

# Occurrence et détection des STEC et des phages Stx dans l'alimentation

---

## **I. Contaminations alimentaires et environnementales par les STEC et les phages Stx**

### I.1. Les STEC et les AEEC dans les produits laitiers

#### *I.1.1. Occurrence des STEC dans les produits laitiers*

Plusieurs études ont été menées pour déterminer l'occurrence des STEC dans le lait cru. Que ce soit en Afrique, en Amérique, en Asie ou en Europe, toutes ces études montrent que cette occurrence de STEC est comprise entre 0 et 2% pour tous les échantillons analysés (Farrokh *et al.*, 2012). En France, Madic *et al.* ont montré que sur 205 échantillons de lait cru, 21% étaient positifs pour les gènes *stx1* et/ou *stx2* (Madic *et al.*, 2009) et 4,8% de ces échantillons étaient susceptibles de contenir des STEC appartenant aux cinq sérotypes majeurs (Perelle *et al.*, 2007).

Des études ont aussi évalué l'occurrence de STEC dans les fromages au lait cru dans plusieurs pays du monde. Ces études révèlent la présence de STEC mais certaines d'entre elles présentent des limites dues au faible nombre d'échantillons (Farrokh *et al.*, 2012). Des études françaises menées sur des échantillons de fromages au lait cru ont montré que 27,7% (n = 112) (Auvray *et al.*, 2009) et 29,8% (n= 400) (Madic *et al.*, 2011) des échantillons sont positifs pour le gène *stx*. L'étude de Madic *et al.* a aussi montré que 1,8% des échantillons contiennent des STEC du sérotype O26:H11 (Madic *et al.*, 2011). Une récente étude italienne, sur l'occurrence de STEC O157 et O26, a été réalisée sur 255 échantillons de lait et 225 échantillons de filtres à lait (Trevisani *et al.*, 2014). Les résultats ont révélé que 12,5% des échantillons de lait et 30,2% des filtres sont *stx*-positifs. Parmi ces échantillons *stx*-positifs, 2,4% des échantillons de lait et 2,2% des filtres sont positifs pour le gène du sérotype O26 (Trevisani *et al.*, 2014).

Une étude a évalué expérimentalement la croissance et la survie des STEC de différents sérotypes (O157:H7, O26:H11, O103:H2 et O145:H28) au cours de la fabrication et de l'affinage de fromages au lait cru tels que des fromages à pâte persillée (bleus), des fromages à pâte pressée non-cuite à affinage long ou court, des fromages à pâte cuite et des fromages frais (Miszczycha *et al.*, 2012). Il a été mis en évidence que la population de STEC était passée de 2 à 3 log<sub>10</sub> UFC/g (unités formant colonie par gramme) dans le fromage de

type bleu et les fromages à pâte non-cuite durant les 24 premières heures de fabrication. Néanmoins, la population de STEC diminuait après six mois d'affinage. D'autre part, dans les fromages à pâte cuite et les fromages frais avec une longue étape de coagulation acide ( $\text{pH} < 4,5$ ), aucune croissance des STEC n'a pu être mise en évidence et leur niveau diminuait au cours de la fabrication même s'ils restaient détectable cependant en fin d'affinage. Le sérotype semblait avoir son importance puisque le nombre de bactérie O157:H7 a peu augmenté. De plus les STEC O157:H7 étaient moins persistants que les autres sérotypes (Miszczycha *et al.*, 2012).

### *I.1.2. Présence de STEC et d'AEEC dans les aliments*

Des études ont mis en évidence la présence (séparée) de STEC et d'AEEC dans des échantillons alimentaires. Madic *et al.* ont montré que sur 400 échantillons de fromage au lait cru, sept d'entre eux contenaient des STEC et trois des AEEC (Madic *et al.*, 2011). Des plans de surveillance menés en France entre 2007 et 2009 ont également montré la présence de STEC et d'AEEC simultanément dans des échantillons alimentaires (Anses, 2012b). Dans les viandes de bœuf, 31 souches AEEC ont été mises en évidence ainsi que 38 souches de STEC. Dans des fromages au lait cru, 15 souches AEEC et 17 souches STEC ont été recensées. Parmi les AEEC détectés, 25/31 (issus de viande) et 6/15 (issus de fromage) appartiennent au sérotype O26:H11 (Anses, 2012b).

Enfin, l'étude de Trevisani *et al.* a aussi révélé la présence (séparée) dans des échantillons de lait ou dans des filtres à lait d'*E. coli stx*-positif et d'*E. coli stx*-négatif provenant des sérogroupes O157 et O26. En ce qui concerne le séro groupe O26, sur les 255 échantillons de lait, 0,4% contenaient une souche d'*E. coli* O26*stx*-positif et 2% contenaient une souche d'*E. coli* O26 *stx*-négatif ; et pour les 225 filtres à lait, 0,4% contenaient une souche d'*E. coli* O26 *stx*-positif et 0,9% contenaient une souche d'*E. coli* O26 *stx*-négatif (Trevisani *et al.*, 2014).

## I.2. Les phages Stx dans l'alimentation et l'environnement

### *I.2.1. Les phages Stx dans les aliments*

Imamovic *et al.* (2011) ont réalisé des études concernant la présence de phage Stx dans les aliments (Imamovic & Muniesa, 2011). Ces phages ont été quantifiés par PCR en temps réel (PCRq) ciblant le gène *stx*. Ils ont ainsi mis en évidence la présence de phage Stx en moyenne à  $10^4$  copies de gènes (GC) *stx* dans 25g de viande hachée et  $10^3$  GC dans 25g de salade. De plus, cette étude a évalué l'augmentation de la densité des phages Stx après une phase d'enrichissement (incubation de l'aliment dans un milieu d'enrichissement). Les

résultats ont montré que dans 52 à 56% des échantillons de viande hachée, la densité de phages Stx a augmenté en moyenne de 3 log après enrichissement. Cette augmentation de densité indique que la plupart des phages Stx contenus dans ces échantillons sont infectieux (Imamovic & Muniesa, 2011).

La présence de phages Stx a aussi été mise en évidence dans la filière laitière mais très peu de données sont disponibles actuellement sur ce sujet. Au cours d'une étude, 50 échantillons de fromage au lait cru et 25 échantillons de lait cru ont été soumis à un processus d'enrichissement des STEC. Les souches de STEC isolées des échantillons ont ensuite été traitées à la norfloxacine pour induire les phages Stx et des phages Stx2 ont pu être détectés (Volponi *et al.*, 2012).

### *1.2.2. Les phages Stx dans l'environnement*

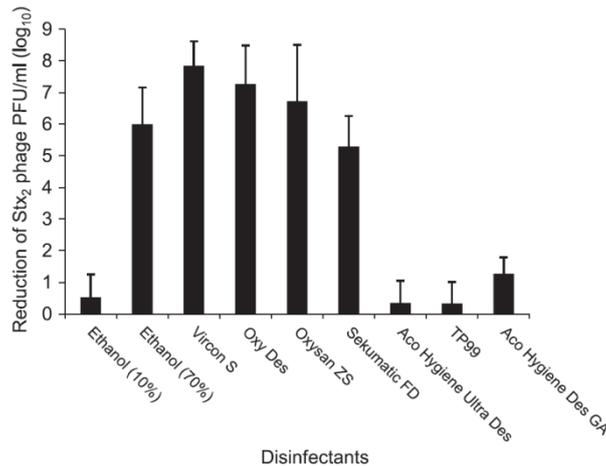
Une étude d'Imamovic *et al.* (2010) a révélé la présence de phages Stx dans des échantillons d'eaux usées urbaines et d'eaux usées contaminées par des fèces d'animaux (bovins, porcs et volailles), mais également dans des échantillons de fèces d'animaux et d'humains (Imamovic *et al.*, 2010a). La proportion de phages Stx détectés était élevée dans tous les échantillons. Des phages Stx ont été retrouvés dans 70% des échantillons d'eaux usées urbaines avec  $10$  à  $10^3$  GC *stx* par mL et dans 94% des échantillons d'eaux usées contaminées par des fèces d'animaux avec une concentration variant de  $10$  à  $10^{10}$  GC/mL. Concernant les échantillons de fèces, 89% des fèces de bovins étaient positifs ( $10$  à  $10^5$  GC/g) tandis que 31,8% de tous les autres échantillons de fèces contenaient des phages Stx ( $10$  à  $10^4$  GC/g) (Imamovic *et al.*, 2010a).

### *1.2.3. Stabilité des phages Stx*

Des études ont été menées sur la stabilité des phages Stx dans les aliments et durant des processus alimentaires (Langsrud *et al.*, 2014, Rode *et al.*, 2011).

L'étude de Rode *et al.* (2011) a investigué la stabilité des phages Stx dans plusieurs produits alimentaires. Le stockage, les processus alimentaires et la désinfection ont aussi été étudiés pour évaluer leur influence sur l'infectivité des particules de phages (Rode *et al.*, 2011). Une perte d'infectivité des phages Stx a été montrée après un stockage d'un mois à  $4^{\circ}\text{C}$  (entre 2 et 4  $\log_{10}$  de réduction) ou à  $37^{\circ}\text{C}$  ( $>5$   $\log_{10}$  de réduction), tandis qu'à  $24^{\circ}\text{C}$ , cette perte est inférieure à 1  $\log_{10}$ . Les traitements thermiques de la viande ont montré que l'infectivité des phages Stx est fortement diminuée après 10min à  $60^{\circ}\text{C}$ . Un pH acide diminue aussi l'infectivité des phages Stx.

De plus, ces phages sont sensibles à la dessiccation avec une perte de 90 à 95% par rapport au titre de phages d'origine avant séchage. Enfin, l'étude montre que les phages Stx sont relativement résistants à certains désinfectants tels que l'éthanol à 10%, l'Aco Hygiene (Ultra Des et Des GA) et le TP99 (Figure 17). En revanche, une exposition de 5 min en présence d'agent oxydant à 1% a montré une diminution du titre de phage d'environ 5 log<sub>10</sub> (Figure 17). De plus, une exposition durant 30 min en présence d'éthanol à 70% a entraîné une éradication totale des phages Stx (Rode *et al.*, 2011).



**Figure 17. Décimation des phages Stx exposés à huit solutions de désinfection**

Les phages Stx étudiés ont été mis en contact pendant 5 min à huit solutions de désinfection différentes à une concentration de 1% excepté pour l'éthanol (10 et 70%). Le graphique représente la réduction du titre de phage en log<sub>10</sub> d'unité formant plages (PFU ou UFP) par millilitre. (Rode *et al.*, 2011)

La seconde étude portait sur la survie des phages Stx dans la viande, le jus de la viande et la marinade (+/- acidifiée). Cette survie a été évaluée durant 14 jours de stockage à 4°C (viande) ou 20°C (marinade). Cette étude a montré que la quantité de phages Stx issus de la viande chute d'environ 3 log<sub>10</sub> après deux jours de stockage et de 5 log<sub>10</sub> après sept jours. Après 14 jours, des phages Stx étaient toujours détectables cependant dans le jus de viande. Concernant la marinade, après deux jours de stockage une diminution 2 log<sub>10</sub> a été mise en évidence, tandis que, dans la marinade acidifiée, aucun phage Stx n'a été retrouvé (Langsrud *et al.*, 2014).

## **II. Méthodes de détection des STEC et des phages Stx**

### II.1. Règlements concernant les STEC

#### *II.1.1. Réglementation européenne*

Le règlement (CE) n°178/2002 indique qu'aucune denrée alimentaire préjudiciable à la santé et/ou impropre à la consommation ne peut être mise sur le marché en tenant compte notamment des conditions normales d'utilisation, de l'information fournie au consommateur, ainsi que de la sensibilité spécifique de certains consommateurs. De plus, les exploitants du secteur alimentaire sont tenus de retirer du marché les denrées alimentaires dangereuses pour la santé (Anses, 2012b).

La réglementation concernant les analyses microbiologiques des aliments a été établie par le règlement (CE) n°2073/2005. Il établit les critères microbiologiques applicables à certains micro-organismes et les règles d'application que les exploitants du secteur alimentaire doivent observer lorsqu'ils mettent en œuvre les mesures d'hygiène générales et spécifiques visées à l'article 4 du règlement (CE) n°852/2004 (Règlement-(CE), 2005).

La récente épidémie de 2011 a entraîné une modification de ce règlement (CE) n°2073/2005 incluant les graines germées et décrite dans le règlement (UE) n°209/2013 de la commission du 11 mars 2013 (Règlement-(UE), 2013). En revanche, dans ce règlement modifié, le critère microbiologique relatif aux STEC (O157, O26, O111, O103, O145 et O104:H4) s'applique seulement aux graines germées. Le règlement prévoit un plan d'échantillonnage de cinq échantillons, la méthode d'analyse de référence est basée sur la norme XP CEN/ISO TS 13136 et le critère d'acceptation est : « absence de STEC dans 25 grammes ».

#### *II.1.2. Les contrôles mis en place en France*

En France, des contrôles officiels des denrées alimentaires ont été mis en place, sans préavis et à n'importe quel stade de la production et de la transformation afin de s'assurer du respect des législations européennes fixées par le règlement (CE) n° 852/2004. Ce règlement vise à assurer l'hygiène des denrées alimentaires à toutes les étapes du processus de production, depuis la production primaire jusqu'à la vente au consommateur final. Il ne couvre pas les questions relatives à la nutrition, ni celles concernant la composition et la qualité des denrées alimentaires. Ce règlement s'applique aux entreprises du secteur alimentaire et non à la production primaire et à la préparation domestique de denrées alimentaires aux fins de l'utilisation privée (Règlement-(CE), 2004).

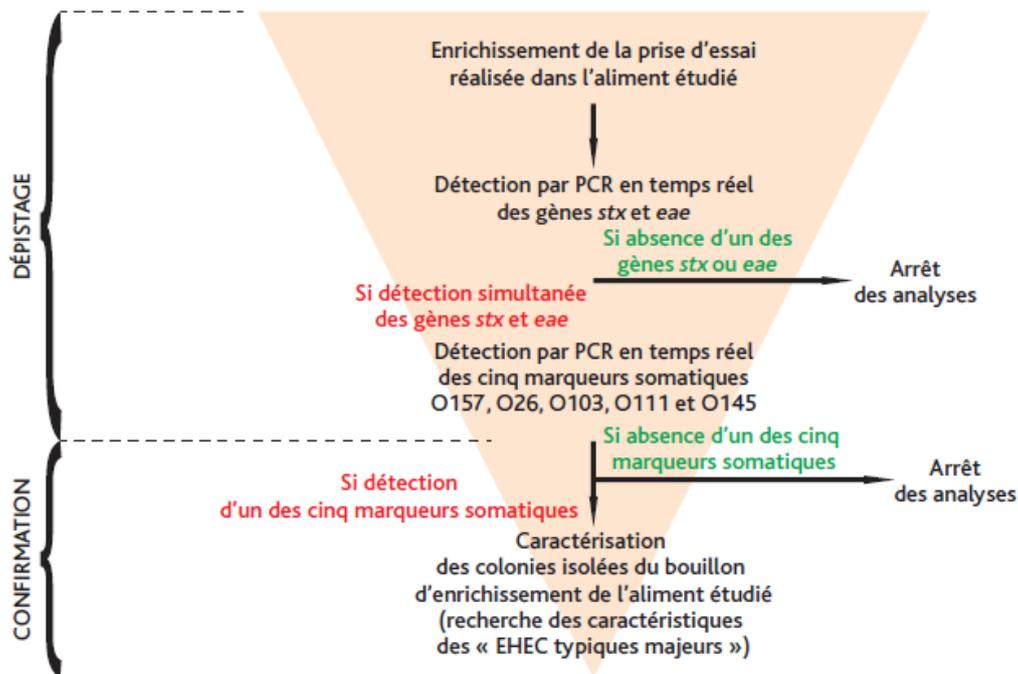
Des plans de surveillance et de contrôle (PSPC) officiels ont donc été mis en place par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) et la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) et ont la particularité d'être programmés annuellement. Depuis 2005, la DGAL a régulièrement mis en place des plans de surveillance de la contamination par des STEC pathogènes dans des catégories d'aliments considérées les plus à risque telles que les viandes hachées de bœuf surgelées à la production (2007, 2011, 2012), les viandes hachées de bœuf réfrigérées à la distribution (2006, 2009, 2010), les minerais de bœuf (2008) et les fromages au lait cru à la production (2005 : chèvre; 2007 : vache ; 2009 : vache, chèvre, brebis) (Anses, 2012b).

Enfin, la DGCCRF a mis en place des plans de surveillance des STEC (notamment pour le sérotype O104:H4) dans les végétaux, y compris les graines germées et à germer, au stade de la distribution (Anses, 2012b).

## II.2. Méthodes de détection des STEC dans les aliments

### II.2.1. Détection des STEC : Norme XP CEN ISO/TS 13136

La recherche de l'ensemble des STEC et des sérotypes d'intérêt est réalisée, dans le cadre des contrôles officiels, selon une méthode décrite par le Laboratoire National de Référence (LNR). Cette méthode est basée sur la spécification technique XP CEN ISO/TS 13136 adaptée par l'Organisation internationale de normalisation (ISO) le 15 juin 2012, publiée le 07 Novembre 2012 et recommandée par l'EFSA (ISO, 2012, Anses, 2012b). Cette méthode comprend quatre étapes (Figure 18). Une première étape d'enrichissement de l'aliment investigué est effectuée en présence d'agents sélectifs, permettant aux souches pathogènes éventuellement présentes de se multiplier jusqu'à atteindre des niveaux détectables et de façon préférentielle par rapport aux autres microorganismes présents dans ces aliments. La seconde étape est réalisée à partir d'extrait d'ADN totaux (de tous les microorganismes présents) issus du bouillon d'enrichissement. Une technique de PCR en temps réel (PCRq) est ensuite utilisée, permettant d'amplifier les principaux marqueurs des souches STEC considérées hautement pathogènes, tels que les gènes *stx*, *eae*, et ceux associés aux cinq principaux sérogroupes d'EHEC. La troisième étape consiste à isoler les souches d'*E. coli* uniquement si les résultats obtenus précédemment sont positifs (*stx*+, *eae*+ et présence de gènes spécifiques à l'un des cinq sérotypes). La dernière étape est une caractérisation phénotypique et génotypique des souches d'*E. coli* isolées précédemment (ISO, 2012, Anses, 2012b).



**Figure 18. Schématisation des principales étapes de la méthode de recherche des souches STEC hautement pathogènes**  
(Anses, 2012b)

### II.2.2. Autres méthodes de détection des STEC

Le principe de la méthode TS 13136 avait été appliqué quelques années auparavant dans de la viande hachée en amplifiant par PCR le gène *stx* ainsi que les gènes associés au « top five », et en isolant les bactéries grâce à la technique de séparation immunomagnétique (IMS) (Auvray *et al.*, 2007). Cette méthode PCR décrite avait ensuite été affinée et mise en application sur des fromages au lait cru par Madic *et al.* (Madic *et al.*, 2010, Madic *et al.*, 2011).

L'utilisation d'un contrôle interne d'amplification (IC ou IAC) a également été décrite afin de détecter les STEC dans les aliments tout en ayant la possibilité de s'affranchir des inhibiteurs de PCR susceptibles d'entraîner un résultat faux-négatif (Auvray *et al.*, 2009).

Enfin, une méthode capable de détecter et de quantifier tous les variants des gènes *stx* a été mise en place par l'intermédiaire d'une PCRq multiplex en combinaison avec deux IAC (Derzelle *et al.*, 2011).

Récemment, une technique d'isolement des STEC a été proposée par Lin *et al.* en utilisant un milieu nommé « STEC heart infusion washed blood agar with mitomycin C » ou SHIBAM. Ce milieu est une modification de la gélose au sang de mouton additionnée de mitomycine C. Avec ce milieu, la plupart des souches de STEC produisent une zone d'hémolyse sur la gélose SHIBAM permettant de les distinguer de la flore totale (Lin *et al.*, 2012).

Pour finir, Quiros *et al.* ont développé une méthode moléculaire visant à améliorer la détection des STEC en réduisant l'interférence liée à la présence des phages Stx (Quiros *et al.*, 2015). En effet, la détection des gènes *stx* n'est pas un indicateur strict de la présence de STEC mais peut aussi marquer la présence de phages Stx libres. Pour pallier à cet effet sans réduire la capacité de détection des STEC, les auteurs proposent d'ajouter une étape de filtration de la suspension mère (échantillon dilué) afin d'éliminer les phages. Cette étape est réalisée à l'aide d'une membrane en PVDF (pour « *polyvinylidene fluoride* ») avec des pores de 0,45µm de diamètre possédant une faible capacité de rétention des protéines. Le filtre contenant les bactéries est ensuite nettoyé (un à trois lavages) avec du PBS (« *phosphate buffer saline* ») pour éliminer les phages potentiellement restant, avant d'extraire l'ADN bactérien (Quiros *et al.*, 2015).

### II.2.1. Méthodes de détection des phages Stx

Les méthodes utilisées pour la détection des phages Stx consistent à extraire l'ADN de phage en prenant soin de se débarrasser au préalable des cellules bactériennes. La quantification des phages est généralement basée sur la PCRq visant à amplifier le gène *stx* (Imamovic *et al.*, 2010a, Rooks *et al.*, 2010) ou d'autres gènes comme le gène *Q* (Rooks *et al.*, 2010). D'autres méthodes peuvent être utilisées basées sur la formation de plages de lyse obtenues à partir d'une souche indicatrice. Elles sont parfois suivies d'une confirmation par hybridation sur les plages de lyse avec une sonde d'hybridation spécifique du gène *stx* (Muniesa *et al.*, 2004a). Des compléments de protocole pour cette méthode ont été apportés par d'autres auteurs lorsque la méthode « classique » n'a pas permis d'isoler des plages de lyse. Ces compléments peuvent être, un ajout, de mitomycine C et de Ca<sup>2+</sup> (Islam *et al.*, 2012), ou d'ampicilline à faible dose (Los *et al.*, 2008) dans le Top-Agar, gélose contenant le mélange phage/bactérie indicatrice et utilisée pour les plages de lyse.

### **III. Perte des phages Stx, conversion lysogénique et impact sur le diagnostic**

#### **III.1. Problématique liée à la présence de souches *E. coli* stx-négatives**

##### ***III.1.1. Hypothèses sur l'origine des souches *E. coli* stx-négatives***

Les STEC ont la particularité de pouvoir perdre ou d'acquérir un phage Stx (Bielaszewska *et al.*, 2007, Karch *et al.*, 1992). La perte des phages Stx a été démontrée *in vivo* par Karch *et al.* suite à un repiquage de souches d'EHEC issues de cas cliniques devenues stx-négatives. Le plus surprenant est que ces souches avaient perdu leur phage en l'absence de lyse cellulaire (Karch *et al.*, 1992). Bielaszewska *et al.* ont également montré la perte *in vitro* de phages Stx provenant de souches du sérotype O26 (Bielaszewska *et al.*, 2007).

Mellmann *et al.* ont aussi montré la perte du gène *stx* *in vivo* chez l'homme lors de l'isolement de STEC à différents stades au cours de l'infection (Mellmann *et al.*, 2005). L'analyse des selles de patients atteints de SHU a permis de détecter lors de la première collecte des EHEC dans 137 échantillons et des souches stx-négatives mais *eae*-positives dans 5 échantillons. Une seconde collecte de selles a montré que sept patients initialement excréteurs d'EHEC possédaient désormais des souches stx-négatives et *eae*-positives, suggérant que la perte du gène *stx* s'effectuerait *in vivo* chez l'Homme pendant un court intervalle (Mellmann *et al.*, 2005).

Pour finir, une étude de Joris *et al.* portant sur la perte des phages Stx après le premier repiquage a été menée sur les sérotypes O157 et non-O157 (Joris *et al.*, 2011). Ils ont mis en évidence que cette perte était plus fréquente pour les sérotypes non-O157. Par conséquent, la présence des STEC chez les animaux, l'Homme et l'alimentation pourrait être sous-estimée (Joris *et al.*, 2011).

D'après l'étude de Madic *et al.*, le fait que des souches d'*E. coli* O26:H11 stx-négatives aient été isolées à partir d'échantillons stx-positifs soulève quelques questions sur le résultat du diagnostic. On ne peut exclure la possibilité que ces souches soient des dérivés de STEC ayant perdu leur gène *stx* et plus particulièrement leur phage Stx durant la procédure d'enrichissement ou d'isolement. Une autre hypothèse serait que le gène *stx* détecté dans les échantillons de fromage soit porté par d'autres souches bactériennes que les *E. coli* O26:H11 (Madic *et al.*, 2011).

### III.1.2. Différenciation des souches par des marqueurs génétiques

Des études ont été effectuées pour déterminer des différences entre les souches EHEC et EPEC (ou AEEC). Bugarel *et al.* se sont particulièrement intéressés aux *E. coli* du sérotype O26 (Bugarel *et al.*, 2011). Ils ont utilisé une technique de PCR à haut-débit pour sélectionner des marqueurs génétiques discriminants. Des gènes codant des protéines effectrices du système de sécrétion de type III ont pu être retrouvés dans les différentes souches d'*E. coli*. En revanche, les gènes *espK* et *espN* étaient essentiellement retrouvés dans les EHEC et constitueraient alors de bons marqueurs génétiques de ces souches (Bugarel *et al.*, 2011). Cette étude a été étendue par Delannoy *et al.* à d'autres sérotypes en plus de O26:H11, tels que O45:H2, O103:H2, O111:H8, O121:H19, O145:H28 et O157:H7. Ils ont montré que les gènes *espK*, *espV*, *ureD* et *Z2098* étaient la meilleure combinaison pour détecter spécifiquement et avec une forte sensibilité les sept sérotypes d'EHEC (Delannoy *et al.*, 2013a).

## III.2. Conversion lysogénique

### III.2.1. Généralités et cas concrets

La conversion lysogénique se caractérise par l'acquisition d'un prophage dans le chromosome d'une bactérie. Cette acquisition serait un processus sans importance pour l'évolution des bactéries pathogènes si les phages ne transféraient pas de gènes utiles aux lysogènes. Cependant certains gènes des phages sont connus pour augmenter l'aptitude de survie des lysogènes (Brussow *et al.*, 2004).

L'acquisition du phage Stx par des *E. coli* *stx*-négatifs a été démontré *in vitro* (Bielaszewska *et al.*, 2007, Schmidt, 2001). En effet, Bielaszewska *et al.* ont montré la capacité d'un phage Stx2 issu d'un EHEC O26 à lysogéniser un aEPEC O26 et le convertir en EHEC (Bielaszewska *et al.*, 2007).

De plus, la récente épidémie de 2011 causée par des STEC du sérotype O104:H4 en Allemagne a montré qu'il s'agissait d'un *E. coli* *stx*-négatif et plus particulièrement d'un EAEC ayant acquis un phage Stx (Muniesa *et al.*, 2012).

Suite à l'étude de l'induction aux UV en association avec des températures élevées, Yue *et al.* ont, par la même occasion, montré la capacité des phages Stx2 à infecter des *E. coli* non pathogènes (non-STECS) tels que la souche MG1655 (*E. coli* de laboratoire K12) (Yue *et al.*, 2012). De plus, il a été démontré par ailleurs que les phages avaient la capacité d'effectuer des réarrangements de leur génome par des systèmes de recombinaison. Ainsi ces phages, à

l'origine défectifs, retrouvent la capacité à lysogéniser des bactéries (Asadulghani *et al.*, 2009, Svab *et al.*, 2015).

Des études ont aussi montré que certains phages Stx étaient plus efficaces *in vivo* qu'*in vitro* pour infecter des *E. coli stx*-négatifs (Acheson *et al.*, 1998, Cornick *et al.*, 2006, Toth *et al.*, 2003).

Enfin, une étude a mis en évidence le transfert de phages Stx à d'autres *E. coli* sous forme de biofilm. Le biofilm serait un environnement favorable pour l'émergence de nouveaux *E. coli* pathogènes (Solheim *et al.*, 2012).

### III.2.2. Lysogénisation dans les aliments et l'environnement

Plusieurs études ont mis en évidence des phénomènes de lysogénisation dans les aliments et l'environnement dans des conditions adaptées (Imamovic *et al.*, 2009, Muniesa *et al.*, 2011). Une étude a montré des phénomènes de lysogénisation aussi bien dans de l'eau, du lait, de la salade que de la viande hachée (Imamovic *et al.*, 2009). Dans le jus d'orange, la lysogénisation n'a pas été concluante sans doute due au pH trop faible (3,7). Ce résultat indique qu'un traitement acide pourrait potentiellement prévenir la lysogénisation (Imamovic *et al.*, 2009). Une étude de Picozzi *et al.* a montré des phénomènes de lysogénisation dans le lait selon différents profils thermiques. En revanche, les auteurs ont constaté que les concentrations initiales et finales des cellules donatrices et receveuses n'ont pas d'effet sur la génération de lysogènes (Picozzi *et al.*, 2012).

### III.2.3. Protection bactérienne contre la conversion lysogénique

Les bactéries ont développé des mécanismes de protection pour empêcher l'adsorption de bactériophages. Il existe au moins trois types de mécanismes de protection: le blocage des récepteurs des phages, la production de matrices extracellulaires et la production d'inhibiteurs compétitifs (Labrie *et al.*, 2010). Le blocage des récepteurs des phages peut se traduire par un changement de la conformation du récepteur ou par l'ajout de protéines qui viennent se fixer au récepteur afin de le masquer. La production de matrices extracellulaires correspond à un polymère d'exopolysaccharides (EPS) couvrant la surface de la bactérie. Enfin, les inhibiteurs compétitifs sont des molécules naturellement présentes dans l'environnement bactérien qui peuvent se fixer spécifiquement aux récepteurs des phages les rendant ainsi inaccessibles (Labrie *et al.*, 2010).

Une récente étude d'Imamovic *et al.* a montré l'importance du système BaeSR impliqué dans la réponse aux stress (Imamovic *et al.*, 2015). Le système BaeSR, lié à l'enveloppe bactérienne, est constitué d'une « *histidine sensor kinase* » (BaeS) présente dans la membrane interne et d'un régulateur de réponse (BaeR) localisé dans le cytoplasme. Ils ont démontré que lorsque le système BaeSR était muté, la lysogénéisation augmentait de 5 log<sub>10</sub> par rapport à la bactérie sauvage (Imamovic *et al.*, 2015). De plus, une étude de Baranova & Nikaido a montré que le système BaeSR semblait être impliqué dans des mécanismes de résistance à la novobiocine (Baranova & Nikaido, 2002), cette dernière étant utilisée pour la sélection des STEC dans la norme CE ISO/TS 13136 décrite précédemment.

Il existe d'autres systèmes de protection tels que les mécanismes d'exclusion de la surinfection. Ces systèmes sont constitués de protéines qui bloquent l'entrée de l'ADN du phage dans les bactéries, conférant ainsi une immunité contre des phages spécifiques. Ces protéines sont prédites pour être ancrées à la membrane bactérienne ou associées à des composants de la membrane. De plus, les gènes codant ces protéines sont généralement localisés dans le génome des prophages. Cette localisation suggère que, dans de nombreux cas, les systèmes d'exclusion de la surinfection sont importants pour les interactions entre phages, plutôt que pour les interactions hôte-phage (Labrie *et al.*, 2010).

Le système de restriction-modification (R-M) est aussi très utile aux bactéries et permet de les protéger contre l'entrée d'ADN étranger. Lorsqu'un ADN non méthylé pénètre dans la cellule, il est immédiatement reconnu et détruit par le système R-M. En revanche, si l'ADN du phage est méthylé, il n'est pas reconnu par le système R-M et peut infecter des bactéries possédant le même système R-M que celle dont il provient (Labrie *et al.*, 2010). Il existerait ainsi quatre familles de système R-M : IA, IB, IC et ID (Titheradge *et al.*, 2001). La souche EDL933 (O157:H7) possède un système R-M de type IB (Titheradge *et al.*, 2001).

# ***Etude expérimentale***



## Objectifs des travaux de thèse

---

D'un point de vue scientifique, il était primordial d'approfondir les connaissances sur les phages Stx, avec une attention particulière au polymorphisme des gènes *stx* qu'ils véhiculent, ainsi qu'à leur mobilité. Les gènes *stx* codent, en effet, le principal facteur de virulence dont le polymorphisme a des répercussions sur le degré de virulence des STEC. La mobilité du support génétique des gènes *stx* peut avoir un impact sur les méthodes de diagnostic d'une part, et conduire à l'émergence de nouvelles souches pathogènes d'autre part. Ce projet de thèse se propose également d'améliorer la connaissance des conditions permettant l'induction des phages Stx chez les STEC O26:H11, en ciblant principalement l'impact que peuvent avoir les procédés de fabrication des fromages et les méthodes analytiques de recherche des STEC dans les aliments sur ce phénomène. Ces travaux visent ainsi à renforcer l'expertise en matière de risques liés aux STEC O26:H11, en apportant des connaissances nouvelles sur les mécanismes d'acquisition ou de perte des gènes *stx* chez ces bactéries.

D'un point de vue sanitaire, ce projet de thèse présente des enjeux majeurs, à la fois pour les professionnels de filières dans le cadre de la maîtrise sanitaire de leurs produits, et pour les pouvoirs publics dans le cadre des contrôles officiels ou des plans de surveillance et de contrôle. Les enjeux économiques pour les professionnels (filiale laitière, viande, produits préparés...) sont également de plus en plus importants en matière de commercialisation des produits, notamment à l'export, où certains pays, plus gravement touchés par les infections à STEC, sont très sensibles à cette problématique.

Ce projet de thèse avait pour but de répondre à ces problématiques. De ce fait, le premier objectif portait sur la caractérisation d'une collection de souches de STEC O26:H11 provenant de diverses origines (humaine, laitière et bovine). Il s'agissait d'identifier les sous-types du gène *stx* puis de déterminer les sites d'insertion des phages Stx dans le chromosome bactérien, afin d'explorer la diversité éventuelle de ces souches pour ces deux paramètres. Des modèles de PCR conventionnelle et temps réel ont été conçus au cours de ces travaux pour la détermination des sites d'insertion des phages Stx.

Il s'agissait ensuite d'étudier la stabilité des phages Stx, selon les sites d'insertion dans lesquels ils sont intégrés, pour essayer de comprendre l'origine des souches d'*E. coli* O26:H11 *stx*-négatives (ou AEEC). Le projet incluait aussi l'évaluation de l'état des sites d'insertion des phages Stx au sein d'une collection de souches AEEC O26:H11 pour déterminer si ces souches ont perdu leur phage Stx (par excision spontanée) ou seulement le

gène *stx* (par délétion). Le but de cette première partie des travaux, était d’acquérir des connaissances sur la diversité des phages Stx issus de STEC O26:H11 et d’identifier d’éventuelles différences entre les souches laitières et les souches humaines (isolées de cas humains).

Le second objectif portait sur le développement de protocoles expérimentaux permettant d’évaluer les niveaux d’induction des phages Stx, puis de comparer des souches STEC O26:H11 représentatives de la collection. Ceci avait pour but d’acquérir des connaissances sur le niveau d’induction des phages Stx et en fonction de l’origine des souches, soit laitière et soit humaine. De plus, une étude visant à lysogéniser (infecter) des souches AEEC O26:H11 par des phages Stx, a été initiée pour évaluer la transférabilité des phages Stx à ces souches pouvant les rendre pathogènes à leur tour.

Le troisième objectif était d’étudier l’induction des phages Stx dans des conditions relatives (i) soit à la fabrication de fromages, (ii) soit au processus analytique d’isolement des STEC. En effet, lors de la production d’aliments, des stress peuvent être engendrés par certains procédés de fabrication, de transformation ou de conservation et entraîner le déclenchement d’un cycle lytique et donc la présence de phages Stx dans les produits alimentaires. Une étude a donc été menée sur les stress liés à la fabrication de fromages tels que le salage, l’acidification, la température et l’oxydation. L’étude du phénomène d’induction lors du processus analytique d’isolement des STEC était motivée par l’isolement fréquent d’AEEC à partir d’aliments dans lesquels la présence de gènes *stx* avait été détectée par PCR dans le bouillon d’enrichissement. De plus, l’induction et le déclenchement du cycle lytique pourrait provoquer la lyse des STEC et conduire à un résultat faux négatif. Les étapes de la méthode de référence XP CEN ISO/TS 13136 ont donc été testées pour leur capacité à induire les phages Stx.

Un quatrième et dernier objectif visait à établir un protocole permettant de déterminer l’occurrence des phages Stx dans les aliments et les environnements d’ateliers technologiques. Il s’agissait également d’utiliser ce protocole afin de réaliser une étude préliminaire à partir d’échantillons de fromages à différentes étapes de la chaîne de fabrication ainsi que de prélèvements de surface. En effet, il existe peu de données sur la présence de phages Stx libres surtout dans l’environnement laitier. Or ces éléments sont nécessaires pour évaluer les risques de diffusion des phages Stx dans les aliments et de transmission vers d’autres *E. coli*.

# Chapitre 1. Caractérisation des STEC et des phages Stx

---

## I. Article 1

**Bonanno, L., E. Loukiadis, P. Mariani-Kurkdjian, E. Oswald, L. Garnier, V. Michel and F. Auvray** (2015). "Diversity of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) O26:H11 Strains Examined via *stx* Subtypes and Insertion Sites of Stx and EspK Bacteriophages." Applied and Environmental Microbiology **81**(11): 3712-3721

### I.1. Objectifs

Ces travaux avaient pour objectifs d'explorer la diversité génétique d'une collection de STEC O26:H11 d'origines humaine, alimentaire (principalement des produits laitiers) et animale (bovins) en étudiant leur principal facteur de virulence. Ils visaient à caractériser les sous-types du gène *stx* et les sites d'insertion chromosomiques des phages Stx. De plus, une étude phylogénétique par la méthode MLST (Multi-Locus Sequence Type) a aussi été menée en parallèle sur un petit nombre de souches.

L'étude des sous-types du gène *stx* a été réalisée par une méthode de PCR conventionnelle développée par Scheutz *et al.*, basée sur l'amplification des trois sous-types du gène *stx1* et des sept sous-types du gène *stx2* (Scheutz *et al.*, 2012).

L'identification des sites d'insertion chromosomiques des phages Stx, a été, dans un premier temps, effectuée par PCR conventionnelle à partir de couples d'amorces décrits dans la littérature, ou développés au cours des travaux de thèse. Neuf sites d'insertion ont ainsi été étudiés. Il s'agit des sites *wrbA*, *yehV*, *yecE*, *sbcB*, *Z2577*, *ssrA*, *prfC*, *argW* et de la région intergénique *torS-torT*. Deux études PCR ont été réalisées, la première était basée sur l'amplification du site *attB* et témoigne de l'absence de génome de phage dans un locus donné, tandis que la seconde était basée sur l'amplification du site jonction *attL* et témoigne de la présence du prophage (génome du phage intégré dans le chromosome bactérien).

Dans un deuxième temps, des modèles de PCR en temps réel ont été développés pour quatre des neuf sites d'insertion étudiés (*wrbA*, *yehV*, *yecE* et *sbcB*), afin de réduire le temps des analyses et effectuer des dosages des sites *attB* et *attL*. Le but du dosage des sites *attB* et *attL* était d'évaluer la stabilité des prophages Stx au sein d'une culture pure de STEC, selon les sites d'insertion dans lesquels ils sont intégrés. Cette étude avait pour but de comprendre l'origine des souches *stx*-négatives.

Enfin la caractérisation des sites d'insertion des phages Stx a aussi été effectuée sur une collection de 29 souches *E. coli* O26:H11 *stx*-négatives (AEEC). Cette étude avait pour objectif, de déterminer si ces souches peuvent correspondre à des STEC ayant perdu leurs phages Stx ou seulement leur gène *stx*.

## I.2. Résultats et discussion

### I.2.1. *Détermination des sous-types du gène stx et des sites d'insertion des phages Stx*

L'étude des sous-types du gène *stx* a montré que les 74 souches étudiées possèdent essentiellement les sous-types *stx*<sub>1a</sub> (n = 56) et *stx*<sub>2a</sub> (n = 20). Un autre sous-type, *stx*<sub>2d</sub>, a été retrouvé dans une seule souche d'origine humaine. De plus, trois souches possèdent simultanément les deux sous-types (*stx*<sub>1a</sub> et *stx*<sub>2a</sub>) tandis que cinq souches possèdent deux copies du même sous-type. Lorsque l'on prend en compte l'origine des souches, on constate que la majorité des souches laitières (88,2%) et la totalité des souches bovines possèdent le sous-type *stx*<sub>1a</sub> tandis que les souches humaines possèdent en proportion équivalente les deux sous-types (*stx*<sub>1a</sub> et *stx*<sub>2a</sub>).

L'étude des sites d'insertion des phages Stx a permis de mettre en évidence l'existence de quatre sites d'insertion préférentiellement occupés par les phages Stx dans les STEC O26:H11. Il s'agit des sites *wrbA* (37 souches), *yehV* (28 souches), et dans une moindre mesure, des sites *yecE* et *sbcB*. Aucun phage Stx n'a été détecté dans les cinq autres sites d'insertion étudiés (*Z2577*, *prfC*, *argW*, *ssrA* et la région intergénique *torS-torT*). De plus, pour les souches possédant deux phages Stx, des méthodes de PCR « *long-template* », visant à amplifier de long fragments d'ADN (>15kb), ont été développées pour déterminer le site d'insertion de chacun des phages. Ainsi, pour la souche 09QMA277.2, le phage Stx<sub>1a</sub> est intégré dans le site *yehV* et le phage Stx<sub>2a</sub> est intégré dans *wrbA*. Les souches 3073/00 et 3901/97 ont leur phage Stx<sub>2a</sub> localisé dans *yecE* et leur phage Stx<sub>1a</sub> intégré respectivement dans *yehV* et *wrbA*.

Une analyse des combinaisons formées d'un sous-type du gène *stx* et d'un site d'insertion chromosomique du phage Stx en fonction de l'origine des souches a été effectuée. On a constaté que les souches d'origines laitière et bovine ont leurs phages Stx intégrés essentiellement dans *wrbA* et *yehV*, tandis que les souches humaines ont leurs phages Stx intégrés dans *wrbA* et *yehV* mais aussi dans le site *yecE*. En effet, *yecE* sert de site d'insertion dans 28% des souches humaines. Il est important de noter que toutes les souches humaines possédant un phage Stx<sub>2a</sub> intégré dans *wrbA* et *yecE* ont été à l'origine de SHU, indiquant une

forte virulence de ces souches. En revanche, ces profils sont absents (ou rarement retrouvés) dans les souches d'origines laitière et bovine.

Pour finir, l'état des sites d'insertion a aussi été investigué dans 29 souches *stx*-négatives, pour vérifier l'absence de phages Stx ou bien seulement une délétion du gène *stx* qui se serait produite au cours du temps. Les résultats ont montré que les sites d'insertion sont intacts pour 25 des 29 souches *stx*-négatives, indiquant bien l'absence de phage Stx dans la majorité d'entre elles. Pour les quatre souches restantes, deux observations ont été faites. La première observation concerne les souches 5021/97 et 5080/97 pour lesquelles les sites *yehV* et *yecE* sont occupés par un phage Stx mais dont le gène *stx* est *a priori* délété. L'observation suivante concerne les souches 07QMA144.1 et F61-523 pour lesquelles un autre élément génétique, différent du phage Stx, a été détecté dans les sites *argW* et Z2577 respectivement.

### 1.2.2. Caractérisation phylogénétique des STEC O26:H11

Une étude phylogénétique par typage MLST a été réalisée sur 14 souches STEC de la collection. Les données de la littérature ont permis de classer ces souches selon deux séquences types, ST21 et ST29. Les souches *stx*<sub>2a</sub> qui sont à l'origine de SHU se distribuent entre ST21 et ST29. L'association du gène *stx*<sub>2</sub> à ST21 ou à ST29 a été démontrée comme un indicateur de SHU. En revanche, aucune combinaison d'un sous-type du gène *stx* et d'un site d'insertion donné du phage Stx n'a révélé de corrélation avec un ST particulier.

### 1.2.3. Stabilité des prophages *Stx*

Pour explorer la relation entre les STEC O26:H11 et les souches *stx*-négatives, une étude de la stabilité des prophages Stx a été effectuée au sein des cultures pures de STEC. Les quantités de sites *attB* et *attL*, témoignant respectivement de l'absence et de la présence d'un phage ont été déterminées. On a pu constater, pour chaque culture pure, une amplification simultanée des sites *attB* et *attL*, témoignant de l'excision spontanée du prophage Stx au cours de la croissance cellulaire. Des calculs de ratio *attB/attL* ont été effectués au niveau des quatre sites d'insertion chromosomiques (*wrbA*, *yehV*, *yecE* et *sbcB*). Ces ratios ont montré que ce phénomène d'excision spontanée n'est pas dépendant des sites d'insertion des phages Stx.

#### *I.2.4. Mise en évidence de la présence d'un phage EspK dans le site *ssrA**

Ces travaux ont aussi permis de mettre en évidence la présence dans les STEC O26:H11 d'un phage différent des phages Stx dans un site nommé *ssrA*. En effet, lors de la détermination des sites d'insertion des phages Stx, on a constaté que le site *ssrA* était souvent occupé chez les STEC O26:H11. L'hypothèse de la présence d'un phage EspK, codant un effecteur de type III, et intégré dans le site *ssrA*, a donc été émise. Les résultats ont montré que le phage EspK intégré dans *ssrA* est présent dans la majorité des STEC O26:H11 (soit 87,8%). En revanche, ce phage n'est présent que dans seulement 17,2% des souches O26:H11 *stx*-négatives.

#### I.3. Conclusion

En conclusion, ces travaux ont permis de mettre en évidence une variabilité des profils génétiques entre les souches STEC O26:H11 d'origines différentes. Il a été observé une grande diversité des sous-types du gène *stx* et des sites d'insertion des phages Stx issus de STEC O26:H11, avec quelques différences observées entre les souches humaines et les souches provenant des aliments et des bovins. Ces différences confirment d'autres travaux portant sur l'existence de différents clones de STEC O26:H11 possédant des niveaux de pathogénicité variés.