infection* 137, 889–96. doi:10.1017/S0950268808001490.

King, L.A., Nogareda, F., Weill, F.-X., Mariani-Kurkdjian, P., Loukiadis, E., Gault, G., Jourdan-DaSilva, N., Bingen, E., Mace, M., Thevenot, D., Ong, N., Castor, C., Noel, H., Van Cauteren, D., Charron, M., Vaillant, V., Aldabe, B., Goulet, V., Delmas, G., Couturier, E., Le Strat, Y., Combe, C., Delmas, Y., Terrier, F., Vendrely, B., Rolland, P., de Valk, H., 2012. Outbreak of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4 Associated With Organic Fenugreek Sprouts, France, June 2011. *Clinical Infectious Diseases* 54, 1588–1594. doi:10.1093/cid/cis255.

Lance, G. N., Williams, W. T. (1966). Computer programs for hierarchical polythetic classification ("similarity analysis"). *Computer Journal* 9 (1): 60–64. doi:10.1093/comjnl/9.1.60.

LeClerc, J.E., Li, B., Payne, W.L., Cebula, T.A., 1996. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science (New York, N.Y.)* 274, 1208–11.

Lushchak, V.I., 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP* 153, 175–90. doi:10.1016/j.cbpc.2010.10.004.

Mariani-Kurkdjian, P., Denamur, E., Milon, A., Picard, B., Cave, H., Lambert-Zechovsky, N., Loirat, C., Goulet, P., Sansonetti, P.J., Elion, J., 1993. Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of hemolytic-uremic syndrome in France. *J. Clin. Microbiol.* 31, 296–301.

Mathusa, E.C., Chen, Y., Enache, E., Hontz, L., 2010. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Journal of food protection* 73, 1721–36.

Mellmann, A., Harmsen, D., Cummings, C.A., Zentz, E.B., Leopold, S.R., Rico, A., Prior, K., Szczepanowski, R., Ji, Y., Zhang, W., McLaughlin, S.F., Henkhaus, J.K., Leopold, B., Bielaszewska, M., Prager, R., Brzoska, P.M., Moore, R.L., Guenther, S., Rothberg, J.M., Karch, H., 2011. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PloS one* 6, e22751. doi:10.1371/journal.pone.0022751.

Navarro-Garcia, F., 2014. *Escherichia coli* O104:H4 Pathogenesis: an Enteroaggregative *E. coli*/Shiga Toxin-Producing *E. coli* Explosive Cocktail of High Virulence. *Microbiology spectrum* 2. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0008-2013.

Orth, D., Grif, K., Dierich, M.P., Würzner, R., 2007. Variability in tellurite resistance and the *ter* gene cluster among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans, animals and food. *Research in microbiology* 158, 105–11. doi:10.1016/j.resmic.2006.10.007.

Orth, D., Grif, K., Dierich, M.P., Würzner, R., 2006. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: indications for an animal reservoir. *Epidemiology and infection* 134, 719–23. doi:10.1017/S0950268805005467.

Perna, N.T., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Pósfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamouisis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A., Blattner, F.R., 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409, 529–33. doi:10.1038/35054089.

Possé, B., De Zutter, L., Heyndrickx, M., 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 microbiology letters* 282, 124–31. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01121.

Prigent-Combaret, C., Sanguin, H., Champier, L., Bertrand, C., Monnez, C., Colillon, C., Blaha, D., Ghigo, J.-M., Cournoyer, B., 2012. The bacterial thiopurine methyltransferase tellurite resistance process is highly dependent upon aggregation properties and oxidative stress response. *Environmental microbiology* 14, 2645–60. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02802.

Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., 2011. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerging infectious diseases* 17, 7–15. doi:10.3201/eid1701.091101p1.

Sokal R., Michener C., 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ Kans Sci Bull* 38, 1409–1438.

Strachan, N.J., Fenlon, D.R., Ogden, I.D., 2001. Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157. *FEMS microbiology letters* 203, 69–73. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10822.

Tarr, P.I., Gordon, C.A., Chandler, W.L., 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet (London, England)* 365, 1073–86. doi:10.1016/S0140-6736(05)71144-2.

Taylor, D.E., 1999. Bacterial tellurite resistance. *Trends in microbiology* 7, 111–5.

Taylor, D.E., Rooker, M., Keelan, M., Martin, I., Perna, N.T., Burland, N.T.V., Blattner, F.R., Ng, L., 2002. Genomic Variability of O Islands Encoding Tellurite Resistance in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 Isolates Genomic Variability of O Islands Encoding Tellurite Resistance in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 Isolates. *Journal of bacteriology*. doi:10.1128/JB.184.17.4690.

Teunis, P., Takumi, K., Shinagawa, K., 2004. Dose response for infection by *Escherichia coli* O157:H7 from outbreak data. *Risk analysis: an official publication of the Society for Risk Analysis* 24, 401–7. doi:10.1111/j.0272-4332.2004.00441.

Teunis, P.F.M., Ogden, I.D., Strachan, N.J.C., 2007. Hierarchical dose response of *E. coli* O157:H7 from human outbreaks incorporating heterogeneity in exposure. *Epidemiology and Infection* 136, 761–70. doi:10.1017/S0950268807008771.

Tillman, G.E., Wasilenko, J.L., Simmons, M., Lauze, T. a, Minicozzi, J., Oakley, B.B., Narang, N., Fratamico, P., Cray, A.C., 2012. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145 from ground beef using modified rainbow agar and post-immunomagnetic separation acid treatment. *Journal of food protection* 75, 1548–54. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-110.

Turner, M.S., Tan, Y.P., Giffard, P.M., 2007. Inactivation of an iron transporter in *Lactococcus lactis* results in resistance to tellurite and oxidative stress. *Applied and environmental microbiology* 73, 6144–9. doi:10.1128/AEM.00413-07.

Turner, R.J., Aharonowitz, Y., Weiner, J.H., Taylor, D.E., 2001. Glutathione is a target in tellurite toxicity and is protected by tellurite resistance determinants in *Escherichia coli*. *Canadian journal of microbiology* 47, 33–40.

Tzschoppe, M., Martin, A., Beutin, L., 2012. A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables. *International journal of food microbiology* 152, 19–30. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.009.

Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., Bertin, Y., Trably, F., Girardeau, J.P., Martin, C., Livrelli, V., Beutin, L., 2004. Serotyping, stx2 Subtyping, and Characterization of the Locus of Enterocyte Effacement Island of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 Strains Isolated from the Environment in France. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2556–2559. doi:10.1128/AEM.70.4.2556-2559.2004.

Zadik, P.M., Chapman, P.A., Siddons, C.A., Road, H., Sheffield, S., 1993. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. 39, 155–158.

Zhang, W.L., Kohler, B., Oswald, E., Beutin, L., Karch, H., Morabito, S., Caprioli, A., Suerbaum, S., Schmidt, H., 2002. Genetic Diversity of Intimin Genes of Attaching and Effacing *Escherichia coli* Strains. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 4486–4492. doi:10.1128/JCM.40.12.4486-4492.2002.

Zimmerhackl, L.-B., Rosales, A., Hofer, J., Riedl, M., Jungfraithmayr, T., Mellmann, A., Bielaszewska, M., Karch, H., 2010. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: Bacteriology and Clinical Presentation. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 36, 586–93. doi:10.1055/s-0030-1262880.

Table 1. Growth behavior of 81 clinically-relevant STEC strains tested on selective media containing potassium tellurite (K₂TeO₃).

a: After 24h of incubation, three growth patterns were observed: +: growth. -: no growth. +/-: indicating the presence of Tel-R sublines defined according to Figure 1. Nb: number of strains

Strain serogroup	Nb	Origin (Nb)	Proportion of STEC able to grow on standard and commercial media tested (%) ^a														
			CT-SMAC			chromID [®] EHEC			CHROMagar [™] STEC			RBA [®]			mRBA [®]		
			+	+/-	-	+	+/-	-	+	+/-	-	+	+/-	-	+	+/-	-
O157	12	Food (10)	80	20	0	100	0	0	80	0	20	80	0	20	100	0	0
		Human (2)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
O26	10	Food (7)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
		Human (3)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
O45	1	Human (1)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
O91	10	Food (9)	0	100	0	67	33	0	0	0	100	0	0	100	100	0	0
		Human (1)	0	100	0	100	0	0	0	0	100	0	0	100	100	0	0
O103	9	Food (8)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
		Human (1)	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0	0	100	100	0	0
O104	2	Human (2)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
O111	9	Food (2)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
		Human (1)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
		Animal (6)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
O113	10	Food (9)	22	56	22	33	67	0	11	0	89	11	0	89	100	0	0
		Animal (1)	0	100	0	0	100	0	0	0	100	0	0	100	100	0	0
O121	9	Food (1)	0	100	0	100	0	0	0	0	100	0	0	100	100	0	0
		Human (8)	25	63	12	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
O145	9	Food (6)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
		Animal (2)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
		Human (1)	0	100	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0

tested. The complete data sets are shown in Table S1.

Table 2. Number of clinically-relevant STEC strains within each MIC LB-Te agar-based cluster according to their origin and serogroup.

Cluster [range of MIC LB-Te agar]	Nb of strains (%) ^a	Strain per serogroup (%) ^b	STEC origin		
			Food (%) ^c	Human (%) ^c	Animal (%) ^c
A [10 to 20 µg/mL]	40 (49)	O26 (100)	30 (58)	9 (45)	1 (11)
		O45 (100)			
		O103 (89)			
		O104 (100)			
		O113 (10)			
		O145 (89)			
		O157 (83)			
B [2.5 to 8 µg/mL]	17 (21)	O111 (100)	3 (6)	7 (35)	7 (78)
		O121 (78)			
		O145 (11)			
C [0.5 to 2 µg/mL]	24 (30)	O91 (100)	19 (36)	4 (20)	1 (11)
		O103 (11)			
		O113 (90)			
		O121 (22)			
		O157 (17)			

MIC was defined as the lowest dilution of potassium tellurite inhibiting all growth (no Tel-R sublines) after 24h at 37°C. Clusters A, B and C were defined in figure 2 and included Tel-R, Tel-I and Tel-S strains respectively.

a: 81 STEC strains were analysed.

b: percentage of strains from the same serogroup. The collection studied included O157:H7 (n=12) and non-O157 strains: O26 (n=10), O45 (n=1), O91 (n=10), O103 (n=9), O111 (n=9), O113 (n=10), O121 (n=9), O145 (n=9) and O104: (n=2; O104:H4).

c: Twenty strains were isolated from humans, nine from animals and fifty two from food samples.

Table 3. Averaged CFU number over 10^3 cells per STEC strain from four serogroups growing on LB-Te agar containing from 2 to 20 $\mu\text{g/mL}$ of K_2TeO_3 .

[K_2TeO_3] ($\mu\text{g/mL}$) / Spearman correlation test*	<i>E. coli</i> Tel-R colonies			
	O157 (n=10)	O26 (n=10)	O103 (n=8)	O145 (n=8)
2	49.3 $\pm$ 41.2	NA	48.3 $\pm$ 12.6	82.6 $\pm$ 54.4
2,5	35.8 $\pm$ 28.3	NA	39.6 $\pm$ 9.3	76.4 $\pm$ 57.7
3	29.0 $\pm$ 25.6	NA	25.4 $\pm$ 7.7	28.8 $\pm$ 19.6
4	23.6 $\pm$ 18.6	NA	25.1 $\pm$ 8.2	21.4 $\pm$ 18.5
6	12.7 $\pm$ 11.2	NA	15.7 $\pm$ 3.7	11.5 $\pm$ 12.2
8	9.3 $\pm$ 10.0	88.7 $\pm$ 26.9	9.9 $\pm$ 3.3	6.2 $\pm$ 6.5
10	6.0 $\pm$ 7.0	66.3 $\pm$ 33.7	9.4 $\pm$ 4.1	5.7 $\pm$ 5.6
12	6.4 $\pm$ 7.3	71.1 $\pm$ 32.3	5.6 $\pm$ 2.5	3.6 $\pm$ 3.4
14	4.9 $\pm$ 6.3	54.2 $\pm$ 30.0	3.4 $\pm$ 1.6	3.4 $\pm$ 3.0
16	4.9 $\pm$ 5.7	39.5 $\pm$ 20.0	3.5 $\pm$ 2.3	2.3 $\pm$ 2.1
18	3.5 $\pm$ 4.5	28.0 $\pm$ 14.2	3.6 $\pm$ 2.1	1.9 $\pm$ 1.4
20	3.4 $\pm$ 4.1	35.6 $\pm$ 21.1	3.2 $\pm$ 2.2	2.0 $\pm$ 2.1
p-value	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05
σ^a	-0.73	-0.53	-0.91	-0.80

*Data set was log transformed

a: rho spearman correlation coefficient.

SD: standard deviation.

NA: untested because colonies were confluent for at least one strain. This phenomenon also occurred at concentration of tellurite [$<2\mu\text{g/mL}$].

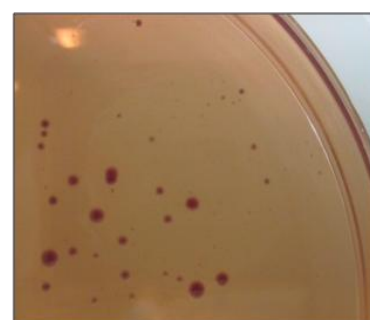
A (+)



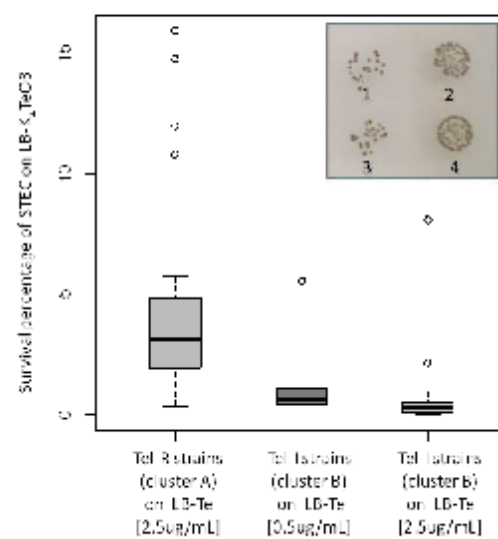
B (-)

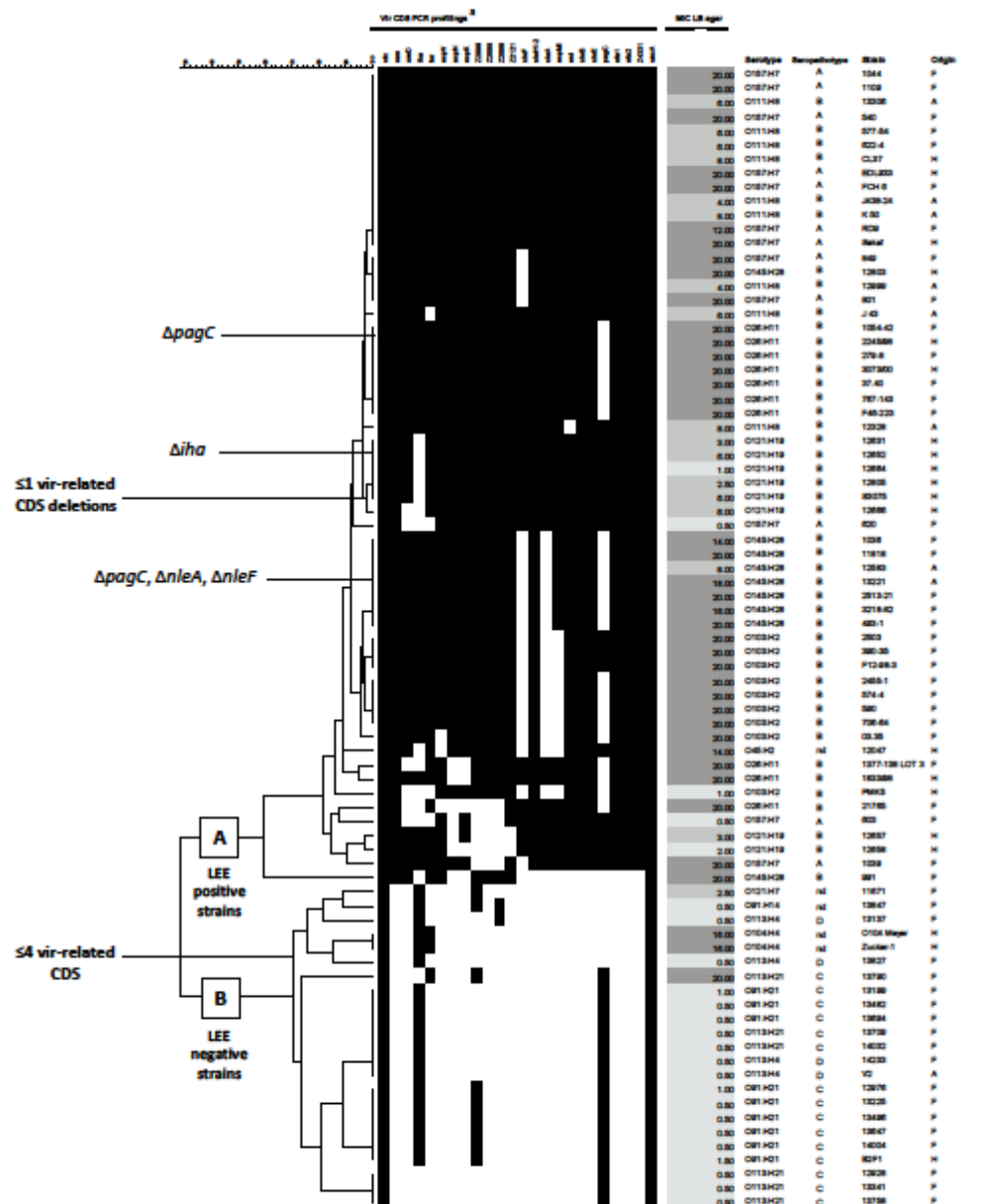


C (+/-)









ANNEXE 3 : Article de vulgarisation scientifique n°1

[Science de la Vie] : Etude de la biodiversité de souches d'*Escherichia. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les produits laitiers : impacte de l'origine des souches sur la présence de gènes impliqués dans la pathogénicité des STEC

Les *E. coli* producteurs de Shiga Toxines (STEC) sont reconnus à l'échelon international comme des pathogènes émergents, associés à des épidémies alimentaires de grande envergure et souvent gravissimes (Karmali et al., 1983). En dépit de leur présence dans les fromages au lait cru (0,9%), un faible nombre de cas d'infections à STEC semble lié à la consommation de ces denrées alimentaires (Loukiadis et al., 2012). Ce constat soulève des interrogations quant à la réelle pathogénicité des souches issues des fromages. Une des hypothèses émise pouvant expliquer ce paradoxe serait que les souches de STEC contaminant les produits laitiers seraient génétiquement différentes de celles isolées de cas humains. Ainsi, la biodiversité des souches de STEC retrouvées dans ces matrices est une piste sérieuse à étudier afin d'apporter des informations relatives à l'impact de l'origine sur le pouvoir pathogène de ces souches. L'objectif du programme de recherche vise à déterminer la diversité génomique de souches STEC isolées de produits laitiers, d'environnement de ferme laitière, de viande et de cas humain et de définir l'impact de ces origines sur la présence de gènes impliqués dans la pathogénicité des STEC.

La diversité génomique d'une collection de souches sélectionnées notamment selon leur origine a été analysée par macrorestriction de l'ADN (acide désoxyribonucléique) à l'aide d'une enzyme de restriction à site de coupure rare révélé par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) selon le protocole du Centre de contrôle des maladies (CDC) (Ribot et al., 2006). Cette digestion a permis de générer une « carte d'identité génétique » relative à chacune des souches étudiées. L'analyse des différents profils d'« empreinte » par bioinformatique a conduit à établir un arbre de comparaison représentatif de leur biodiversité génomique. Les données obtenues ne montrent pas de répartition liée à l'origine des souches mais plutôt un regroupement des souches en fonction de leur sérotype, avec notamment les souches O157:H7, O111:H8 et O145:H28 regroupées dans un seul « cluster » distinct et les souches O26:H11 et O103:H2 respectivement regroupées dans 2 et 4 clusters.

Afin d'explorer les différences de potentialité de virulence entre des souches cliniques et des souches de produits laitiers, une sélection de 90 souches du sérotypes O157:H7 (n=28) et O26:H11 (n=62) d'origine humaine (n=44) et de produits laitiers (n=46) a été analysée quant à la présence de 20 gènes impliqués dans le déclenchement de la pathogénie à STEC (Virulôme).

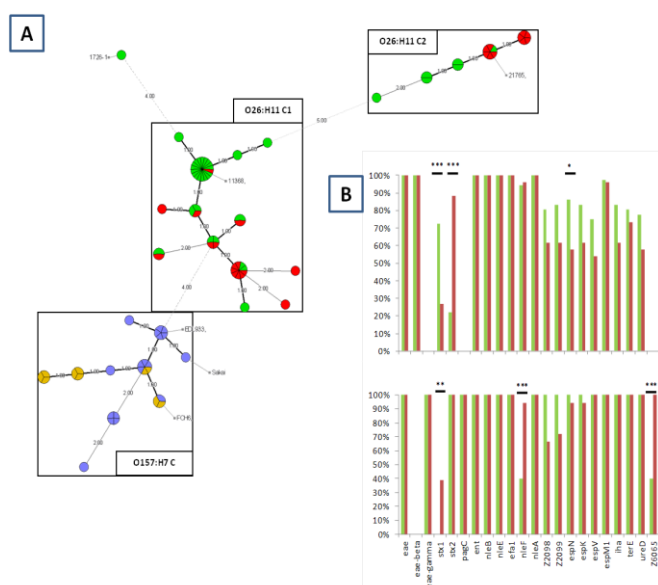


Figure 1: Comparaison des profils de virulence des souches de STEC [A]: Minimum couvrant représentatif de l'arbre de la fréquence des gènes de virulence parmi les 90 souches de STEC isolées d'origines différentes: O26:H11 isolée à partir de produits laitiers (vert) ou des cas humains (rouge), O157:H7 isolée à partir de produits laitiers (bleu) ou de cas humains (jaune). [B]: prévalence des souches de STEC sérotypes O26:H11 et O157:H7 isolé à partir de produits laitiers (vert) et de cas humains (Rouge). DP: Les produits laitiers; H: cas humains.

Test exact de Fisher, *: $p < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

La **Figure 1A** présente un Minimum Spanning Tree (MST) (Arbre couvrant le poids minimal) permettant de comparer des séries de données binaires (présence/absence des gènes) les unes avec les autres (Tewarie et al., 2015). Chaque cercle de la représentation graphique correspond à un profil de virulence où les souches sont représentées par les secteurs à l'intérieur de ce cercle. A chaque gène variant, un embranchement est généré et un nouveau cercle est créé, représentant un nouveau profil de virulence. Le nombre de gène variant d'un profil à l'autre est indiqué sur l'embranchement qui les relie. La **Figure 1b** représente deux histogrammes de comparaison de la prévalence des gènes des STEC en fonction de leur origine et de leur sérotype. Les données obtenues par comparaisons de profil de virulence des souches de STEC appartenant aux sérotypes O157:H7 et O26:H11 ont montrées que l'organisation des souches de STEC est similaire à ce qui a été observé pour l'analyse de leur pulsotype, bien que le principe des deux méthodes soit différent (**Figure 1A**). De plus, les sérotypes ne sont pas équivalents en termes de prévalence de gènes (**Figure 1B**). Ceci est concordant avec les données de la littérature stipulant que le sérotype O157:H7 est plus impliqué dans les épidémies que le sérotype O26:H11 (Brooks et al., 2005; Loukiadis et al., 2012). Enfin, la comparaison des profils de virulence des souches O26:H11 en fonction de leur origine ne semble différer que sur la prévalence des gènes codant pour les toxines *stx1* retrouvées chez les souches isolées de produits laitiers et *stx2* plus souvent retrouvé chez les souches issues de cas humains. Un gène impliqué dans la synthèse d'un effecteur de manipulation des cellules cible des STEC est en revanche plus représenté chez les STEC O26:H11 issus de produits laitiers. La prévalence est plus importante pour le gène *stx1* chez les souches d'*E. coli* O157:H7 isolée de cas humains tandis que la fréquence du gène *stx2* est équivalente pour les deux origines. Enfin, les gènes Z6065 (fonction inconnue à ce jour) et *nleF* (impliqué dans l'inhibition de la mort programmée cellulaire) semblent plus représentés chez les souches O157:H7 isolée de patients (**Figure 1B**).

En conclusion, les analyses PFGE des souches sélectionnées pour l'étude (197 au total) ont montrées une répartition des souches en fonction de leur sérotype, mais pas de leur origine. L'analyse de leur virulomes a également confirmé ce regroupement des souches. La comparaison des virulomes de souches issues de produits laitiers et isolées de cas humains a montré que les souches de STEC issues des produits laitiers ne semblent pas différer de manière importante des souches isolées de patients. Les données mises en évidence par cette analyse sont surprenantes puisque l'hypothèse était que les souches de STEC isolées à partir de produits laitiers peut posséder une faible proportion de gènes de virulence expliquant la raison pour laquelle les produits laitiers contaminés ne sont pas aussi impliqués dans des épidémies que les matrices à base de viande, malgré le fait qu'ils présentent une plus grande prévalence des souches de STEC. Une autre possibilité pourrait être que l'interaction entre les matrices de produits laitiers et les bactéries induirait une diminution de la pathogénicité de STEC. Par ailleurs, les différences entre les capacités métaboliques de nombreux agents pathogènes d'origine alimentaire ont été mises en évidence dans le passé (Cools et al., 2003; Poppe et al., 2001; Thévenot et al., 2005). La variation des gènes métaboliques entre les souches STEC pourrait également être une piste intéressante à étudier pour expliquer ce paradoxe.

Références bibliographiques

1. Karmali, M., Petric, M., Steele, B. & Lim, C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 321, 619–620 (1983).
2. Loukiadis, E. et al. Surveillance des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) dans les denrées alimentaires en France (2005-2011). *Bull. épidémiologique ANSES* 55, (2012).
3. Ribot, E. M. et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 59–67 (2006).
4. Kruskal, J. B. J. On the Shortest Spanning Subtree of a Graph and the Traveling Salesman Problem. *Am. Math. Soc.* 7, 48–50 (1956).
5. Prim, R. C. Shortest Connection Networks And Some Generalizations. *Bell Syst. Tech. J.* 36, 1389–1401 (1957).
6. FSIS. Risk Profile for Pathogenic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. (2012).
7. Brooks, J. T. et al. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J. Infect. Dis.* 192, 1422–9 (2005).
8. Poppe, C. et al. Trends in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from animals, foods of animal origin, and the environment of animal production in Canada, 1994-1997. *Microb. Drug Resist.* 7, 197–212 (2001).
9. Cools, I. et al. Survival of *Campylobacter jejuni* strains of different origin in drinking water. *J. Appl. Microbiol.* 94, 886–892 (2003).
10. Thévenot, D., Delignette-Muller, M. L., Christieans, S. & Vernozy-Rozand, C. Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 189–200 (2005).

ANNEXE 4 : Article de vulgarisation scientifique n°2

[Science de la Vie] : Prévalence de gènes impliqués dans la virulence de souches STEC O157:H7, O26:H11 et O103:H2 isolées de produits laitiers.

Les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) pathogènes, aussi connus sous le terme d'*E. coli* Entérohémorragiques (EHEC), sont des pathogènes intestinaux associés à des toxi-infections alimentaires collectives aux conséquences souvent gravissimes (Karmali et al., 1983). En dépit de la présence de STEC dans les fromages au lait cru (0,9%), un faible nombre d'épidémies à EHEC semble lié à la consommation de ces denrées alimentaires (Loukiadis et al., 2012). Bien que de nombreux contrôles microbiologiques soient effectués en amont de la mise sur le marché de ces produits laitiers (Farrokh et al., 2013), la question de la réelle pathogénicité des STEC dans ces matrices reste obscure.

Les produits laitiers, et plus particulièrement les fromages, sont des aliments fermentés dont les conditions biotiques (microbiote laitier) et abiotiques (conditions physico-chimiques au cours de la transformation du lait) varient au cours du temps. Ces variations sont des sources de stress importants pour les microorganismes. Ainsi, pour survivre et se maintenir dans de tels environnements, les microorganismes doivent pouvoir mettre en place des mécanismes adaptatifs efficaces, souvent au détriment de certaines fonctions. Ainsi, l'impact de ces matrices complexes sur les capacités adaptatives des STEC pourrait induire une diminution de la pathogénicité potentielle de ces souches par délétion/extinction de certaines fonctions de virulence non essentielles à leur survie dans ces matrices.

Plusieurs travaux ont mis au point des méthodes moléculaires permettant d'apprécier la virulence potentielle de souches STEC isolées de différents environnements (Delannoy et al., 2013b; Pradel et al., 2008). Les souches d'EHEC présentent des profils de virulence typiques permettant leur discrimination de souches STEC potentiellement moins pathogènes. Parmi les marqueurs génétiques ayant été décrits dans la littérature comme étant associés avec le pouvoir pathogène des EHEC, l'association des gènes appartenant à différents îlots de pathogénicités (O-Island [OI]) *espK* (OI-71), *espV* (OI-44), *Z2098* (OI-57) et *ureD* (OI-43/48) semblent permettre la classification des STEC en tant que potentiellement hautement pathogène.

Utilisant ces outils de biologie moléculaire, nous avons cherché à déterminer si des souches de STEC isolées de produits laitiers et appartenant aux sérotypes O157:H7, O26:H11 et O103:H2 présentent des profils associés aux EHEC.

Les profils de virulence de souches de STEC isolées de produits laitiers et appartenant aux sérotypes O26:H11 (n=35), O157:H7 (n=10) et O103:H2 (n=11) ont été déterminés par PCR en temps réel à haut débit pour la recherche des gènes présentés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Prévalence des gènes de virulences chez les STEC O26:H11, O157:H7 et O103:H2 isolés de produits laitier. C1-O26 : Souches O26:H11 du cluster 1, C2-O26 : Souches O26:H11 du cluster 2

		O157:H7	O103:H2	C1-O26:H11	C2-O26:H11
LEE PAI	<i>eae-gamma</i>	100%	0%	0%	0%
	<i>eae-epsilon</i>	0%	100%	0%	0%
	<i>eae-beta</i>	0%	0%	100%	100%
OI-122	<i>efa1</i>	100%	100%	100%	100%
	<i>ent</i>	100%	100%	100%	100%
	<i>pagC</i>	100%	42%	0%	0%
	<i>nleB</i>	100%	100%	100%	100%
	<i>nleE</i>	100%	100%	100%	100%
OI-44	<i>espV</i>	100%	100%	93%	0%
OI-48	<i>iha</i>	100%	92%	100%	0%
	<i>terE</i>	100%	100%	100%	0%
	<i>ureD</i>	100%	100%	97%	0%
OI-50	<i>espK</i>	100%	92%	100%	0%
	<i>espN</i>	100%	92%	100%	17%
OI-57	<i>Z2098</i>	100%	100%	100%	0%
	<i>Z2099</i>	100%	100%	100%	17%
OI-71	<i>espM1</i>	100%	0%	97%	100%
	<i>nleA</i>	100%	0%	100%	100%
	<i>nleF</i>	40%	0%	97%	100%
	<i>Z6065</i>	40%	92%	0%	0%
CRISPR	<i>SP_O157_A</i>	100%	0%	0%	0%
	<i>SP_O157_B</i>	100%	0%	0%	0%
	<i>SP_O157_C</i>	100%	0%	0%	0%
	<i>SP_O45/O103</i>	0%	100%	0%	0%
	<i>SP_O26_C</i>	0%	0%	93%	0%
	<i>SP_O26_D</i>	0%	0%	93%	0%
	<i>SP_O26_E</i>	0%	0%	0%	100%
Hk	<i>arcA-allele2</i>	100%	0%	100%	50%

Sur la base de la présence des facteurs de virulence étudiés, les souches de STEC sont groupées en fonction de leur sérotypes. Les souches d'*E. coli* O157:H7 présentent plus de gènes impliqués dans la virulence que les souches de *E. coli* O26:H11. Ces derniers présentent également plus de marqueurs génétiques associés à la virulence que les souches appartenant au sérotype O103:H2. Néanmoins, les profils d'association de marqueurs génétiques (*espK*, *espV*, *Z2098* et/ou *ureD*) reliés à des profils d'EHEC sont retrouvés chez toutes les souches de STEC étudiées. Les souches du sérotype O26:H11 se distinguent par deux profils majeurs : le cluster 1, présentant les marqueurs génétiques associés avec les profils d'EHEC, et le cluster 2, ne présentant pas ces profils. La présence du gène CRISPR SP_O26_E au sein des souches de ce dernier cluster permet de définir une analogie de profil avec un clone émergent et circulant en France (Delannoy et al., 2015).

Les résultats montrent que les souches STEC étudiées présentent des profils de virulence analogues aux EHEC. Néanmoins, les prévalences des différents sérotypes de STEC dans les produits laitiers ne sont pas équivalentes entre elles. En effet, le sérotype O157:H7, majoritairement impliqué dans les épidémies et présentant le plus de facteur de virulence, est moins fréquemment retrouvé dans ces matrices que les sérotypes O26:H11 et O103:H2 (Farrokh et al., 2013). Cette différence de prévalence de souches STEC appartenant pourrait être une piste à étudier pour apporter des éléments de compréhension quant aux faibles occurrences épidémique liées à la consommation de produit laitiers. De plus, les variations observées sur le terrain concernant la prévalence de telles souches dans les produits laitier ne peuvent être expliquées sur la base des profils génétiques des STEC.

De plus, l'expression des gènes impliqués dans le déclenchement des pathologies à EHEC chez les souches STEC dans les produits laitiers pourrait être une piste de choix à explorer pour comprendre les phénomènes apparents de diminution de leur virulence.

Thomas DOUËLLOU

(tdouellou@gmail.com)

Références bibliographiques

1. Karmali, M., Petric, M., Steele, B. & Lim, C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 321, 619–620 (1983).
2. Loukiadis, E. et al. Surveillance des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) dans les denrées alimentaires en France (2005-2011). *Bull. épidémiologique ANSES* 55, (2012).3. Farrokh, C. et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiol.* 162, 190–212 (2013).
4. EFSA & ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.* 13, 4329 (2015).
5. Delannoy, S., Beutin, L. & Fach, P. Discrimination of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) from non-EHEC strains based on detection of various combinations of type III effector genes. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3257–62 (2013).
6. Pradel, N., Bertin, Y., Martin, C. & Livrelli, V. Molecular analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2118–28 (2008).
7. Delannoy, S., Mariani-Kurkdjian, P., Bonacorsi, S., Liguori, S. & Fach, P. Characteristics of emerging human-pathogenic *Escherichia coli* O26:H11 strains isolated in France between 2010 and 2013 and carrying the *stx2d* gene only. *J. Clin. Microbiol.* 53, 486–92 (2015).

ANNEXE 5 : Article de vulgarisation scientifique n°3

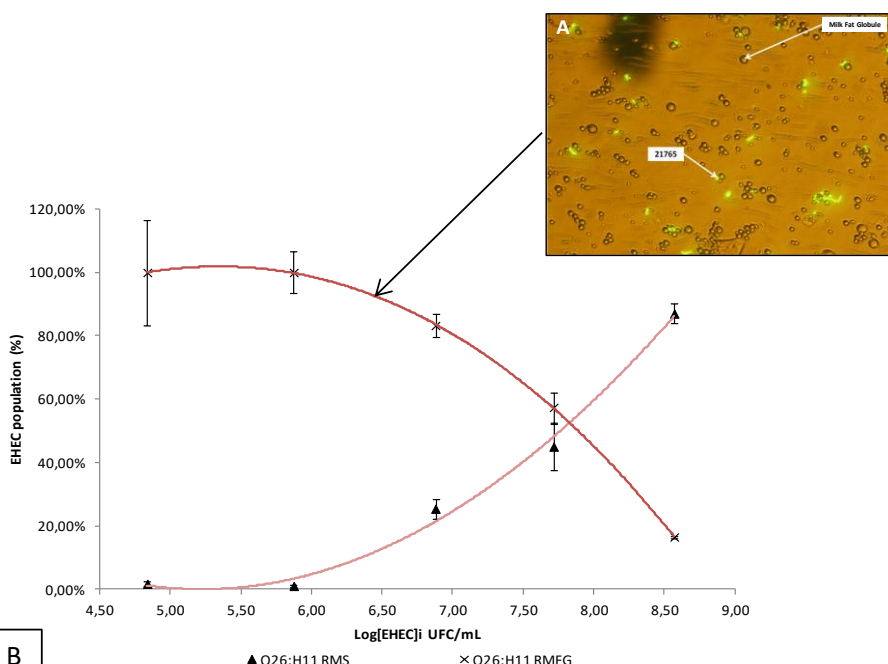
[Science de la Vie] : Impact de la matière grasse du lait sur les capacités infectieuses des *Escherichia coli* Enterohémostatique (EHEC) sérotype O26:H11.

Les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) pathogènes, aussi connu sous le terme *E. coli* Enterohémostatique (EHEC), sont des pathogènes intestinaux associés à des toxi-infections alimentaires collectives aux conséquences souvent gravissimes (Karmali et al., 1983). En dépit de la présence STEC dans les fromages au lait cru (0,9%), un faible nombre de cas d'infections à EHEC semble lié à la consommation de ces denrées alimentaires (Loukiadis et al., 2012). Bien que de nombreux contrôles microbiologiques soient effectués avant la mise sur le marché de ces produits laitiers (Farrokh et al., 2013), la question de la réelle pathogénicité des STEC dans ces matrices reste obscure.

Les produits laitiers sont des aliments exerçant une influence positive sur la santé humaine (Dewettinck et al., 2008; Ebringer et al., 2008; Mills et al., 2011). Parmi ces effets bénéfiques, les propriétés anti-adhésives des glycoconjugués du lait ont été établies pour plusieurs agents pathogènes intestinaux. Plus précisément, le lait est une matrice riche en matière grasse retrouvée à 95% sous forme de globule gras (GG). Ces GG sont délimités par une membrane riche en glycoconjugués (Mather, 2000) dont la surface d'échange peut atteindre jusqu'à 11 m²/L (Michalski et al., 2003). Les sucres associés à ces macromolécules ont suscités plusieurs études concernant leurs propriétés anti-adhésives lors de la colonisation des entérocytes du tube digestif des hôtes (Dewettinck et al., 2008). Nous avons émis l'hypothèse que les EHEC et les GG du lait s'associent. Cette interaction entraînerait une diminution du pouvoir infectieux des EHEC en inhibant leurs capacités d'adhésion au tractus digestif. Ces interactions favoriseraient ainsi l'élimination des EHEC par le flux intestinal de l'hôte.

Les objectifs de l'étude étaient donc (1) de déterminer si une souche d'EHEC appartenant au sérotype O26:H11 (le plus fréquent dans les produits laitiers) présente une affinité particulière pour les globules gras du lait et (2) si ces interactions ont un impact sur les capacités d'adhésion du pathogène à des cellules intestinales humaines cultivées *in vitro*.

Pour répondre au premier objectif, deux types d'expérimentations ont été menées. Dans un premier temps, des observations de laits crus artificiellement contaminés par la souche d'EHEC O26:H11 21765 au microscope à épifluorescence ont été réalisées. Le marquage des souches a été effectué par 5 µg/mL d'anticorps anti-O26 couplés à de la fluorescéine (FITC). Dans un second temps, la dispersion des EHEC dans les différentes phases du lait cru (grasse et écrémée) a également été étudiée. Cent millilitres de lait cru artificiellement contaminés avec des concentrations croissantes d'EHEC ont été placés à 4°C pendant 24h afin de séparer la phase grasse de la phase aqueuse. Les concentrations en EHEC dans chaque phase ont été déterminées par numération des pathogènes sur gélose spécifique (*E. coli* Brilliance, Oxoid, Dardilly). Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen par rapport à la concentration initialement introduite dans le lait pour chacune des deux phases.



Les résultats présentés dans la **Figure 1A** montrent que la souche d'*E. coli* O26:H11 21765 présente une affinité pour la surface des globules gras du lait. De plus, la **Figure 1B** montre que les EHEC s'associent aux GG du lait de manière dose dépendante. En effet, lorsque la concentration en EHEC est faible, les EHEC se retrouvent dans la phase grasse, quand la concentration en EHEC augmente, il y a une saturation progressive de la phase grasse et un passage progressif des EHEC dans la phase écrémée. Néanmoins, la concentration en EHEC dans les deux phases n'a jamais été de 0 UFC/mL, quelle que soit la concentration en EHEC initialement introduite dans le lait.

Pour répondre au second objectif, des analyses *in vitro* ont été mises en œuvre. Afin de déterminer quel est l'impact de la présence des globules gras présentant un tropisme positif vis-à-vis des EHEC en culture dans le lait, des tests d'adhésion des STEC ont été réalisés sur deux lignées cellulaires en co-culture *in vitro*: des cellules Caco-2 (cellules carcinomales de l'intestin humain) et des cellules HT29-MTX (cellules d'adénocarcinome du côlon humain capables d'exprimer du mucus de manière constitutive). La souche EHEC O26:H11 21765 a été inoculée dans du lait en présence ou en absence de globules gras. Ces laits ont ensuite été mis en contact avec les co-cultures des cellules intestinales pendant 2h à 37°C, en atmosphère enrichie en CO₂ et sous agitation (120 rpm). Le tapis cellulaire a été rincé trois fois avec du PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile afin d'éliminer les bactéries n'ayant pas adhéré aux cellules. Les cellules ont ensuite été décrochées en présence de Triton à 0,1% dilué dans du PBS. Les bactéries adhérentes ont été énumérées sur milieu sélectif (ECB) après dilution en série à base 10. Les résultats présentés en **Figure 2** sont exprimés en pourcentage d'EHEC adhérent par cm² de tapis cellulaire.

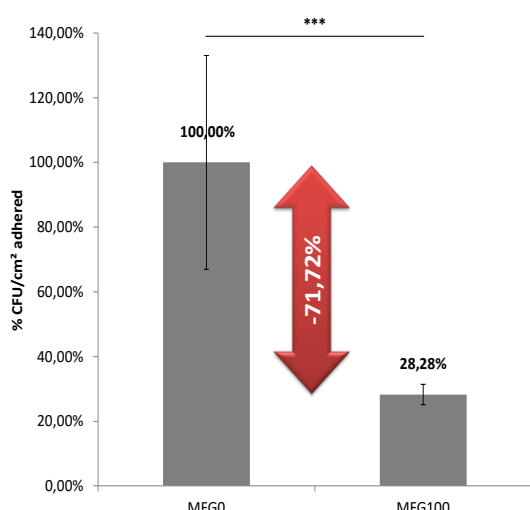


Figure 2 : Résultats des bactéries adhérentes aux cellules enterocytaires Caco-2 et HT29-MTX en co-culture en présence (MFG100) ou en absence (MFG0) de globules gras du lait exprimés en pourcentage de bactéries adhérentes par cm² +/- SEM.

Les résultats présentés dans la **Figure 2** montrent qu'en présence de GG du lait, les EHEC étudiés présentent une diminution significative d'adhésion aux cellules intestinales en culture (~72%). Les globules gras du lait jouent donc un rôle majeur dans l'inhibition de la fixation de cette souche EHEC aux cellules intestinales en culture.

Les résultats présentés montrent que non seulement les EHEC présentent une affinité pour les globules gras du lait, mais également que la présence de globules gras du lait joue un rôle dans l'inhibition de l'adhésion de la souche EHEC O26:H11 étudiée à la barrière intestinale. Des études complémentaires, prenant en comptes les conditions retrouvées dans l'environnement digestif (enzymes lipolytique, sels biliaires, pH acide, présence du microbiote intestinal, ...) pourraient être une piste de choix à étudier pour mieux caractériser les phénomènes décrits dans notre étude.

Références bibliographiques:

1. Karmali, M., Petric, M., Steele, B. & Lim, C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing escherichia coli in stools. *Lancet* 321, 619–620 (1983).
2. Loukiadis, E. et al. Surveillance des E. coli producteurs de shigatoxines (STEC) dans les denrées alimentaires en France (2005-2011). *Bull. épidémiologique ANSES* 55, (2012).
3. Dewettinck, K. et al. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int. Dairy J.* 18, 436–457 (2008).
4. Ebringer, L., Ferencík, M. & Krajcovic, J. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products--review. *Folia Microbiol. (Praha)*. 53, 378–94 (2008).
5. Mills, S., Ross, R. P., Hill, C., Fitzgerald, G. F. & Stanton, C. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int. Dairy J.* 21, 377–401 (2011).
6. Mather, I. H. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *J. Dairy Sci.* 83, 203–47 (2000).
7. Michalski, M.-C. et al. The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties of Camembert cheese. *Lait* 83, 131–143 (2003).

ANNEXE 6 : Poster n°1

Biodiversité des souches d'*Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) isolées de produits laitiers et comparaison de la présence de gènes de pathogénicité selon l'origine.

T. DOUËLLOU^{1,2*}, S. DELANNOY³, S. GANET⁴, P. MARIANI-KURKDJIAN⁵, P. FACH³, E. LOUKIADIS^{2,4}, MC. MONTEL¹, D. THEVENOT^{2,4}

¹ Institut National de Recherche Agronomique, Unité de Recherches Fromagères, 15000 Aurillac, France
² Université de Lyon, Research Group "Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment", UMR5557 Ecologie Microbienne Lyon, Université Lyon 1, CNRS, VetAgro Sup, 69280 Marcy l'Etoile
³ ANSES (French Agency for food, environmental and occupational health & safety), Laboratoire de Sécurité des Aliments de Maisons-Alfort, 23 av. Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort, France
⁴ Université de Lyon, VetAgro Sup Campus Vétérinaire, Laboratoire d'études des Microorganismes Alimentaires Pathogènes – French National Reference laboratory for *Escherichia coli*
⁵ Centre National de Référence Associé des *Escherichia coli*, AP-HP, Service de Microbiologie, Hôpital Robert-Debré, Paris

*Corresponding author: tdouellou@gmail.com

Introduction

Introduction : Etat de l'art

PROBLÈME MAJEUR DE SANTÉ PUBLIQUE
Fort impact pour les industries agro-alimentaires

Contexte

Prévalence STEC en matrices viande

Prévalence STEC en produits laitiers

Paradoxe...

Epidémies dues aux viandes > Epidémies dues aux produits laitiers

Objectifs

Les STEC isolés de produits laitiers sont ils génétiquement différents des souches impliquées dans les pathologies à STEC?

- Etudier la biodiversité des STEC issues de produits laitiers et de différents environnement (Ferme laitière, Viande, Cas Humain) appartenant aux sérotypes majoritairement rencontrés dans les épidémies à STEC.
- Comparer les profils de virulence de souches de STEC O26:H11 et O157:H7 isolées de produits laitiers avec des souches responsable de pathologie chez l'homme.

Matériels et méthodes

Biodiversité des souches de STEC : MACRORESTRICTION Xba1 PFGE

Table 1 : Effectifs de la collection de souche étudiée en PFGE

Sérotypes	Prd Laitiers	Env.	Humains	Viande	Total
O157:H7	12	3	5	6	26
O26:H11	86	6	0	6	98
O103:H2	38	5	1	2	46
O111:H8	9	2	2	0	13
O145:H28	10	2	2	0	14
Total	155	18	10	14	197

Collection de souches caractérisées par macrorestriction de l'ADN total par l'enzyme de restriction Xba1, révélée par migration en PFGE, selon le protocole du CDC (Ribot et al., 2006).
 Comparaison des profils par bioinformatique grâce au logiciel BioNumerics 7.1.

Comparaison des profils de virulence de souches isolées de produits laitiers avec ceux de souches responsables d'épidémies

Table 2 : Effectifs de la collection de souches étudiée en PCR-HD

Produits Laitiers	O157:H7	O26:H11	Total
Humaines	10	36	46
Humaines	18	26	44
Total	28	62	90

Recherche par PCR en temps réel à haut débit (Fluidigm; collaboration avec la plateforme Identypath, ANSES de 23 gènes impliqués dans le déclenchement de la pathologie à STEC).

Résultats

Figure 1 : Dendrogramme des pulsotypes des 197 souches de STEC isolées à partir de différentes origines. Les couleurs définissent les sérotypes O26:H11 (Vert), O157:H7 (Bleu) et O103:H2 (Rouge), O111:H8 (Indigo) et O145:H28 (Jaune). Origine: produits laitiers (Noir), environnement (Gris foncé), viande (Gris clair), cas humains (Blanc).

Souches O26:H11 et O103:H2 sont regroupées en 2 et 4 clusters, respectivement
 Souches d'O157:H7, O111:H8 et O145:H28 ont été regroupées en clusters distincts.
 Très grande biodiversité des souches de STEC (Index de Simpson D = 0,9996)
 Souches ont été dispersés en fonction de leurs sérotypes, indépendamment de leur origine.

Figure 2 : Comparaison des profils de virulence des souches de STEC.
 [A] : Minimum spanning tree représentant la fréquence des gènes de virulence parmi les 90 souches de STEC isolées d'origines différentes: O26:H11 isolées à partir de produits laitiers (vert) ou de cas humains (rouge), O157:H7 isolé à partir de produits laitiers (bleu) ou de cas humains (jaune).
 [B] : Prévalence des souches de STEC sérotypes O26:H11 et O157:H7 isolé à partir de produits laitiers (vert) et de cas humains (rouge).
 [C] : Prévalence de STEC souches de sérotype O26:H11 isolé à partir de produits laitiers (sombres) et de cas humains (clair) et appartenant au cluster 1 (C1, vert) ou cluster 2 (C2, rouge) de l'analyse MST. DP: produits laitiers; H: cas humains.
 Test exact de Fisher: *; p < 0,05; **; P < 0,01; ***; P < 0,001.

Organisation des souches comparable entre la PFGE et la PCR-HD, même si les techniques sont basées sur différents principes.
 Le sérotype O157:H7 présente plus de gènes de virulence (22/23) que sérotype O26:H11 (20/23). Les deux clusters de O26:H11 C1 (20/23) et C2 (12/23) ne sont pas équivalents en terme de facteurs de pathogénicité.
 Faibles variations de gènes impliqués dans la pathologie à STEC entre les deux origines étudiées.
stx1, *espN* et *stx2* pour O26:H11; *stx1* et *nleF* pour les souches O157:H7

Conclusions

Les résultats semblent indiquer que le paradoxe entre la prévalence des souches de STEC en produits laitiers en France et le faible nombre de cas épidémiologiques depuis 2002 pourrait ne pas être complètement dû au génotype.

Les interactions entre les STEC -la composition biochimique des fromages - environnements physico-chimiques, pourraient être une piste à explorer pour expliquer ce paradoxe.

ANNEXE 7 : Poster n°2

Do milk fat globule play a role against adhesion properties of Enterohemorrhagic *E. coli* to human intestinal cells culture?

T. DOUËLLOU^{1,2,*}, W. GALIA², S. KERANGART², C. PROUILLAC³, MC. MONTEL¹, D. THEVENOT^{2,4}

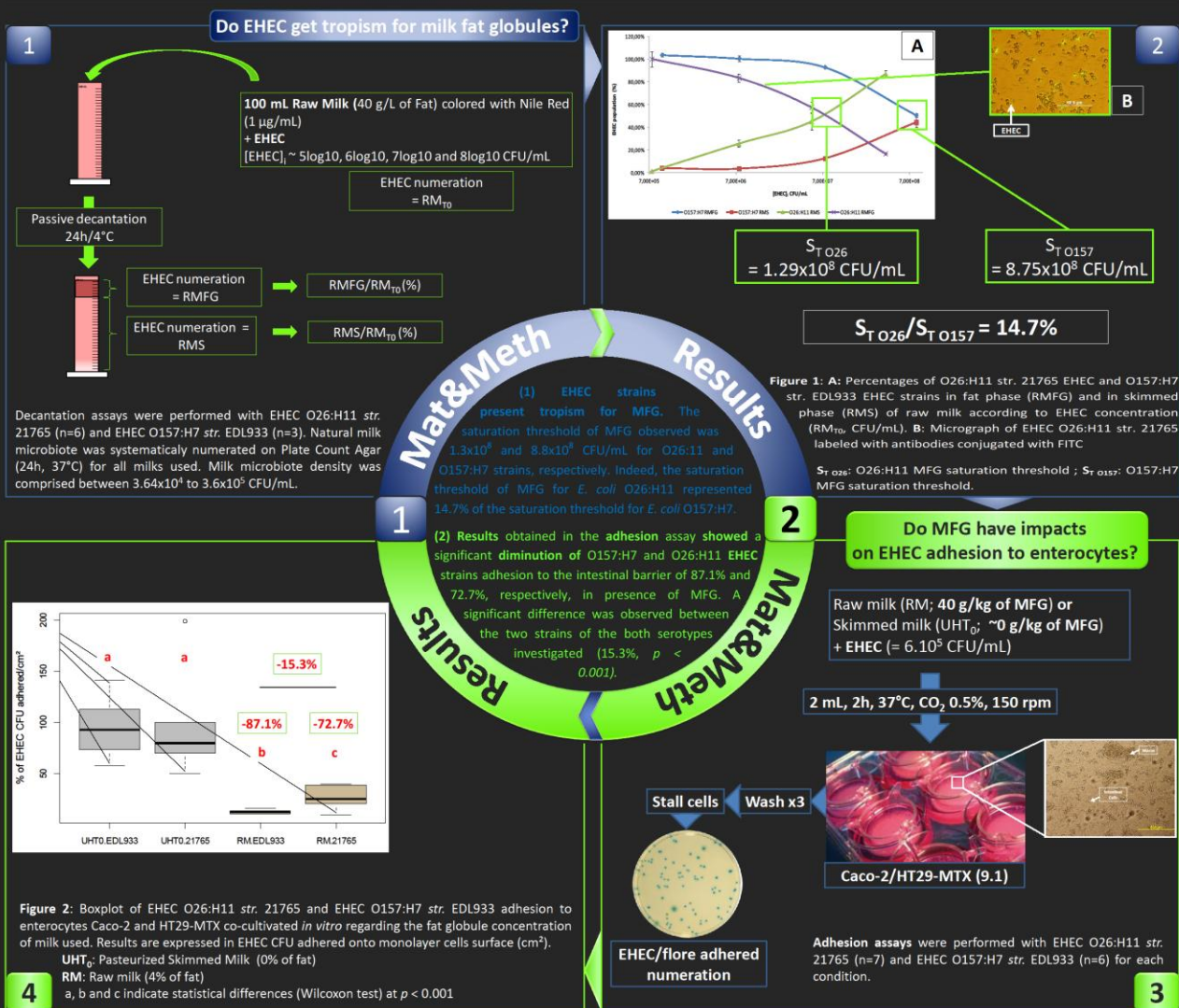
¹ Institut National de Recherche Agronomique, Unité de Recherches Fromagères, 15000 Aurillac, France. ² Université de Lyon, Research Group "Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment", UMR5557 Ecologie Microbienne Lyon, Université Lyon 1, CNRS, VetAgro Sup, 69280 Marcy l'Etoile. ³ Université Lyon, US/C 1233 INRA VetAgroSup, Métabolisme et Toxicologie Comparée des Xénobiotiques, 1 avenue Bourgelat, BP 83, 69280 Marcy l'Etoile, France. ⁴ Université de Lyon, VetAgro Sup Campus Vétérinaire, Laboratoire d'études des Microorganismes Alimentaires Pathogènes – French National Reference laboratory for *Escherichia coli* including Shiga toxin producing *E. coli* (NRL-EHEC), 69280, Marcy l'Etoile.

* Corresponding author: tdouellou@gmail.com

INTRODUCTION

Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) are food-borne agents associated with outbreaks worldwide. In France, official monitoring plans in 2009¹ evaluated STEC prevalence ("Top-5", *stx+*, *eae+*) in raw ground beef and cheese. Results showed an occurrence of respectively 0.3% and 0.9%. Accordingly, it is surprising that raw milk cheeses are not involved in more outbreaks than beef products (www.inra.santa.fr/)^{1,2,3}.

On the basis of this paradox, we hypothesized that abiotic interactions occurred between EHEC and raw milk components, such as milk fat globules (MFG) membrane glycoproteins, which may inhibit EHEC adhesion to human enterocyte cell lines Caco-2 and HT29-MTX co-cultured *in vitro*.



IMPLICATIONS

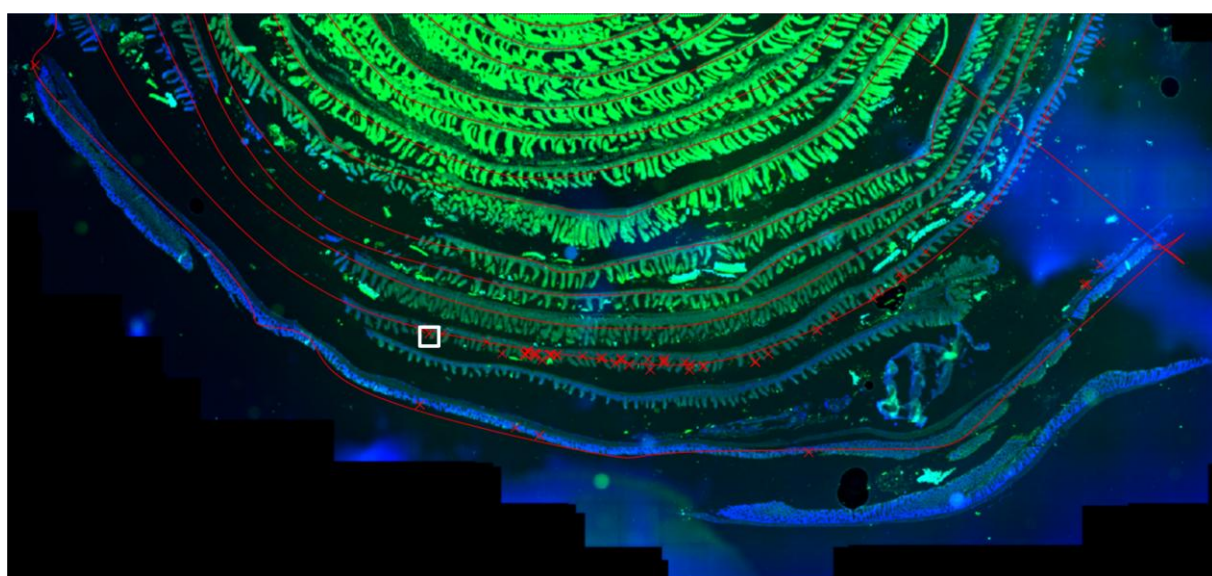
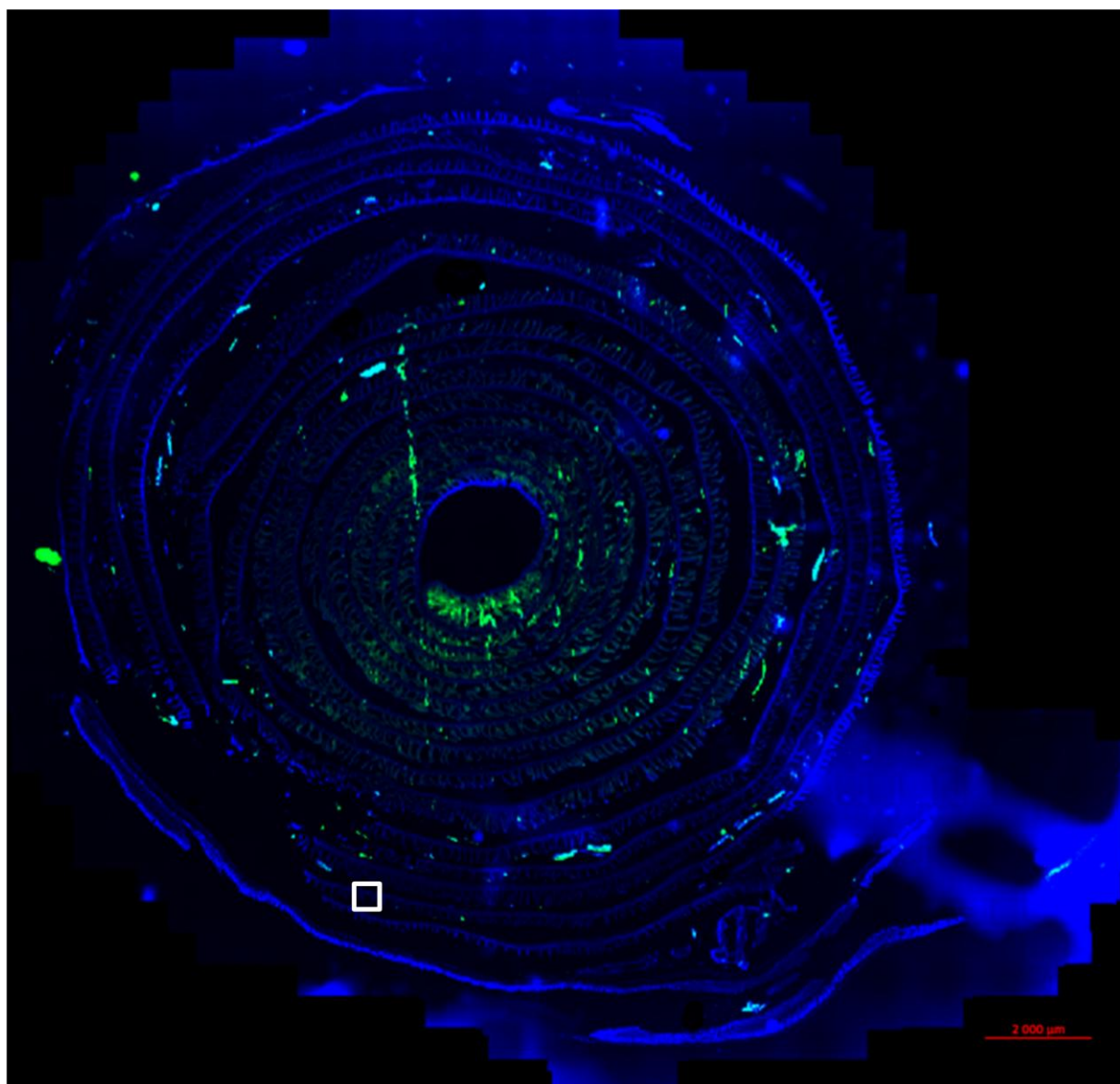
The limited number of cases of EHEC infections linked to the consumption of raw milk products could be impacted by the presence of MFG in such products. Then, molecules derived from raw milk matrices (e.g. Milk Fat Globules Membrane glycoproteins)⁴ may be a suitable way to limit EHEC adhesion and prevent diseases as an anti-adhesion agent.

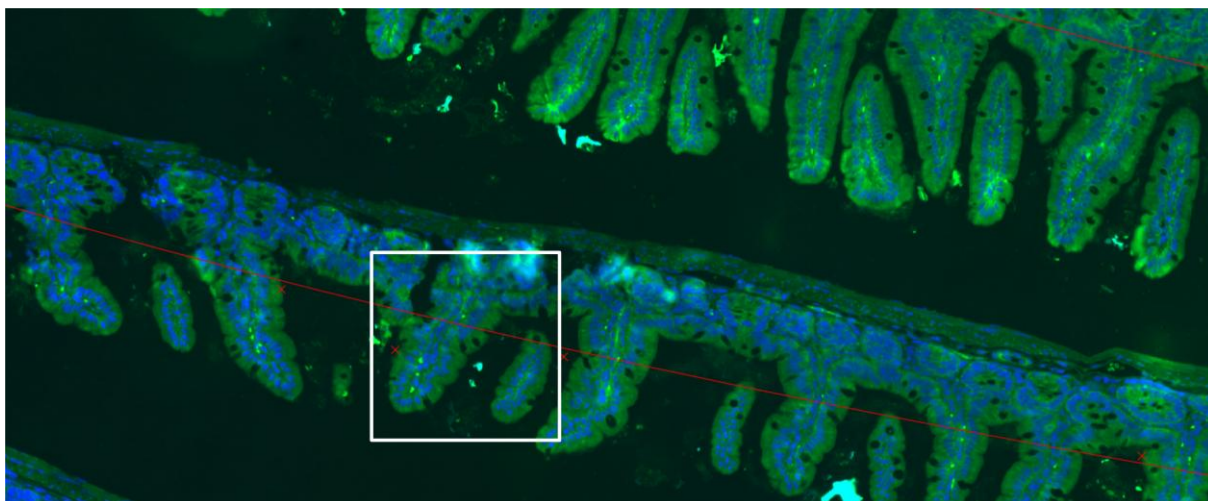
We also can interrogate on which impact of fat on food protection of human against EHEC.

¹ Loukidiadis, E. et al. Surveillance des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) dans les denrées alimentaires en France (2005-2011). *Bull. épidémiologique ANSES* 55, (2012). ² Espié, E., Grimont, F., Pihier, N., Debré, H. R. & Pasteur, I. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurized cows cheese, France, 2005, 11, 94415 (2008). ³ Espié, E. et al. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiol. Infect.* 134, 143-6 (2006). ⁴ Simon, P. M., Goode, P. L., Mobasser, A. & Zopf, D. Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. *Infect. Immun.* 65, 750-757 (1997).

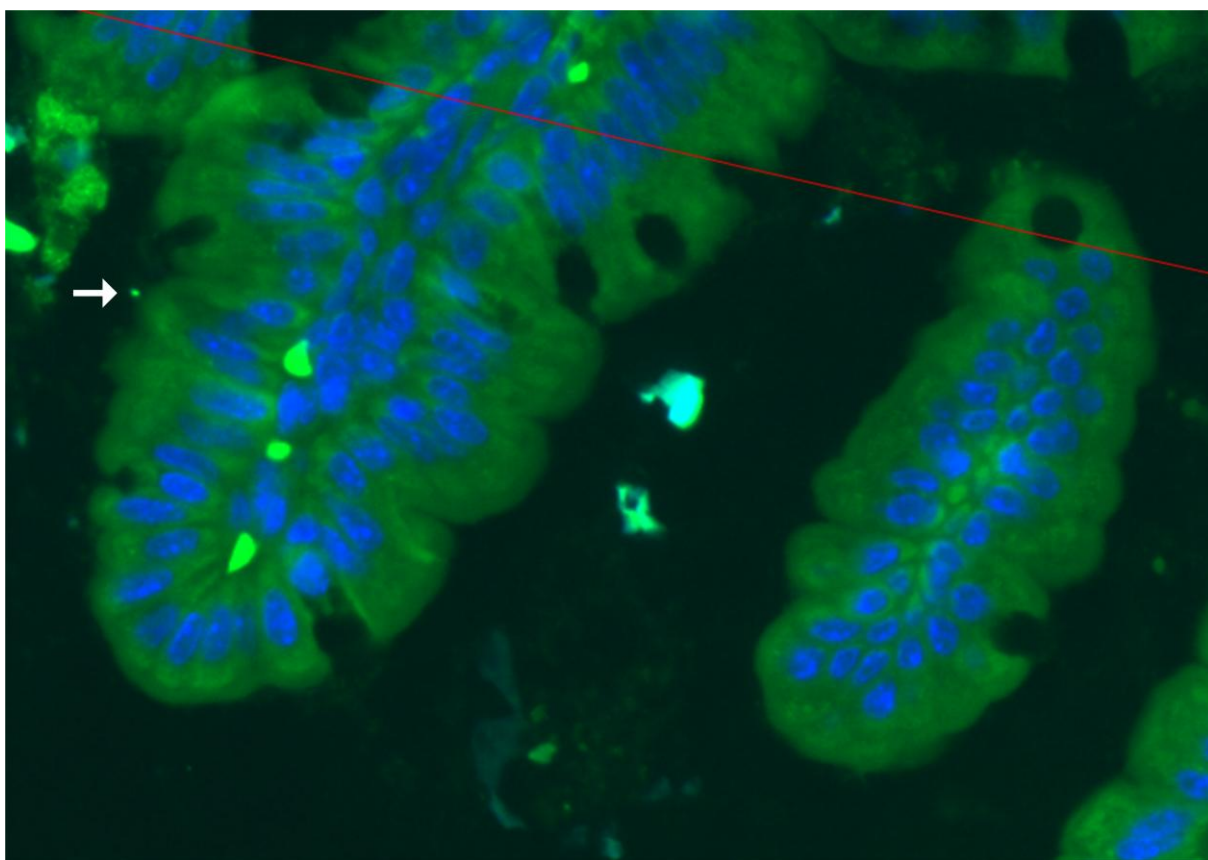
This work was financed by the CNIEL (Comité National des Industries et Entreprises Laitières) and the Auvergne Region. We also want to thank the LVD for their help during optimization of microscopy observations.

**ANNEXE 8 : Exemple d'image de coupe histologique et
analyses des données obtenues**





Coupe histologique « *Swiss roll* » d'intestin de souris nourie avec du fromage contenant 0% de matière grasse et contaminé avec la souche d'EHEC O26:H11. Les noyaux des cellules intestinales sont marqués au DAPI (Bleu), les EHEC sont marqués avec des anticorps spécifiques dirigés contre l'antigène de paroi O et couplés au FITC (vert). Le carrée blanc indique la zone grossie dans l'image suivante.



Vilosité intestinale de souris nourie avec du fromage contenant 0% de matière grasse et contaminé avec la souche d'EHEC O26:H11. La flèche indique une cellule d'EHEC.

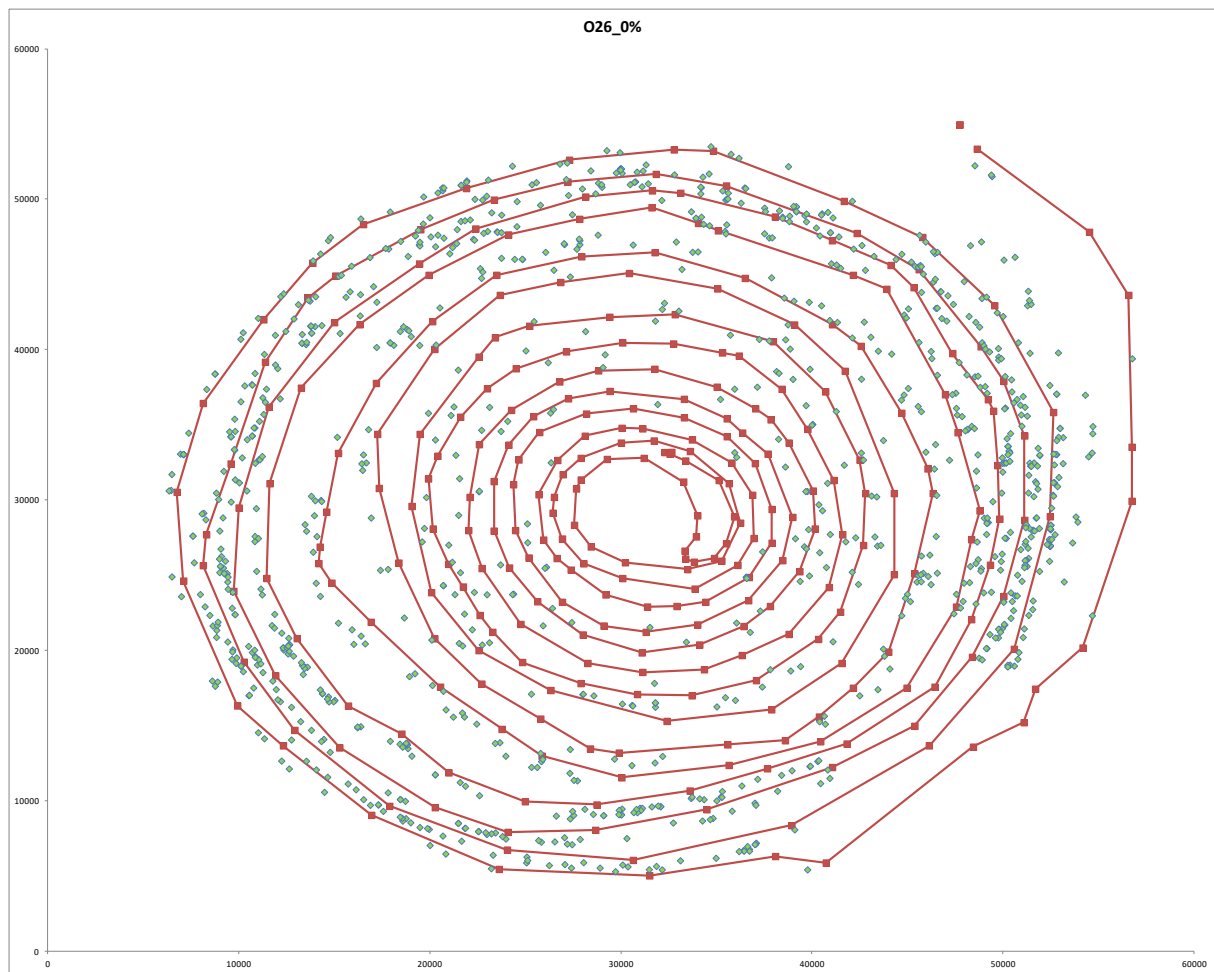


Image virtuelle obtenue à partir des observations de coupe histologique de souris nourrie avec du fromage contenant 0% de matière grasse et contaminé avec la souche d'EHEC O26:H11. Le nuage de points rouges représente la longueur de l'intestin. Le nuage de points bleus représente la localisation des cellules d'EHEC O26:H11.

ANNEXE 9 : Références Bibliographiques du Tableau 7
(d'après Farrokh et al., 2013)

1. M.L. Martin, L.D. Shipman, J.G. Wells, M.E. Potter, K. Hedberg, I.K. Wachsmuth, R.V. Tauxe, J.P. Davis, J. Arnoldi, J. Tilleli. 1986. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet*, 328 (1986), p. 1043.
2. J. Bockemühl, H. Karch, H. Rüssmann, S. Aleksic, R. Wiss, P. Emmrich. 1990. Shiga-like toxin (verotoxin)-produzierende *Escherichia coli* O22:H8: Übertragung durch unpasteurisierte Milch mit nachfolgender Erkrankung an hämolytisch-urämischem Syndrom. *Bundesgesundheitsblatt*, 33 (1990), pp. 3–6.
3. J.G. Wells, L.D. Shipman, K.D. Greene, E.G. Sowers, J.H. Greene, D.N. Camron, F.P. Downes, M.L. Martin, P.M. Griffin, S.M. Ostroff. 1991. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* from dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 29 (1991), pp. 985–989.
4. D. Morgan, C.P. Newman, D.N. Hutchinson, A.M. Waiker, B. Rowe, F. Majid. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiology and Infection*, 111 (1993), pp. 181–187.
5. C. Casenave, J.C. Desenclos, E. Maillot, S. Benoît, G. Deschenes, H. Nivet, F. Grimont, S. Baron, P. Mariani, P.A.D. Grimont. 1993. Écllosion de syndrome hémolytique et urémique dans une commune rurale du Cher. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire*, 48 (1993), pp. 222–224.
6. G. Deschênes, C. Casenave, F. Grimont, J.C. Desenclos, S. Benoit, M. Collin, S. Baron, P. Mariani, P.A. Grimont, H. Nivet. 1996. Cluster of cases of haemolytic uraemic syndrome due to unpasteurised cheese. *Pediatric Nephrology*, 10 (1996), pp. 203–205.
7. W.E. Keene, K. Hedberg, D.E. Herriott, D.D. Hancock, R.W. McKay, T.J. Barrett, D.W. Fleming. 1997. A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk. *Journal of Infectious Diseases*, 176 (1997), pp. 815–818.
8. A. Ammon. 1997. Surveillance of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) infections and haemolytic uraemic syndrome (HUS) in Europe. *Eurosurveillance*, 2 (1997), pp. 91–95 (article 133, 1997-12-01).
9. P.G. Wall, R.J. McDonnell, G.K. Adak, T. Cheasty, H.S. Smith, B. Rowe. 1996. General outbreaks of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 in England and Wales from 1992 to 1994. *Communicable Diseases Report, CDR Reviews*, 6 (1996), pp. R26–R33.
10. P. Upton, J.E. Coia. 1994. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply. *The Lancet*, 344 (1994), p. 1015.
11. A. Ammon. 1997. Surveillance of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) infections and haemolytic uraemic syndrome (HUS) in Europe. *Eurosurveillance*, 2 (1997), pp. 91–95 (article 133, 1997-12-01).
12. N.J.C. Strachan, G.M. Dunn, E. Mary, M.E. Locking, T.M.S. Reid, I.D. Ogden. 2006. *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *International Journal of Food Microbiology*, 112 (2006), pp. 129–137.
13. B. Decludt. 1995. Cas groupés de syndromes hémolytiques et urémiques dans le département de l'Ardèche en 1994. *Institut de Veille Sanitaire, France* (1995).
14. CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). 1995. Outbreak of acute gastroenteritis attributable to *Escherichia coli* serotype O104:H21 — Helena, Montana, 1994. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 44 (1995), pp. 501–503.
15. M. Bielaszewska, J. Janda, K. Bláhová, H. Minaríková, E. Jíková, M.A. Karmali, J. Laubová, J. Šikulová, M.A. Preston, R. Khakhria, H. Karch, H. Klazarová, O. Nyc. 1997. Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiology and Infection*, 119 (1997), pp. 299–305.
16. J. Bockemühl, H. Karch. 1996. Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen. *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994–1995). *Bundesgesundheitsblatt*, 39 (1996), pp. 290–296.
17. A. Clark, S. Morton, P. Wright, J. Corkish, F.J. Bolton, J. Russell. 1997. A community outbreak of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection linked to a small farm dairy. *Communicable Disease Report. CDR Review*, 7 (1997), pp. R206–R211.
18. E. Lahti, M. Eklund, P. Ruuru, A. Siitonen, L. Rantala, P. Nuorti, T. Honkanen-Busalski. 2002. Use of phenotyping and genotyping to verify transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy farms. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21 (2002), pp. 189–195.
19. N.J.C. Strachan, M.P. Doyle, F. Kasuga, O. Rotariu, I.D. Ogden. 2005. Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks. *International Journal of Food Microbiology*, 103 (2005), pp. 35–47.
20. N.J.C. Strachan, G.M. Dunn, E. Mary, M.E. Locking, T.M.S. Reid, I.D. Ogden. 2006. *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *International Journal of Food Microbiology*, 112 (2006), pp. 129–137.
21. CDSC (Communicable Disease Surveillance Centre). 1998. Outbreak of vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection in Dorset. *CDR Weekly: Communicable Disease Report*, 8 (183) (1998), p. 186.

22. CDSC (Communicable Disease Surveillance Centre). 1998. Cases of *Escherichia coli* O157 infection associated with unpasteurised cream in England. *Eurosurveillance*, 2 (1998), p. 1135 (1998-10-29).
23. CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). 2000. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds—Wisconsin, June 1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 49 (2000), pp. 911–913.
24. Anonymous. 1999. Outbreak of vero cytotoxin-producing *E. coli* O157 infection in North Cumbria. *CDR Weekly*, 9 (1999), pp. 95–98 (<http://www.hpa.org.uk/cdr/archives/1999/cdr1199.pdf>. Last accessed 17th October 2011).
25. J. Curnow. 1999. *Escherichia coli* O157 outbreak in Scotland linked to unpasteurised goat's milk. *Eurosurveillance*, 3 (1999) (article 1387).
26. F. Allerberger, M. Wagner, P. Schweiger, H.P. Rammer, A. Resch, M.P. Dierich, A.W. Friedrich, H. Karch. 2001. Infections à *Escherichia coli* O157 associées au lait non pasteurisé. *Eurosurveillance*, 6 (2001) (article 379, 2001-10-01).
27. L. McIntyre, J. Fung, A. Paccagnella, J. Isacc-Renton, F. Rockwell, B. Emerson, T. Preston. 2002. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with the ingestion of unpasteurized goat's milk in British Columbia, 2001. *Canadian Communicable Disease Report*, 28 (2002), pp. 6–8.
28. L. Honish, G. Predy, N. Hislop, L. Chui, K. Kowalewska-Grochowska, L. Trottier, C. Kreplin, I. Zazulak. 2005. An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized Gouda cheese. *Revue canadienne de Santé publique*, 96 (2005), pp. 182–184.
29. F. Allerberger, A.W. Friedrich, K. Grif, M.P. Dierich, H.J. Dornbusch, C.J. Mache, E. Nachbaur, M. Freilinger, P. Rieck, M. Wagner. 2003. Hemolytic–uremic syndrome associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H infection and consumption of unpasteurized cow's milk. *International Journal of Infectious Diseases*, 7 (2003), pp. 42–45.
30. A. Liptakova, L. Siegfried, J. Rosocha, L. Podracka, E. Bogyiova, D. Kotulova. 2004. A family outbreak of haemolytic uraemic syndrome and haemorrhagic colitis caused by verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 from unpasteurised cow's milk in Slovakia. *Clinical Microbiology and Infection*, 10 (2004), pp. 576–578.
31. C. Jensen, S. Ethelberg, A. Gervelmeyer, E.M. Nielsen, K.E. Olsen, K. Mølbak. 2006. First general outbreak of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Denmark. *Eurosurveillance*, 11 (2006) (article 597, 2006-02-01).
32. MAPAQ (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec), 2004. Mise en garde - Onze personnes malades à la suite de la consommation de fromages au lait cru fabriqués à la ferme. Press Release, 2004-07-14.
33. INVS (Institut de Veille Sanitaire). 2004. Investigation autour de deux cas de SHU à *E. coli* O157 dans les Vosges. (June 2004).
34. E. Espié, V. Vaillant, P. Mariani-Kurkdjian, F. Grimont, R. Martin-Schaller, H. De Valk, C. Vernozzy-Rozand. 2006. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiology and Infection*, 134 (2006), pp. 143–146.
35. A.L. Becker. 2005. Alberta *E. coli* outbreak tied to milk shakes. Press release CIDRAP. 2005-05-13.
36. CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). 2007. *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with drinking raw milk — Washington and Oregon, November–December 2005. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 56 (2007), pp. 165–167.
37. INVS (Institut de Veille Sanitaire). 2007. Epidémie d'infections à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines non O157 liée à la consommation de camembert au lait cru, nord ouest de la France, octobre-décembre 2005 (2007). Available at http://www.invs.sante.fr/publications/2008/epidemie_e_coli_camembert/rapport_epidemie_stec.pdf. Last accessed 21st August 2012.
38. RKI (Robert Koch Institut). 2008. Zum Auftreten mehrerer EHEC-Infektionen nach Rohmilchverzehr in einem Ferienlager. *Epidemiologisches Bulletin*, 11 (2008), pp. 16–18.
39. D. Buglino, K. Smith-Sayer, S. Fortino, J. Van Meter, E. Frykman, L. Crawford-Miksza, C. Myers, S. Himathongkham, M. Palumbo, J. Atwell, T. Chang, D. Csuti, S. Fontanoz, Y. Gerbremaichael, J. Glover, J. O'Connell, B. Sun, C. Wheeler, Y. Zhao, M. Lynch. 2008. *Escherichia coli* O157:H7 infections in children associated with raw milk and raw colostrum from cows — California, 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 57 (2008), pp. 625–628.
40. CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). 2008. *Escherichia coli* O157:H7 infections in children associated with raw milk and raw colostrum from cows —California, 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 57 (2008), pp. 625–628.

41. K. De Schrijver, G. Buvens, B. Possé, D. Van den Branden, C. Oosterlynck, L. De Zutter, K. Eilers, D. Piérard, K. Dierick, R. Van Damme-Lombaerts, C. Lauwers, R. Jakobs. 2008. Outbreak of verocytotoxin-producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with consumption of ice cream produced at a farm, Belgium, 2007. *Eurosurveillance*, 13 (2008) (article 8041, 2008-02-14).
42. G. Buvens, B. Possé, K. De Schrijver, L. De Zutter, S. Lauwers, D. Pierard. 2011. Virulence profiling and quantification of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O145:H28 and O26:H11 isolated during an ice cream-related haemolytic uremic syndrome outbreak. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8 (2011), pp. 421–426.
43. CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). 2007. Foodborne Outbreak Online Database, 2007 July, Colorado, *E. coli* Shiga Toxin Producing O121, O26, O84, Prison Jail. American Cheese Pasteurized (2007) (<http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/Default.aspx>. Last accessed December 24th 2011).
44. B. Marler. 2009. 2008 Raw Goat Milk *E. coli* O157:H7 Outbreak Linked to Dairy and Retail. Marlor Blog (2009) (2009-12-16, <http://www.marlerblog.com/legalcases/2008-raw-goat-milk-e-coli-o157h7-outbreak-linked-to-dairy-and-retail/>. Last accessed 23 April 2012).
45. Food Poison Journal, 2009-12-02, presented by Marler Clark. <http://www.foodpoisonjournal.com/foodborne-illness-outbreaks/raw-milk-e-coli-strikes-again-recentillnesses-are-reminder-of-risks-from-drinking-raw-milk/>. Last accessed 19th April 2012.
46. Minnesota Department of Health, 2010. Three more *E. coli* cases linked to raw milk from farm. News release, 2010-06-11, <http://www.health.state.mn.us/news/pressrel/2010/ecoli061110.html>. Last accessed 23rd April 2012.
47. B. Marler. 2010. Raw Milk *E. coli* O157:H7 Outbreak Strikes Minnesota. Seventh Outbreak in 2010. Marler Blog (2010) (2010-05-28, <http://www.marlerblog.com/legalcases/raw-milk-e-coli-o157h7-outbreak-strikes-minnesota-seventh-outbreak-in-2010/>. Last accessed 23 April 2012).
48. CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). 2010. Investigation Update: Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with Cheese. (2010) (2010-11-24).
49. M. Rothschild. 2010. Sally Jackson cheese confirmed as outbreak source. Food Safety News-12-21, http://beforeitsnews.com/story/319/970/Sally_Jackson_Cheese_Confirmed_as_Outbreak_Source.html. Last accessed 17th October 2011.
- 50 EFSA, 2016. Multi-country outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection associated with haemolytic uraemic syndrome European Food Safety Authority.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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., Griffin, P.M., Slutsker, L., 1998. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J. Infect. Dis.* 177, 1588–93.
- AFSSA, 2010. Afssa – Saisine n ° 2010-SA-0031 Saisine liée n ° 2008-SA-0122 de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis Afssa du 15 juillet 2008. Afss.
- Ahmer, B., Thomas, M., Larsen, R., Postle, K., 1995. Characterization of the *exbBD* operon of *Escherichia coli* and the role of ExbB and ExbD in TonB function and stability. *J. Bacteriol.* 177, 4742–4747.
- Al-Jader, L., Salmon, R.L., Walker, A.M., Williams, H.M., Willshaw, G.A., Cheasty, T., 1999. Outbreak of *Escherichia coli* O157 in a nursery: lessons for prevention. *Arch. Dis. Child.* 81, 60–63. doi:10.1136/ad.81.1.60
- Allaby, M.A., Mayon-White, R., 1995. *Escherichia coli* O 157: outbreak in a day nursery. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* 5, R4–6.
- Anantharaman, V., Iyer, L.M., Aravind, L., 2012. Ter-dependent stress response systems: novel pathways related to metal sensing, production of a nucleoside-like metabolite, and DNA-processing. *Mol. Biosyst.* 8, 3142–65. doi:10.1039/c2mb25239b
- Ansary, S.E., Kaspar, C.W., 1997. Survey of retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for *Escherichia coli* O157 : H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 131–134. doi:10.1046/j.1472-765X.1997.00190.x
- ANSES, 2015. Information des consommateurs en matière de prévention des risques biologiques liés aux aliments. *Rapp. d'expertise Collect.* 2.
- ANSES, 2011. ANSES – Saisine n ° 2010-SA-0031 Le directeur général de l'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la révision de la définition des *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) majeurs typiq 33, 27–31.
- Arnold, K., Kaspar, C., 1995. Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2037–2039.
- Arocha, M.M., McVey, M., Loder, S.D., Rupnow, J.H., Bullerman, L., 1992. Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of cottage cheese. *J. Food Prot.* 55, 379–381.
- Auvray, F., Lecureuil, C., Dilasser, F., Taché, J., Derzelle, S., 2009. Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for the screening of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 554–9. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02561.x
- Badea, L., Doughty, S., Nicholls, L., Sloan, J., Robins-Browne, R.M., Hartland, E.L., 2003. Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Microb. Pathog.* 34, 205–15.
- Bandyopadhyay, S., Lodh, C., Sarkar, M., Ghosh, M.K., Bera, A.K., Bhattacharyya, D., Mondal, D.K., Baruah, K.K., 2012. Prevalence, molecular fingerprinting and drug resistance profile of

- enterovirulent *Escherichia coli* isolates from free-ranging yaks of Tawang district, Arunachal Pradesh, India. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 1063–72. doi:10.1007/s11250-011-0041-9
- Barnett Foster, D., 2013. Modulation of the enterohemorrhagic *E. coli* virulence program through the human gastrointestinal tract. *Virulence* 4, 315–23. doi:10.4161/viru.24318
- Barroso, L.A., Wang, S.-Z., Phelps, C.J., Johnson, J.L., Wilkins, T.D., 1990. Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin B gene. *Nucleic Acids Res.* 18.
- Bastian, S.N., Sivelä, S.K., Cerf, O., Heggum, C., Url, B., Chandler, R., Richardson, P.A., Caestecker, R., Tulloch, D., Vignal, J., Jung, W., Kützemeier, T., Runge, G., Sivelä, S., Burel, D., Burgess, K.J., Chawla, N.K., Kumar, R., Varshney, N.N., Neviani, E., Piazza, I., Bouwman, M.J.A., Maeijer, R.W., Pearce, L., Rola, J.G., Alnäs, H. (et al.), 2000. *Escherichia coli* O157:H7: aspects of concern to the dairy industry. *Bull. Int. Dairy Fed.* 57–62.
- Baylis, C.L., 2009. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Int. J. Dairy Technol.* 62, 293–307. doi:10.1111/j.1471-0307.2009.00504.x
- Bell, B.P., Goldoft, M., Griffin, P.M., Davis, M.A., Gordon, D.C., Tarr, P.I., Bartleson, C.A., Lewis, J.H., Barrett, T.J., Wells, J.G., 1994. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *JAMA* 272, 1349–53.
- Belongia, E.A., 1993. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Minnesota Child Day-care Facilities. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 269, 883. doi:10.1001/jama.1993.03500070063030
- Berry, E.D., Wells, J.E., 2010. *Escherichia coli* O157:H7: recent advances in research on occurrence, transmission, and control in cattle and the production environment. *Adv. Food Nutr. Res.* 60, 67–117. doi:10.1016/S1043-4526(10)60004-6
- Bertin, Y., Chaucheyras-Durand, F., Robbe-Masselot, C., Durand, A., de la Foye, A., Harel, J., Cohen, P.S., Conway, T., Forano, E., Martin, C., 2013. Carbohydrate utilization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. *Environ. Microbiol.* 15, 610–22. doi:10.1111/1462-2920.12019
- Beutin, L., 1991. The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Med. Microbiol. Immunol.* 180. doi:10.1007/BF00215246
- Beutin, L., Delannoy, S., Fach, P., 2016. Genetic Analysis and Detection of *fliC* H1 and *fliC* H12 Genes Coding for Serologically Closely Related Flagellar Antigens in Human and Animal Pathogenic *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 7, 135. doi:10.3389/fmicb.2016.00135
- Beutin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S., Scheutz, F., 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2483–2488.
- Beutin, L., Martin, A., 2012. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *J. Food Prot.* 75, 408–18. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-452
- Beutin, L., Miko, A., Krause, G., Pries, K., Haby, S., Steege, K., Albrecht, N., 2007. Identification of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4769–75. doi:10.1128/AEM.00873-07

- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M.P., Gonza, E.A., Blanco, J., 2004. Serotypes , Virulence Genes , and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin) -Producing *Escherichia coli* Isolates from Cattle in Spain and Identification of a New Intimin Variant Gene (eae-) 42, 645–651. doi:10.1128/JCM.42.2.645
- Bolduc, D., Srouf, L.F., Sweet, L., Neatby, A., Galanis, E., Isaacs, S., Lim, G., 2004. Severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in health care institutions in Charlottetown, Prince Edward Island, fall, 2002. *Canada Commun. Dis. Rep. = Relev. des Mal. Transm. au Canada* 30, 81–8.
- Boos, W., Mayer, C., 2013. Hexose/Pentose and Hexitol/Pentitol Metabolism. *EcoSal Plus* 1. doi:10.1128/ecosalplus.3.4.1
- Boudailliez, B., Berquin, P., Mariani-Kurkdjian, P., Ilf, D.D., Cuvelier, B., Capek, I., Tribout, B., Bingen, E., Piusan, C., 1997. Possible person-to-person transmission of *Escherichia coli* O111 - associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 11, 36–39. doi:10.1007/s004670050229
- Breuer, T., Benkel, D.H., Shapiro, R.L., Hall, W.N., Winnett, M.M., Linn, M.J., Neimann, J., Barrett, T.J., Dietrich, S., Downes, F.P., Toney, D.M., Pearson, J.L., Rolka, H., Slutsker, L., Griffin, P.M., A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 977–82. doi:10.3201/eid0706.010609
- Brooks, J.T., Sowers, E.G., Wells, J.G., Greene, K.D., Griffin, P.M., Hoekstra, R.M., Strockbine, N.A., 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. *J. Infect. Dis.* 192, 1422–9. doi:10.1086/466536
- Brown, J.L., Ross, T., McMeekin, T.A., Nichols, P.D., 1997. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *Int. J. Food Microbiol.* 37, 163–173. doi:10.1016/S0168-1605(97)00068-8
- Buchanan, R., Edelson, S., 1999. Effect of pH-dependent, stationary phase acid resistance on the thermal tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 16, 447–458. doi:10.1006/fmic.1998.0260
- Bugarel, M., Beutin, L., Fach, P., 2010. Low-density microarray targeting non-locus of enterocyte effacement effectors (nle genes) and major virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): A new approach for molecular risk assessment of STEC isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 203–211. doi:10.1128/AEM.01921-09
- Bugarel, M., Beutin, L., Scheutz, F., Loukiadis, E., Fach, P., 2011. Identification of genetic markers for differentiation of Shiga toxin-producing, enteropathogenic, and avirulent strains of *Escherichia coli* O26. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2275–81. doi:10.1128/AEM.02832-10
- Burland, V., Shao, Y., Perna, N., Plunkett, G., Blattner, F., Sofia, H., 1998. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res.* 26, 4196–4204. doi:10.1093/nar/26.18.4196
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., Ros, J., 2000. Oxidative Stress Promotes Specific Protein Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 27393–27398.
- Callaway, T.R., Stahl, C.H., Edrington, T.S., Genovese, K.J., Lincoln, L.M., Anderson, R.C., Lonergan, S.M., Poole, T.L., Harvey, R.B., Nisbet, D.J., 2004. Colicin concentrations inhibit growth of *Escherichia coli* O157:H7 in vitro. *J. Food Prot.* 67, 2603–7.
- Callon, C., Arliguie, C., Montel, M.-C., 2016a. Control of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in

- cheese by dairy bacterial strains. *Food Microbiol.* 53, 63–70. doi:10.1016/j.fm.2015.08.009
- Callon, C., Ndob, A.M., Savignard, A., Rifa, E., Montel, M.-C., 2016b. *Escherichia coli* O26:H11 growth in co-culture with an antagonistic strain of *Hafnia alvei* according to pH and temperature. *Food Control* 62, 117–124. doi:10.1016/j.foodcont.2015.10.022
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H., Oswald, E., 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 36, 289–311. doi:10.1051/vetres:2005002
- Casadevall, A., Pirofski, L., 2001. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J. Infect. Dis.* 184, 337–44. doi:10.1086/322044
- CDC, 2010. Investigation update: multistate outbreak of human *E. coli* O145 infections linked to shredded romaine lettuce from a single processing facility.
- CDC, 2006. Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach--United States, September 2006. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 55, 1045–6.
- CDC, 2001. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections among children associated with farm visits--Pennsylvania and Washington, 2000. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 50, 293–7.
- Chase-Topping, M., Gally, D., Low, C., Matthews, L., Woolhouse, M., 2008. Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 904–912. doi:10.1038/nrmicro2029
- Chassaing, B., Rolhion, N., de Vallée, A., Salim, S.Y., Prorok-Hamon, M., Neut, C., Campbell, B.J., Söderholm, J.D., Hugot, J.-P., Colombel, J.-F., Darfeuille-Michaud, A., 2011. Crohn disease--associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J. Clin. Invest.* 121, 966–75. doi:10.1172/JCI44632
- Chasteen, T.G., Fuentes, D.E., Tantaleán, J.C., Vásquez, C.C., 2009. Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 820–32. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00177.x
- Cheng, H.-Y., Yang, H.-Y., Chou, C.-C., 2002. Influence of Acid Adaptation on the Tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 to Some Subsequent Stresses. *J. Food Prot.* 6, 260–265.
- Chung, H.J., Bang, W., Drake, M.A., 2006. Comprehensive Stress Response of Reviews *Escherichia coli* in Food Science and Food Safety 5.
- Chung, H.J., Bang, W., Drake, M.A., 2006. Stress Response of *Escherichia coli*. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 5, 52–64. doi:10.1111/j.1541-4337.2006.00002.x
- CNIEL, 2014. L'économie laitière en chiffres.
- Cobbaut, K., Berkvens, D., Houf, K., De Deken, R., De Zutter, L., 2009. *Escherichia coli* O157 prevalence in different cattle farm types and identification of potential risk factors. *J. Food Prot.* 72, 1848–53.
- Cobbold, R.N., Davis, M.A., Rice, D.H., Szymanski, M., Tarr, P.I., Besser, T.E., Hancock, D.D., 2008. Associations between bovine, human, and raw milk, and beef isolates of non-O157 Shiga toxigenic *Escherichia coli* within a restricted geographic area of the United States. *J. Food Prot.* 71, 1023–7.

- Cody, S.H., Glynn, M.K., Farrar, J.A., Cairns, K.L., Griffin, P.M., Kobayashi, J., Fyfe, M., Hoffman, R., King, A.S., Lewis, J.H., Swaminathan, B., Bryant, R.G., Vugia, D.J., 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Ann. Intern. Med.* 130, 202–9.
- Cools, I., Uyttendaele, M., Caro, C., D’Haese, E., Nelis, H.J., Debevere, J., 2003. Survival of *Campylobacter jejuni* strains of different origin in drinking water. *J. Appl. Microbiol.* 94, 886–892. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01916.x
- Coombes, B.K., Wickham, M.E., Mascarenhas, M., Gruenheid, S., Finlay, B.B., Karmali, M.A., 2008a. Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2153–60. doi:10.1128/AEM.02566-07
- Coombes, B.K., Wickham, M.E., Mascarenhas, M., Gruenheid, S., Finlay, B.B., Karmali, M.A., 2008b. Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2153–60. doi:10.1128/AEM.02566-07
- Cortés, C., De la Fuente, R., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Dhabi, G., Mora, A., Justel, P., Contreras, A., Sánchez, A., Corrales, J.C., Orden, J.A., 2005. Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain. *Vet. Microbiol.* 110, 67–76. doi:10.1016/j.vetmic.2005.06.009
- Cowden, J.M., Ahmed, S., Donaghy, M., Riley, A., 2001. Epidemiological investigation of the central Scotland outbreak of *Escherichia coli* O157 infection, November to December 1996. *Epidemiol. Infect.* 126, 335–41.
- Crampin, M., Willshaw, G., Djuretic, T., Hancock, R., Elstob, C., Rouse, A., Cheasty, T., Stuart, J., 1999. Outbreak of *Escherichia coli* O157 Infection Associated with a Music Festival. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 286–288. doi:10.1007/s100960050278
- Croxen, M.A., Finlay, B.B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 26–38. doi:10.1038/nrmicro2265
- Crump et al., 2002. AN OUTBREAK OF *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 INFECTIONS AMONG VISITORS TO A DAIRY FARM. *N. Engl. J. Med.* 347, 555–560.
- Csonka, L.N., 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 53, 121–147.
- D’Amico, D.J., Druart, M.J., 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, 2217–24.
- D’Aoust, J.-Y., Park, C.E., Szabo, R.A., Todd, E.C.D., Emmons, D.B., McKellar, R.C., 1988. Thermal Inactivation of *Campylobacter* Species, *Yersinia enterocolitica*, and Hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Fluid Milk. *J. Dairy Sci.* 71, 3230–3236. doi:10.3168/jds.S0022-0302(88)79928-2
- Darfeuille-Michaud, A., 2002. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn’s disease. *Int. J. Med. Microbiol.* 292, 185–93. doi:10.1078/1438-4221-00201
- De Vuyst, L., Vandamme, E.J., 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J. Gen. Microbiol.* 138, 571–8. doi:10.1099/00221287-138-3-571

- Decludt, B., Bouvet, P., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Grimont, D., Hubert, B., Loirat, C., 2000. Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France. *Epidemiol. Infect.* 124, 215–220.
- Delannoy, S., Beutin, L., Fach, P., 2013a. Towards a molecular definition of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): detection of genes located on O island 57 as markers to distinguish EHEC from closely related enteropathogenic *E. coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1083–8. doi:10.1128/JCM.02864-12
- Delannoy, S., Beutin, L., Fach, P., 2013b. Discrimination of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) from non-EHEC strains based on detection of various combinations of type III effector genes. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3257–62. doi:10.1128/JCM.01471-13
- Delannoy, S., Mariani-Kurkdjian, P., Bonacorsi, S., Liguori, S., Fach, P., 2015. Characteristics of emerging human-pathogenic *Escherichia coli* O26:H11 strains isolated in France between 2010 and 2013 and carrying the *stx2d* gene only. *J. Clin. Microbiol.* 53, 486–92. doi:10.1128/JCM.02290-14
- Delbès-Paus, C., Miszczyscha, S., Ganet, S., Helinck, S., Veisseire, P., Pochet, S., Thévenot, D., Montel, M.-C., 2013. Behavior of *Escherichia coli* O26:H11 in the presence of *Hafnia alvei* in a model cheese ecosystem. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 212–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.019
- Delpech, P., Bornes, S., Alaterre, E., Bonnet, M., Gagne, G., Montel, M.-C., Delbès, C., 2015. *Staphylococcus aureus* transcriptomic response to inhibition by H₂O₂-producing *Lactococcus garvieae*. *Food Microbiol.* 51, 163–70. doi:10.1016/j.fm.2015.05.014
- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T.T., Messens, K., Van Camp, J., 2008. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int. Dairy J.* 18, 436–457. doi:10.1016/j.idairyj.2007.10.014
- Dineen, S.S., Takeuchi, K., Soudah, J.E., Boor, K.J., 1998. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in Dairy Fermentation Systems. *J. Food Prot.* 12, 1602–1608.
- Duffy, G., 2003. Verocytotoxic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *J. Appl. Microbiol.* 94, 94–103. doi:10.1046/j.1365-2672.94.s1.11.x
- Duffy, G., Whiting, R., Sheridan, J., 1999. The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 16, 299–307. doi:10.1006/fmic.1998.0242
- Ebringer, L., Ferencík, M., Krajcovic, J., 2008. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products--review. *Folia Microbiol. (Praha).* 53, 378–94. doi:10.1007/s12223-008-0059-1
- Edelstein, M., Sundborger, C., Hergens, M.-P., Ivarsson, S., Dryselius, R., Insulander, M., Jernberg, C., Hutin, Y., Wallensten, A., 2014. Barriers to Trace-back in a Salad-associated EHEC Outbreak, Sweden, June 2013. *PLoS Curr.* 6. doi:10.1371/currents.outbreaks.80bbab3af3232be0372ea0e904dcd1fe
- EFSA, 2016. Multi-country outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection associated with haemolytic uraemic syndrome European Food Safety Authority.
- EFSA, 2015. Scientific Opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA J.* 13, 3940–4035. doi:10.2903/j.efsa.2015.3940
- EFSA, 2014. Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in

2012. EFSA J. 9, 1–378. doi:10.2903/j.efsa.2014.3547
- EFSA, ECDC, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA J. 13, 4329. doi:10.2903/j.efsa.2015.4329
- el-Ziney, M.G., Debevere, J.M., 1998. The effect of Reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese. J. Food Prot. 61, 1275–80.
- Erwert, R.D., Eiting, K.T., Tupper, J.C., Winn, R.K., Harlan, J.M., Bannerman, D.D., 2003. Shiga toxin induces decreased expression of the anti-apoptotic protein Mcl-1 concomitant with the onset of endothelial apoptosis. Microb. Pathog. 35, 87–93. doi:10.1016/S0882-4010(03)00100-1
- Espié, E., Grimont, F., Pihier, N., Debré, H.R., Pasteur, I., 2008. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurised cows cheese, France, 2005 11, 94415.
- Espié, E., Grimont, F., Vaillant, V., Montet, M.P., Carle, I., Bavai, C., de Valk, H., Vernozzy-Rozand, C., 2006a. O148 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreak: microbiological investigation as a useful complement to epidemiological investigation. Clin. Microbiol. Infect. 12, 992–8. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01468.x
- Espié, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H., Vernozzy-Rozand, C., 2006b. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. Epidemiol. Infect. 134, 143–6. doi:10.1017/S0950268805004887
- Ethelberg, S., Olsen, K.E.P., Scheutz, F., Jensen, C., Schiellerup, P., Enberg, J., Petersen, A.M., Olesen, B., Gerner-Smidt, P., Mølbak, K., 2004. Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. Emerg. Infect. Dis. 10, 842–7. doi:10.3201/eid1005.030576
- Etienne-Mesmin, L., Chassaing, B., Sauvanet, P., Denizot, J., Blanquet-Diot, S., Darfeuille-Michaud, A., Pradel, N., Livrelli, V., 2011. Interactions with M cells and macrophages as key steps in the pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. PLoS One 6, e23594. doi:10.1371/journal.pone.0023594
- 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., Thomas, D.R., 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. doi:10.1023/A:1011072907877
- Fabich, A.J., Jones, S. a, Chowdhury, F.Z., Cernosek, A., Anderson, A., Smalley, D., McHargue, J.W., Hightower, G.A., Smith, J.T., Autieri, S.M., Leatham, M.P., Lins, J.J., Allen, R.L., Laux, D.C., Cohen, P.S., Conway, T., 2008. Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. Infect. Immun. 76, 1143–52. doi:10.1128/IAI.01386-07
- Fach, P., Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., 2001. Comparison between a PCR-ELISA test and the vero cell assay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy products and characterization of virulence traits of the isolated strains. J. Appl. Microbiol. 90, 809–818. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01313.x
- Farrag, S.A., El-Gazzar, F.E., Marth, E.H., 1992. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 or *Yersinia enterocolitica* at 4 or 7°C in raw milk inoculated with a commercial culture of lactic acid bacteria. Milchwissenschaft 47, 149–152.
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condron, R., De Reu, K., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Mischczycha,

- S., Moussiegt, S., Verstraete, K., Cerf, O., 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiol.* 162, 190–212. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008
- Foster, J.W., 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 898–907. doi:10.1038/nrmicro1021
- Franzin, F.M., Sircili, M.P., 2015. Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation. *Biomed Res. Int.* 2015, 534738. doi:10.1155/2015/534738
- Fremaux, B., Raynaud, S., Beutin, L., Rozand, C.V., 2006. Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Vet. Microbiol.* 117, 180–91. doi:10.1016/j.vetmic.2006.04.030
- Fukushima, H., Hoshina, K., Gomyoda, M., 1999. Long-Term Survival of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in Bovine Feces. *Appl. Envir. Microbiol.* 65, 5177–5181.
- Galia, W., Mariani-kurkdjian, P., Loukiadis, E., Blanquet-diot, S., Leriche, F., Brugère, H., 2015. Genome Sequence and Annotation of a Human Infection Isolate of *Escherichia coli* O26 : H11 Involved in a Raw Milk Cheese Outbreak 3, 3–4. doi:10.1128/genomeA.01568-14. Copyright
- Girardeau, J.P., Dalmasso, A., Bertin, Y., Ducrot, C., Bord, S., Livrelli, V., Vernozzy-Rozand, C., Martin, C., 2005. Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43, 6098–107. doi:10.1128/JCM.43.12.6098-6107.2005
- Glass, K.A., Loeffelholz, J.M., Ford, J.P., Doyle, M.P., 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Appl. Envir. Microbiol.* 58, 2513–2516.
- Govaris, A., Koidis, P., Papatheodorou, K., 2002. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in sour milk, cows' milk yogurt and ewes' milk yogurt. *J. Dairy Res.* 69, 655–660. doi:10.1017/S0022029902005824
- Grad, Y.H., Lipsitch, M., Feldgarden, M., Arachchi, H.M., Cerqueira, G.C., Fitzgerald, M., Godfrey, P., Haas, B.J., Murphy, C.I., Russ, C., Sykes, S., Walker, B.J., Wortman, J.R., Young, S., Zeng, Q., Abouelleil, A., Bochicchio, J., Chauvin, S., Desmet, T., Gujja, S., McCowan, C., Montmayeur, A., Steelman, S., Frimodt-Møller, J., Petersen, A.M., Struve, C., Krogfelt, K.A., Bingen, E., Weill, F.-X., Lander, E.S., Nusbaum, C., Birren, B.W., Hung, D.T., Hanage, W.P., 2012. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 3065–70. doi:10.1073/pnas.1121491109
- Griffin, P.M., 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 Mal. Infect.* 17, 6–10. doi:10.1016/S0399-077X(87)80308-6
- Gyles, C.L., 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* 85, E45–62. doi:10.2527/jas.2006-508
- Hancock, D., E. BESSER, T., H. RICE, D., E. HERRIOTT, D., I. TARR, P., 1997. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiol. Infect.* 118, 193–195.

- Harrison, R., 2006. Milk xanthine oxidase: Properties and physiological roles. *Int. Dairy J.* 16, 546–554. doi:10.1016/j.idairyj.2005.08.016
- Hartl, F.U., 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571–9. doi:10.1038/381571a0
- Hengge-Aronis, R., 2002. Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4, 341–6.
- Heuvelink, A.E., van den Biggelaar, F.L.A.M., de Boer, E., Herbes, R.G., Melchers, W.J.G., Huis In 't Veld, J.H.J., Monnens, L.A.H., 1998. Isolation and Characterization of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 Strains from Dutch Cattle and Sheep. *J. Clin. Microbiol.* 36, 878–882.
- Hilborn, E.D., Mshar, P.A., Fiorentino, T.R., Dembek, Z.F., Barrett, T.J., Howard, R.T., Cartter, M.L., 2000. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and haemolytic uraemic syndrome associated with consumption of unpasteurized apple cider. *Epidemiol. Infect.* 124, 31–6.
- Holme, R., 2003. Drinking water contamination in Walkerton, Ontario: Positive resolutions from a tragic event. *Water Sci. Technol.* 47, 1–6.
- Hrudey, S.E., Payment, P., Huck, P.M., Gillham, R.W., 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.
- Hudson, L.M., Chen, J., Hill, A.R., Griffiths, M.W., 1997. Bioluminescence: A Rapid Indicator of *Escherichia coli* O157:H7 in Selected Yogurt and Cheese Varieties. *J. Food Prot.* 60, 891–897.
- Hunter, P.R., Gaston, M. a, 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems : an application of Simpson ' s index of Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems : an Application of Simpson ' s Index of Diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465–2466. doi:0095-1137/88/112465-02\$02.00/0
- Hussein, H.S., 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J. Anim. Sci.* 85, E63–72. doi:10.2527/jas.2006-421
- Hussein, H.S., Sakuma, T., 2004. Invited Review : Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Dairy Cattle and Their Products.
- Iguchi, A., Iyoda, S., Kikuchi, T., Ogura, Y., Katsura, K., Ohnishi, M., Hayashi, T., Thomson, N.R., 2015. A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Res.* 22, 101–7. doi:10.1093/dnares/dsu043
- InVS, 2012. Episode de cas groupés de syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) et de diarrhées sanglantes survenus dans le Sud-Ouest, Juin 2012.
- InVS, 2011. Cas groupés de syndrome hémolytique et urémique dans le Nord-Pas-de-Calais et la Picardie. Situation au 12 juillet 2011.
- INVS, 2007. Epidémie d'infection à *E. coli* producteur de Shiga-toxines non O157 liée à la consommation de camembert au lait cru, Nord-Ouest de la France, Octobre-Décembre 2005.
- Izumiya, H., Pei, Y., Terajima, J., Ohnishi, M., Hayashi, T., Iyoda, S., Watanabe, H., 2010. New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. *Microbiol. Immunol.* 54, 569–77. doi:10.1111/j.1348-0421.2010.00252.x

- Jackson, S.G., Goodbrand, R.B., Johnson, R.P., Odorico, V.G., Alves, D., Rahn, K., Wilson, J.B., Welch, M.K., Khakhria, R., 1998. *Escherichia coli* O157 : H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. *Epidemiol. Infect* 120, 17–20.
- Jandu, N., Ho, N.K.L., Donato, K.A., Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Duffy, S.P., Tailor, C., Sherman, P.M., 2009. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 gene expression profiling in response to growth in the presence of host epithelia. *PLoS One* 4, e4889. doi:10.1371/journal.pone.0004889
- Jarvis, K.G., Kaper, J.B., 1996. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect. Immun.* 64, 4826–4829.
- Johannes, L., Römer, W., 2010. Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 105–16. doi:10.1038/nrmicro2279
- Jordan, K.N., Oxford, L., O'Byrne, C.P., 1999. Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3048–55.
- Jordan, S.L., Glover, J., Malcolm, L., Thomson-Carter, F.M., Booth, I.R., Park, S.F., 1999. Augmentation of Killing of *Escherichia coli* O157 by Combinations of Lactate, Ethanol, and Low-pH Conditions. *Appl. Envir. Microbiol.* 65, 1308–1311.
- Ju, W., Shen, J., Toro, M., Zhao, S., Meng, J., 2013. Distribution of pathogenicity islands OI-122, OI-43/48, and OI-57 and a high-pathogenicity island in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3406–12. doi:10.1128/AEM.03661-12
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–40. doi:10.1038/nrmicro818
- Karch, H., Friedrich, A.W., Gerber, A., Zimmerhackl, L.B., Schmidt, M.A., Bielaszewska, M., 2006. New aspects in the pathogenesis of enteropathic hemolytic uremic syndrome. *Semin. Thromb. Hemost.* 32, 105–12. doi:10.1055/s-2006-939766
- Karmali, M., Petric, M., Steele, B., Lim, C., 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *escherichia coli* in stools. *Lancet* 321, 619–620. doi:10.1016/S0140-6736(83)91795-6
- Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-smith, R., Clark, C., Rahn, K., Kaper, J.B., Isaac-renton, J., 2003. 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 Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocyto. doi:10.1128/JCM.41.11.4930
- Karmali, M.A., Petric, M., Bielaszewska, M., 1999. Evaluation of a Microplate Latex Agglutination Method (Verotox-F Assay) for Detecting and Characterizing Verotoxins (Shiga Toxins) in *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 396–399.
- Keen, J.E., Wittum, T.E., Dunn, J.R., Bono, J.L., Durso, L.M., 2006. O157 in Agricultural Fair Livestock , United States 12.
- Keene, W., McNulty, J., Hoesly, F., Williams, L., Hedberg, K., Oxman, G., Barrett, T., Pfaller, M., Fleming, D., 1994. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N. Engl. J. Med.* 331, 579–584.

- Khine, A.A., Firtel, M., Lingwood, C.A., 1998. CD77-dependent retrograde transport of CD19 to the nuclear membrane: functional relationship between CD77 and CD19 during germinal center B-cell apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 176, 281–92. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199808)176:2<281::AID-JCP6>3.0.CO;2-K
- King, L., Mariani-kurkdjian, P., Gouali, M., Vaillant, V., 2013. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2013 2–5.
- King, L.A., Filliol-Toutain, I., Mariani-Kurkidjian, P., Vaillant, V., Vernozzy-Rozand, C., Ganet, S., Pihier, N., Niaudet, P., de Valk, H., 2010. Family outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O123:H-, France, 2009. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1491–3. doi:10.3201/eid1609.100472
- King, L.A., Mailles, A., Mariani-Kurkdjian, P., Vernozzy-Rozand, C., Montet, M.P., Grimont, F., Pihier, N., Devalk, H., Perret, F., Bingen, E., Espié, E., Vaillant, V., 2009. Community-wide outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with consumption of frozen beef burgers. *Epidemiol. Infect.* 137, 889–96. doi:10.1017/S0950268808001490
- King, L.A., Mariani-kurkidjan, P., Gouali, M., 2012. Encadré – Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France / Box – Surveillance of hemolytic uremic syndrome in children under 15 years in France. *Bull. Epidemiol. Hebd. hors série* 14.
- King, T., Lucchini, S., Hinton, J.C.D., Gobius, K., 2010. Transcriptomic analysis of *Escherichia coli* O157:H7 and K-12 cultures exposed to inorganic and organic acids in stationary phase reveals acidulant- and strain-specific acid tolerance responses. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6514–6528. doi:10.1128/AEM.02392-09
- Klapproth, J.-M.A., Scaletsky, I.C.A., McNamara, B.P., Lai, L.-C., Malstrom, C., James, S.P., Donnenberg, M.S., 2000. A Large Toxin from Pathogenic *Escherichia coli* Strains That Inhibits Lymphocyte Activation. *Infect. Immun.* 68, 2148.
- Kolling, G.L., Matthews, K.R., 1999. Export of Virulence Genes and Shiga Toxin by Membrane Vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1843–1848.
- Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., Drosinos, E.H., 2010. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control* 21, 805–815. doi:10.1016/j.foodcont.2009.11.015
- Kovacs, M.J., Roddy, J., Grégoire, S., Cameron, W., Eidus, L., Drouin, J., 1990. Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *Am. J. Med.* 88, 177–9.
- Krause, U., Thomson-Carter, F., Pennington, T., 1996. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed-field gel electrophoresis and comparison with that by bacteriophage typing. *J. Clin. Microbiol.* 34, 959–961.
- Kudva, I., Hatfield, P., Hovde, C., 1997. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *J. Clin. Microbiol.* 35, 892–899.
- Kudva, I., Hatfield, P., Hovde, C., 1996. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *J. Clin. Microbiol.* 34, 431–433.
- La Ragione, R.M., Best, A., Woodward, M.J., Wales, A.D., 2009. *Escherichia coli* O157:H7 colonization in small domestic ruminants. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 394–410. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00138.x

- Labas, M.D., Zalazar, C.S., Brandi, R.J., Cassano, A.E., 2008. Reaction kinetics of bacteria disinfection employing hydrogen peroxide. *Biochem. Eng. J.* 38, 78–87. doi:10.1016/j.bej.2007.06.008
- Large, T.M., Walk, S.T., Whittam, T.S., 2005. Variation in Acid Resistance among Shiga Toxin-Producing Clones of Pathogenic *Escherichia coli* Variation in Acid Resistance among Shiga Toxin-Producing Clones of Pathogenic *Escherichia coli* † 71. doi:10.1128/AEM.71.5.2493
- Leistner, L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 181–186. doi:10.1016/S0168-1605(00)00161-6
- LeJeune, J.T., Wetzel, A.N., 2007. Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle. *J. Anim. Sci.* 85, E73–80. doi:10.2527/jas.2006-612
- Levine, M.M., 1987. *Escherichia coli* that Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155, 377–389. doi:10.1093/infdis/155.3.377
- Leyer, G.J., Wang, L.L., Johnson, E. a, 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3752–5.
- Liebana, E., Smith, R.P., Batchelor, M., McLaren, I., Cassar, C., Clifton-Hadley, F.A., Paiba, G.A., 2005. Persistence of *Escherichia coli* O157 isolates on bovine farms in England and Wales. *J. Clin. Microbiol.* 43, 898–902. doi:10.1128/JCM.43.2.898-902.2005
- Lin, J., Smith, M., Chapin, K., Baik, H., Bennett, G., Foster, J., 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Envir. Microbiol.* 62, 3094–3100.
- Lindblad, M., Lindqvist, R., 2010. Modelling time to growth of *Escherichia coli* as a function of water activity and undissociated lactic acid. *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 308–13. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02793.x
- Lis, H., Sharon, N., 1998. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.* 98, 637–674. doi:10.1021/cr940413g
- Loirat, C., Baudouin, V., Sonsino, E., Mariani-Kurkdjian, P., Elion, J., 1992. Syndrome hémolytique et urémique de l'enfant: aspects cliniques, étiologiques, éléments du pronostic et résultats thérapeutiques. *Actual. néphrologiques Jean Hamburg.* 133–158.
- Loś, J.M., Loś, M., Węgrzyn, A., Węgrzyn, G., 2012a. Altruism of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: recent hypothesis versus experimental results. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 166. doi:10.3389/fcimb.2012.00166
- Loś, J.M., Loś, M., Węgrzyn, A., Węgrzyn, G., 2012b. Altruism of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: recent hypothesis versus experimental results. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 166. doi:10.3389/fcimb.2012.00166
- Loukiadis, E., Callon, H., Mazuy-Cruchaudet, C., Vallet, V., Bidaud, C., Ferré, F., Giuliani, L., Bouteiller, L., Pihier, N., Danan, C., 2012. Surveillance des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) dans les denrées alimentaires en France (2005-2011). *Bull. épidémiologique ANSES* 55.
- Low, J.C., McKendrick, I.J., McKechnie, C., Fenlon, D., Naylor, S.W., Currie, C., Smith, D.G.E., Allison, L., Gally, D.L., 2005. Rectal carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in slaughtered cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 93–7. doi:10.1128/AEM.71.1.93-97.2005
- Ludwig, K., Muller-wicfel, D.E., 1998. Nephrology Dialysis Transplantation Pathomechanisms in the

haemolytic-uraemic syndrome 23–27.

- Lynch, M.J., Fox, E.M., O'Connor, L., Jordan, K., Murphy, M., 2012. Surveillance of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in Irish bovine dairy herds. *Zoonoses Public Health* 59, 264–71. doi:10.1111/j.1863-2378.2011.01443.x
- Mackey, B.M., Seymour, D.A., 1987. The Effect of Catalase on Recovery of Heat-injured DNA-repair Mutants of *Escherichia coli*. *Microbiology* 133, 1601–1610. doi:10.1099/00221287-133-6-1601
- Mahaut, M., Jeantet, R., Brulé, G., 2000. Introduction to cheesemaking technology.
- Maher, M.M., Jordan, K.N., Upton, M.E., Coffey, A., 2001. Growth and survival of *E. coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. *J. Appl. Microbiol.* 90, 201–207. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01232.x
- Makino, K., Ishii, K., Yasunaga, T., Hattori, M., Yokoyama, K., Yutsudo, C.H., Kubota, Y., Yamaichi, Y., Iida, T., Yamamoto, K., Honda, T., Han, C.G., Ohtsubo, E., Kasamatsu, M., Hayashi, T., Kuhara, S., Shinagawa, H., 1998. Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. *DNA Res.* 5, 1–9.
- Mangeney, M., Lingwood, C.A., Taga, S., Caillou, B., Tursz, T., Wiels, J., 1993. Apoptosis Induced in Burkitt's Lymphoma Cells via Gb3/CD77, a Glycolipid Antigen. *Cancer Res.* 53, 5314–5319.
- Mariani-Kurkdjian, P., Bingen, É., 2012. Physiopathologie et virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines. *Réanimation* 21, 268–279. doi:10.1007/s13546-012-0481-x
- Martin, H.M., Hancock, J.T., Salisbury, V., Harrison, R., 2004. Role of Xanthine Oxidoreductase as an Antimicrobial Agent MINIREVIEW Role of Xanthine Oxidoreductase as an Antimicrobial Agent 72. doi:10.1128/IAI.72.9.4933
- Masoud, W., Vogensen, F.K., Lillevang, S., Abu Al-Soud, W., Sørensen, S.J., Jakobsen, M., 2012. The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 192–202. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.014
- Mather, I.H., 2000. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *J. Dairy Sci.* 83, 203–47. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74870-3
- Matthews, K.R., Murdough, P.A., Bramley, A.J., 1997. Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157: H7. *J. Appl. Microbiol.* 82, 197–203. doi:10.1111/j.1365-2672.1997.tb03573.x
- McIntyre, L., Fung, J., Paccagnella, A., Isaac-Renton, J., Rockwell, F., Emerson, B., Preston, T., 2002. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with the ingestion of unpasteurized goat's milk in British Columbia, 2001. *Canada Commun. Dis. Rep. = Relev. des Mal. Transm. au Canada* 28, 6–8.
- Mechie, S., Chapman, P., Siddons, C., 1997. A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. *Epidemiol. Infect.* 118, 17–25.
- Michalski, M.-C., Gassi, J.-Y., Famelart, M.-H., Leconte, N., Camier, B., Michel, F., Briard, V., 2003. The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties of Camembert cheese. *Lait* 83, 131–143. doi:10.1051/lait:2003003

- Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A., 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, 787–96.
- Mills, S., Ross, R.P., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., 2011. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int. Dairy J.* 21, 377–401. doi:10.1016/j.idairyj.2010.12.011
- Miszczucha, S.D., Perrin, F., Ganet, S., Jamet, E., Tenenhaus-aziza, F., Thevenot-sergentet, D., Montel, M., 2013. Behavior of Different Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes in Various Experimentally Contaminated Raw-Milk Cheeses. doi:10.1128/AEM.02192-12
- Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmaures, N., Berthier, F., 2014. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int. J. Food Microbiol.* 177, 136–54. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019
- Montet, M., 2009. Contamination des aliments par les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) en France , et importance de l ' acido-résistance des souches 1–72.
- Moschcowit, E., 1925. AN ACUTE FEBRILE PLEIOCHROMIC ANEMIA WITH HYALINE THROMBOSIS OF THE TERMINAL ARTERIOLES AND CAPILLARIES. *Arch. Intern. Med.* 36, 89. doi:10.1001/archinte.1925.00120130092009
- Murdock, C.A., Cleveland, J., Matthews, K.R., 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, 255–61. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02076.x
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.
- Naylor, S.W., Low, J.C., Besser, T.E., Mahajan, A., Gunn, G.J., Pearce, M.C., McKendrick, I.J., Smith, D.G.E., Gally, D.L., 2003. Lymphoid Follicle-Dense Mucosa at the Terminal Rectum Is the Principal Site of Colonization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the Bovine Host. *Infect. Immun.* 71, 1505–1512. doi:10.1128/IAI.71.3.1505-1512.2003
- Nicholls, L., Grant, T.H., Robins-Browne, R.M., 2000. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 35, 275–88.
- O'Brien, A., Tesh, V., Donohue-Rolfe, A., Jackson, M., Olsnes, S., Sandvig, K., Lindberg, A., Keusch, G., 1992. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis., *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-77238-2
- O'Brien, S.J., Adak, G.K., Gilham, C., 2001. Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 1049–51. doi:10.3201/eid0706.010626
- Ochman, H., Selander, R.K., 1984. Evidence for clonal population structure in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 198–201. doi:10.1073/pnas.81.1.198
- Ofek, I., Hasty, D.L., Sharon, N., 2003. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38, 181–191. doi:10.1016/S0928-8244(03)00228-1

- Ogden, I.D., Hepburn, N.F., MacRae, M., Strachan, N.J.C., Fenlon, D.R., Rusbridge, S.M., 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. doi:10.1046/j.1472-765x.2002.01052.x
- Ogura, Y., Ooka, T., Iguchi, a., Toh, H., Asadulghani, M., Oshima, K., Kodama, T., Abe, H., Nakayama, K., Kurokawa, K., Tobe, T., Hattori, M., Hayashi, T., 2009. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 17939–17944. doi:10.1073/pnas.0903585106
- Ogura, Y., Ooka, T., Terajima, J., Nougayrède, J.-P., Kurokawa, K., Tashiro, K., Tobe, T., Nakayama, K., Kuhara, S., Oswald, E., Watanabe, H., Hayashi, T., 2007. Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. *Genome Biol.* 8, R138. doi:10.1186/gb-2007-8-7-r138
- Orden, J.A., Cortés, C., Horcajo, P., De la Fuente, R., Blanco, J.E., Mora, A., López, C., Blanco, J., Contreras, A., Sánchez, A., Corrales, J.C., Domínguez-Bernal, G., 2008. A longitudinal study of verotoxin-producing *Escherichia coli* in two dairy goat herds. *Vet. Microbiol.* 132, 428–34. doi:10.1016/j.vetmic.2008.05.021
- Orden, J.A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Cid, D., GONZÁLEZ, E.A., BLANCO, J., DE LA FUENTE, R., 2003. Prevalence and characterization of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic and healthy sheep and goats. *Epidemiol. Infect.* 130, 313–321. doi:10.1017/S0950268802008154
- Orr, P., Lorencz, B., Brown, R., Kielly, R., Tan, B., Holton, D., CLUGSTONE, H., LUGTIG, L., PIM, C., MACDONALD, S., HAMMOND, G., MOFFATT, M., SPIKA, J., MANUEL, D., WINTHER, W., MILLEY, D., LIOR, H., SINUFF, N., 1994. An outbreak of diarrhea due to verotoxin-producing *Escherichia coli* in the Canadian Northwest Territories. *Scand. J. Infect. Dis.* 26, 675–684.
- Ostroff, S.M., Tarr, P.I., Neill, M.A., Lewis, J.H., Hargrett-Bean, N., Kobayashi, J.M., 1989. Toxin Genotypes and Plasmid Profiles as Determinants of Systemic Sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 Infections. *J. Infect. Dis.* 160, 994–998. doi:10.1093/infdis/160.6.994
- Pacheco, A.R., Curtis, M.M., Ritchie, J.M., Munera, D., Waldor, M.K., Moreira, C.G., Sperandio, V., 2012. Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. *Nature* 492, 113–7. doi:10.1038/nature11623
- Pallen, M.J., Beatson, S.A., Bailey, C.M., 2005. Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perspective. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 201–29. doi:10.1016/j.femsre.2005.01.001
- Paton, A., Ratcliff, R., Doyle, R., Seymour-Murray, J., Davos, D., Lanser, J., Paton, J., 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., Matthew, C., Paton, J.C., Woodrow, M.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 Characterization of Saa , a Novel Autoagglutinating Adhesin Produced by L. doi:10.1128/IAI.69.11.6999
- Payne, C.J.I., Petrovic, M., Roberts, R.J., Paul, A., Linnane, E., Walker, M., Kirby, D., Burgess, A., Smith, R.M.M., Cheasty, T., Willshaw, G., Salmon, R.L., 2003. Vero Cytotoxin–Producing *Escherichia coli*

- O157 Gastroenteritis in Farm Visitors, North Wales. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 526–530. doi:10.3201/eid0905.020237
- Pearce, M.C., Jenkins, C., Vali, L., Smith, A.W., Knight, H.I., Cheasty, T., Smith, H.R., Gunn, G.J., Woolhouse, M.E.J., Amyes, S.G.B., Frankel, G., 2004. Temporal Shedding Patterns and Virulence Factors of *Escherichia coli* Serogroups O26, O103, O111, O145, and O157 in a Cohort of Beef Calves and Their Dams. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1708–1716. doi:10.1128/AEM.70.3.1708-1716.2004
- Peng, S., Tasara, T., Hummerjohann, J., 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, 849–64. doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-469
- Perna, N.T., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Pósfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamouisis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A., Blattner, F.R., 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409, 529–33. doi:10.1038/35054089
- Phillips, A.D., Frankel, G., 2000. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J. Infect. Dis.* 181, 1496–500. doi:10.1086/315404
- Pirofski, L., Casadevall, A., 2015. What is infectiveness and how is it involved in infection and immunity? *BMC Immunol.* 16, 13. doi:10.1186/s12865-015-0076-1
- Pomposiello, P.J., Demple, B., 2001. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol.* 19, 109–114. doi:10.1016/S0167-7799(00)01542-0
- Poppe, C., Ayroud, M., Ollis, G., Chirino-Trejo, M., Smart, N., Quessy, S., Michel, P., 2001. Trends in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from animals, foods of animal origin, and the environment of animal production in Canada, 1994-1997. *Microb. Drug Resist.* 7, 197–212. doi:10.1089/10766290152045084
- Pradel, N., Bertin, Y., Martin, C., Livrelli, V., 2008. Molecular analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2118–28. doi:10.1128/AEM.02688-07
- Pradel, N., Livrelli, V., Champs, C. De, Palcoux, J., Reynaud, A., Scheutz, F., Sirot, J., Joly, B., Forestier, C., Livrelli, R.I.E., Champs, C.D.E., 2000. Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle , Food , and Children during a One-Year Prospective Study in France Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Catt.
- Priest, F.G., 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, 828–33. doi:10.1099/ijls.0.013458-0
- Putonti, C., Luo, Y., Katili, C., Chumakov, S., Fox, G.E., Graur, D., Fofanov, Y., 2006. A computational tool for the genomic identification of regions of unusual compositional properties and its utilization in the detection of horizontally transferred sequences. *Mol. Biol. Evol.* 23, 1863–8.

- Rahn, K., Renwick, S., Johnson, R., Wilson, J., Clarke, R., Alves, D., S. McEWEN, H. LIOR, J. SPIKA, 1997. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. *Epidemiol. Infect.* 119, 251–259.
- Ramsaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A., Griffiths, M.W., 1998. Survival of Bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Soft Cheeses. *J. Dairy Sci.* 81, 1810–1817. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75750-9
- Reid, S.D., Selander, R.K., Whittam, T.S., 1999. Sequence Diversity of Flagellin (fliC) Alleles in Pathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 153–160.
- Reida, P., Wolff, M., Pöhls, H.W., Kuhlmann, W., Lehmacher, A., Aleksić, S., Karch, H., 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. Bakteriologie* 281, 534–43.
- Reitsma, C.J., Henning, D.R., 1996. Survival of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 During the Manufacture and Curing of Cheddar Cheese. *J. Food Prot.* 59, 460–464.
- Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautam, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., Barrett, T.J., 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 59–67. doi:10.1089/fpd.2006.3.59
- 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., Blake, P.A., Cohen, M.L., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308, 681–5. doi:10.1056/NEJM198303243081203
- Rios, M., Prado, V., Trucksis, M., Arellano, C., Borie, C., Alexandre, M., Fica, A., Levine, M.M., 1999. Clonal Diversity of Chilean Isolates of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* from Patients with Hemolytic-Uremic Syndrome, Asymptomatic Subjects, Animal Reservoirs, and Food Products. *J. Clin. Microbiol.* 37, 778–781.
- Ritchie, J.M., Waldor, M.K., 2005. The locus of enterocyte effacement-encoded effector proteins all promote enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity in infant rabbits. *Infect. Immun.* 73, 1466–74. doi:10.1128/IAI.73.3.1466-1474.2005
- Roe, A.J., McLaggan, D., Davidson, I., O’Byrne, C., Booth, I.R., 1998. Perturbation of Anion Balance during Inhibition of Growth of *Escherichia coli* by Weak Acids. *J. Bacteriol.* 180, 767–772.
- Roering, A., Luchansky, J., Ihnot, A., Ansay, S., Kaspard, C., Ingham, S., 1999. Comparative survival of *Salmonella typhimurium* DT 104, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in preservative-free apple cider and simulated gastric fluid. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 263–269. doi:10.1016/S0168-1605(98)00198-6
- Ryan, C.A., Tauxe, R. V., Hoses, G.W., Wells, J.G., Stoesz, P.A., McFadden, H.W., Smith, P.W., Wright, G.F., Blake, P.A., 1986. *Escherichia coli* O157:H7 Diarrhea in a Nursing Home: Clinical, Epidemiological, and Pathological Findings. *J. Infect. Dis.* 154, 631–638. doi:10.1093/infdis/154.4.631
- Sacristán, S., García-Arenal, F., 2008. The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Mol. Plant Pathol.* 9, 369–84. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00460.x

- Salehi, T.Z., Tonelli, A., Mazza, A., Staji, H., Badagliacca, P., Tamai, I.A., Jamshidi, R., Harel, J., Lelli, R., Masson, L., 2012. Genetic characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from the one-humped camel (*Camelus dromedarius*) by using microarray DNA technology. *Mol. Biotechnol.* 51, 283–8. doi:10.1007/s12033-011-9466-7
- Scheut, F., Teel, L.D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N.A., Melton-Celsa, A.R., Sanchez, M., Persson, S., O'Brien, A.D., 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2951–63. doi:10.1128/JCM.00860-12
- Schlesser, J.E., Gerdes, R., Ravishankar, S., Madsen, K., Mowbray, J., 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.
- Schüller, S., 2011. Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium. *Toxins (Basel)*. 3, 626–39. doi:10.3390/toxins3060626
- Scott, L., McGee, P., Sheridan, J.J., Earley, B., Leonard, N., 2006. A comparison of the survival in feces and water of *Escherichia coli* O157:H7 grown under laboratory conditions or obtained from cattle feces. *J. Food Prot.* 69, 6–11.
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C., Abe, A., 2001. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11638–43. doi:10.1073/pnas.191378598
- Sekse, C., O'Sullivan, K., Granum, P.E., Rørvik, L.M., Wasteson, Y., Jørgensen, H.J., 2009. An outbreak of *Escherichia coli* O103:H25 - bacteriological investigations and genotyping of isolates from food. *Int. J. Food Microbiol.* 133, 259–64. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.026
- Shaner, G., Stromberg, E.L., Lacy, G.H., Barker, K.R., Pirone, T.P., 1992. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30, 47–66. doi:10.1146/annurev.py.30.090192.000403
- Shen, S., Mascarenhas, M., Morgan, R., Rahn, K., Karmali, M.A., 2005. Identification of Four Fimbria-Encoding Genomic Islands That Are Highly Specific for Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Serotype O157 Strains. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3840–3850. doi:10.1128/JCM.43.8.3840-3850.2005
- Silvestro, L., Caputo, M., Blancato, S., Decastelli, L., Fioravanti, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Caprioli, A., 2004. Asymptomatic carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in farm workers in Northern Italy. *Epidemiol. Infect.* 132, 915–9.
- Söderström, A., Lindberg, A., Andersson, Y., 2005. EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August-September 2005. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* 10, E050922.1.
- Solecki, O., MacRae, M., Strachan, N., Lindstedt, B.-A., Ogden, I., 2009. *E. coli* O157 from sheep in northeast Scotland: prevalence, concentration shed, and molecular characterization by multilocus variable tandem repeat analysis. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 849–54. doi:10.1089/fpd.2008.0216
- Spano, G., Goffredo, E., Beneduce, L., Tarantino, D., Dupuy, A., Massa, S., 2003. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of Mozzarella cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 73–6.

- Spears, K.J., Roe, A.J., Gally, D.L., 2006. A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 255, 187–202. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00119.x
- Sperandio, V., Kaper, J.B., Bortolini, M.R., Cruz Neves, B., Keller, R., Trabulsi, L.R., 1998. Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. *FEMS Microbiol. Lett.* 164, 133–139. doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb13078.x
- Stephan, R., 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.
- Stevens, M.P., Frankel, G.M., 2014. The Locus of Enterocyte Effacement and Associated Virulence Factors of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* 2, EHEC-0007–2013. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0007-2013
- Stevens, M.P., Roe, A.J., Vlisidou, I., van Diemen, P.M., La Ragione, R.M., Best, A., Woodward, M.J., Gally, D.L., Wallis, T.S., 2004. Mutation of *tox*B and a Truncated Version of the *efa-1* Gene in *Escherichia coli* O157:H7 Influences the Expression and Secretion of Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Proteins but not Intestinal Colonization in Calves or Sheep. *Infect. Immun.* 72, 5402–5411. doi:10.1128/IAI.72.9.5402-5411.2004
- Stevenson, J., Hanson, S., 1996. Outbreak of *Escherichia coli* O157 phage type 2 infection associated with eating precooked meats. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* 6, R116–8.
- Steyert, S.R., Kaper, J.B., 2012. Contribution of Urease to Colonization by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 80, 2589–2600. doi:10.1128/IAI.00210-12
- Strockbine, N.A., Marques, L.R., Newland, J.W., Smith, H.W., Holmes, R.K., O'Brien, A.D., 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect. Immun.* 53, 135–140.
- Swerdlow, D.L., Griffin, P.M., 1997. Duration of faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 among children in day-care centres. *Lancet (London, England)* 349, 745–6. doi:10.1016/S0140-6736(05)60196-1
- Taga, S., Carlier, K., Mishal, Z., Capoulade, C., Mangeney, M., Lécluse, Y., Coulaud, D., Tétaud, C., Pritchard, L.L., Tursz, T., Wiels, J., 1997. Intracellular signaling events in CD77-mediated apoptosis of Burkitt's lymphoma cells. *Blood* 90, 2757–67.
- Tarr, P.I., Bilge, S.S., Vary, J.C., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Ward, T.R., Baylor, M.R., Besser, T.E., 2000. *Iha*: a Novel *Escherichia coli* O157:H7 Adherence-Confering Molecule Encoded on a Recently Acquired Chromosomal Island of Conserved Structure. *Infect. Immun.* 68, 1400–1407. doi:10.1128/IAI.68.3.1400-1407.2000
- Tarr, P.I., Fouser, L.S., Stapleton, A.E., Wilson, R.A., Kim, H.H., Vary, J.C., Clausen, C.R., 1996. Hemolytic-Uremic Syndrome in a Six-Year-Old Girl after a Urinary Tract Infection with Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* O103:H2 — NEJM [WWW Document]. *N. Engl. J. Med.* URL <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199608293350905> (accessed 9.24.15).
- Tarr, P.I., Gordon, C.A., Chandler, W.L., 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet (London, England)* 365, 1073–86. doi:10.1016/S0140-6736(05)71144-2

- Tatsuno, I., Horie, M., Abe, H., Miki, T., Makino, K., Shinagawa, H., Taguchi, H., Kamiya, S., Hayashi, T., Sasakawa, C., 2001. *tox*B Gene on pO157 of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Is Required for Full Epithelial Cell Adherence Phenotype. *Infect. Immun.* 69, 6660–6669. doi:10.1128/IAI.69.11.6660-6669.2001
- Tewarie, P., van Dellen, E., Hillebrand, A., Stam, C.J., 2015. The minimum spanning tree: An unbiased method for brain network analysis. *Neuroimage* 104, 177–188. doi:10.1016/j.neuroimage.2014.10.015
- Thévenot, D., Delignette-Muller, M.L., Christieans, S., Vernozy-Rozand, C., 2005. Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 189–200. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.006
- Thomas, J.G., Baneyx, F., 1998. Roles of the *Escherichia coli* Small Heat Shock Proteins IbpA and IbpB in Thermal Stress Management: Comparison with ClpA, ClpB, and HtpG In Vivo. *J. Bacteriol.* 180, 5165–5172.
- Thomas, S.R., Elkinton, J.S., 2004. Pathogenicity and virulence. *J. Invertebr. Pathol.* 85, 146–51. doi:10.1016/j.jip.2004.01.006
- Thorbecke, G., Amin, A., Tsiagbe, V., 1994. Biology of germinal centers in lymphoid tissue. *FASEB J* 8, 832–840.
- Tilden, J., Young, W., McNamara, A.M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M.A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S.B., Hollingsworth, J., Morris, J.G., 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am. J. Public Health* 86, 1142–5.
- Tobe, T., Beatson, S.A., Taniguchi, H., Abe, H., Bailey, C.M., Fivian, A., Younis, R., Matthews, S., Marches, O., Frankel, G., Hayashi, T., Pallen, M.J., 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, 14941–6. doi:10.1073/pnas.0604891103
- Toma, C., Higa, N., Iyoda, S., Rivas, M., Iwanaga, M., 2006. The long polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are present in other diarrheagenic *E. coli* and in the standard *E. coli* collection of reference (ECOR) strains. *Res. Microbiol.* 157, 153–61. doi:10.1016/j.resmic.2005.06.009
- Torres, A.G., Zhou, X., Kaper, J.B., 2005. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect. Immun.* 73, 18–29. doi:10.1128/IAI.73.1.18-29.2005
- Touati, D., 1988. Transcriptional and posttranscriptional regulation of manganese superoxide dismutase biosynthesis in *Escherichia coli*, studied with operon and protein fusions. *J. Bacteriol.* 170, 2511–2520.
- Tzipori, S., Gunzer, F., Donnenberg, M.S., Montigny, L. de, Kaper, J.B., Donohue-Rolfe, A., 1995. The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infect. Immun.* 63, 3621–3627.
- Upton, P., Coia, J.E., 1994. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply. *Lancet* (London, England) 344, 1015.
- Van Donkersgoed, J., Berg, J., Potter, A., Hancock, D., Besser, T., Rice, D., LeJeune, J., Klashinsky, S., 2001. Environmental sources and transmission of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle. *Can. Vet. journal. La Rev. vétérinaire Can.* 42, 714–20.

- Variabilité des caractéristiques des fromages saint-nectaire fermiers : relations avec la composition du lait et les conditions de production - document [WWW Document], n.d.
- Vernozy-Rozand, C., Mazuy-Cruchaudet, C., Bavai, C., Montet, M.P., Bonin, V., Dernburg, A., Richard, Y., 2005. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 83–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.005
- Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., 2001. *Escherichia coli* O157:H7 - 2e éd. [WWW Document]. Libr. Lavoisier, TEC DOC. URL <http://www.lavoisier.fr/livre/agro-alimentaire/escherichia-coli-o157-h7-2e-ed/vernozy-rozand/descriptif-9782743007515> (accessed 2.15.16).
- Verstraete, K., DE Reu, K., VAN Weyenberg, S., Piérard, D., DE Zutter, L., Herman, L., Robyn, J., Heyndrickx, M., 2013. Genetic characteristics of Shiga toxin-producing *E. coli* O157, O26, O103, O111 and O145 isolates from humans, food, and cattle in Belgium. *Epidemiol. Infect.* 141, 2503–15. doi:10.1017/S0950268813000307
- Wagner, P.L., Neely, M.N., Zhang, X., Acheson, D.W.K., Waldor, M.K., Friedman, D.I., 2001. Role for a Phage Promoter in Shiga Toxin 2 Expression from a Pathogenic *Escherichia coli* Strain 183, 2081–2085. doi:10.1128/JB.183.6.2081
- Waldor, M.K., Friedman, D.I., 2005. Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 459–65. doi:10.1016/j.mib.2005.06.001
- Wang, L., Rothmund, D., Curd, H., Reeves, P.R., 2003. Species-Wide Variation in the *Escherichia coli* Flagellin (H-Antigen) Gene. *J. Bacteriol.* 185, 2936–2943. doi:10.1128/JB.185.9.2936-2943.2003
- Wassenaar, T.M., Gaastra, W., 2001. Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol. Lett.* 201, 1–7. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10724.x
- Watahiki, M., Isobe, J., Kimata, K., Shima, T., Kanatani, J., Shimizu, M., Nagata, A., Kawakami, K., Yamada, M., Izumiya, H., Iyoda, S., Morita-Ishihara, T., Mitobe, J., Terajima, J., Ohnishi, M., Sata, T., 2014. Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 and O157 strains isolated from outbreak patients in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 52, 2757–63. doi:10.1128/JCM.00420-14
- Wertz, J.E., Riley, M.A., 2004. Chimeric nature of two plasmids of *Hafnia alvei* encoding the bacteriocins alveicins A and B. *J. Bacteriol.* 186, 1598–605.
- Widiasih, D.A., IdoDO, N., Omoe, K., Sugii, S., Shinagawa, K., 2004. Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from naturally infected cattle. *Epidemiol. Infect.* 132, 67–75. doi:10.1017/S0950268803001468
- Wieler, L.H., McDaniel, T.K., Whittam, T.S., Kaper, J.B., 2006. Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 156, 49–53. doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb12704.x
- Wolf, M.K., 1997. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 569–84.
- Wood, J.M., 1999. Osmosensing by Bacteria: Signals and Membrane-Based Sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 230–262.
- Yokoyama, K., Horii, T., Yamashino, T., Hashikawa, S., Barua, S., Hasegawa, T., Watanabe, H., Ohta, M., 2000. Production of Shiga toxin by *Escherichia coli* measured with reference to the

membrane vesicle-associated toxins. FEMS Microbiol. Lett. 192, 139–144. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09372.x

Zahraei Salehi, T., Askari Badouei, M., Mehdizadeh Gohari, I., 2010. Molecular detection and antibacterial susceptibility of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from healthy and diarrhoeic dogs. Comp. Clin. Path. 20, 585–589. doi:10.1007/s00580-010-1037-y

Zhao, B., Houry, W.A., 2010. `SE REVIEW / SYNTHE Acid stress response in enteropathogenic gammaproteobacteria : an aptitude for survival 1 314, 301–314. doi:10.1139/O09-182

Zhou, K., Zhou, L., Lim, Q. 'En, Zou, R., Stephanopoulos, G., Too, H.-P., 2011. Novel reference genes for quantifying transcriptional responses of *Escherichia coli* to protein overexpression by quantitative PCR. BMC Mol. Biol. 12, 18. doi:10.1186/1471-2199-12-18

Zschöck, M., Hamann, H.P., Kloppert, B., Wolter, W., 2000. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. Lett. Appl. Microbiol. 31, 203–8.