

Etude de l'induction des phages Stx selon des facteurs relatifs aux procédés de fabrication des fromages et à la méthode d'isolement des STEC

I. Article 3

Bonanno, L., B. Delubac, V. Michel and F. Auvray. " Influence of stress factors in cheese-making process and analytical STEC isolation procedure on the induction of Stx phages from STEC O26:H11 isolated from dairy products."

Pour publication dans le journal Frontiers in microbiology

I.1. Objectifs

Après avoir analysé l'induction *in vitro* des phages Stx, spontanée et en présence d'un agent inducteur fort, l'étude suivante avait pour objectif d'évaluer l'induction des phages Stx selon des conditions relatives aux procédés de fabrication des fromages mais aussi au processus analytique d'isolement des STEC.

En effet, lors du procédé de fabrication des fromages, certaines étapes peuvent engendrer des stress bactériens et entraîner l'induction des phages Stx. Ces stress peuvent être oxydatif ou acide. Ils sont dus à la libération par les autres bactéries présentes dans le fromage de composants oxydants, tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), ou d'acide lactique, entraînant l'acidification du milieu. L'étape consistant à ajouter du sel au fromage pour améliorer sa saveur et sa conservation peut aussi avoir un impact sur l'induction des phages Stx. Enfin, certains traitements thermiques tels que le chauffage à 42°C ou bien l'étape d'affinage à 9°C, peuvent aussi être des facteurs de stress pour les bactéries et déclencher des réponses cellulaires, entraînant l'induction des phages Stx.

Dans un second temps, nous nous sommes aussi interrogés quant à l'impact, sur l'induction des phages Stx, du processus analytique d'isolement des STEC. Ce processus est décrit par le Laboratoire National de Référence (LNR) et basé sur la spécification technique XP CEN ISO/TS 13136. En effet, des études ont montré que lors de ce processus, des bactéries AEEC peuvent être isolées à partir d'un aliment contaminé et positif pour le gène *stx* par PCR. Les STEC ne sont, en revanche, pas retrouvés. Une hypothèse serait que ces souches AEEC étaient au départ des STEC, qui ont ensuite perdu leurs phages Stx au cours de

la méthode d'isolement. Par ailleurs, l'induction des phages Stx pourrait provoquer la lyse des STEC et conduire à des résultats faux-négatif.

Dans cette étude, quatre composants chimiques utilisés dans la méthode ont été testés pour évaluer leur impact sur l'induction des phages Stx. L'acriflavine et la novobiocine en font partie et sont utilisées comme supplément dans le milieu d'enrichissement mTSB à partir d'échantillons de fromages et de viandes, respectivement. De plus, le milieu d'enrichissement mTSB est un bouillon à base de triptone soja modifié avec 1,5g/l de sels biliaires. Pour finir, l'étape d'isolement des souches s'effectue sur des géloses spécifiques dont la gélose CT-RMAC utilisée pour l'isolement des STEC du sérotype O26. Cette gélose contient un mélange de Céfixime-Tellurite (C-T) qui a été testé, dans cette étude, pour son éventuelle capacité à induire les phages Stx.

Trois souches STEC O26:H11 d'origine laitière ont été sélectionnées pour cette étude. Ces trois souches possèdent respectivement le gène *stx1* (2976-1), *stx2* (F46-223) ou les deux gènes simultanément (09QMA277.2; cette souche est dite « double lysogène »). Des protocoles d'induction des phages Stx ont été mis au point à partir des protocoles précédemment développés. Puis, la quantité de phages Stx produits a été déterminée selon la méthode par PCR en temps réel.

I.2. Résultats et discussion

I.2.1. Effets de différents facteurs relatifs aux procédés de fabrication de fromages

Les différents composés relatifs aux procédés de fabrication de fromages ont été ajoutés à une culture de STEC en phase exponentielle de croissance dans du milieu LB selon les concentrations suivantes : l'acide lactique à 0,05%, 0,5%, 1,5% ou 3% ; le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 0,25mM et 3mM ; et le NaCl à 3% final (tenant compte de la concentration de NaCl déjà présente dans le milieu de culture LB). Le stress thermique à quant à lui été évalué par la réalisation d'une culture de STEC à 9°C et 42°C, en comparaison d'une culture à 37°C.

Les résultats ont montré que le peroxyde d'hydrogène à 3mM augmente la production des phages Stx, en moyenne, de 1,2 $\log_{10}$ par rapport à la production spontanée (en absence d'agents inducteurs). Cela est vrai pour les trois souches, et pour une concentration de H_2O_2 à 0,25mM. Cet effet a déjà été observé dans la littérature, pour le sérotype O157:H7, confirmant les résultats de cette étude.

Le NaCl à 3% augmente la production des phages Stx1 issus de la souche *stx1+* (2976-1) de 1,33 log₁₀ par rapport à la condition témoin (induction spontanée). En revanche, aucune augmentation d'induction n'a été mise en évidence pour les phages Stx2 provenant de la souche *stx2+* (F46-223), ni pour les phages Stx1 et Stx2 issus de la souche double lysogène (09QMA277.2). Des études ont montré qu'en présence de NaCl à 2%, l'induction de phages Stx2 était observable, tandis qu'à 3%, l'induction n'avait pas lieu en raison d'une inhibition du système SOS. Si la présence de NaCl à 3% inhibe la réponse SOS, on pourrait imaginer alors que l'induction des phages Stx1 de la souche 2976-1 serait due à une autre réponse telle que la voie RecA-indépendante (voir page 56).

L'utilisation de l'acide lactique à 0,05% n'a pas d'impact sur l'induction des phages Stx, tandis, qu'à 0,5%, une légère diminution de la production des phages Stx a été observée et aucun phage n'a été détecté en présence de 1 et 3% d'acide lactique. Ceci est en accord avec des résultats issus de la littérature montrant qu'à pH acide, l'induction était inhibée.

Pour finir, l'évaluation d'une induction à différentes températures de culture a montré qu'à 9°C, la production de phage Stx est diminuée par rapport à une culture à 37°C, probablement en raison d'une croissance bactérienne ralentie. Des résultats similaires ont été observés à 42°C, mais cette diminution était moins marquée qu'à 9°C. En revanche, il a été mis en évidence que la diminution de la production des phages Stx concernait plus particulièrement les phages Stx2. Enfin, aucun effet, de la température, n'a été observé sur la production de phage Stx1 de la souche double lysogène.

I.2.2. Effets des facteurs relatifs au processus analytique d'isolement des STEC

L'analyse de différents composants chimiques utilisés dans la méthode d'isolement des STEC a montré que le mélange Céfixime-Tellurite (à 0,05mg/l de Céfixime et 2,5mg/l de Tellurite) ainsi que la novobiocine (20 mg/l), n'avaient pas d'impact sur la production des phages Stx, excepté pour la souche double lysogène, pour laquelle la novobiocine a entraîné une diminution de la production du phage Stx1 de 1,56 log₁₀. De plus, il a aussi été mis en évidence que l'acriflavine (12 mg/l) entraînait une diminution de la production des phages Stx1, mais uniquement pour la souche 2976-1. Des expériences similaires réalisées avec deux autres souches *stx1+* (10d et 09QMA245.2), n'ont permis d'observer ce même effet que pour l'une d'entre elles (10d). Sachant qu'il existe un gène responsable de la résistance à l'acriflavine, *acrA*, ce gène pourrait être muté dans les souches 2976-1 et 10d les rendant ainsi sensibles à l'acriflavine. De plus, on sait qu'une mutation dans ce gène entraîne une sensibilité à la mitomycine C, ce qui pourrait expliquer la différence de production de phages

Stx1 observée précédemment. En effet, les souches 2976-1 et 10d ont la particularité de produire plus de phages Stx1 que les souches 09QMA277.2 et 09QMA245.2. Les souches 09QMA277.2 et 09QMA245.2 pourraient donc posséder un gène *acrA* sauvage expliquant qu'elles seraient moins inductibles à la mitomycine C.

Pour finir, la production de phages Stx en présence de sels biliaries à 1,5g/l n'a pas pu être quantifiée par PCR en raison d'un effet inhibiteur sur la PCR. En revanche, l'analyse de la densité optique de la culture bactérienne à 600nm, a montré une légère diminution de la densité bactérienne. Ceci suggérerait que les sels biliaries auraient un impact sur la croissance bactérienne ou sur l'induction des phages Stx.

I.3. Conclusion

Durant le processus de fabrication des fromages, les bactéries sont soumises à plusieurs stress. En effet, elles subissent d'abord un stress acide, dû à la production de lactate, qui peut être accompagné d'un stress oxydatif lié à la production de H₂O₂, par d'autres bactéries. A ce stade, les STEC se développent relativement bien. En fin de fabrication, les bactéries sont ensuite soumises au stress salin et leur croissance a, de plus, cessé. Il est donc probable que des phages Stx soient induits durant certaines étapes de fabrication. Ils se retrouvent ainsi libres dans le fromage, et pourraient infecter d'autres bactéries non pathogènes.

En revanche, les facteurs relatifs à la méthode d'isolement des STEC n'entraînent pas de réelle induction des phages Stx mais des variations ont été observées entre les différentes souches testées.

Influence of stress factors related to cheese-making process and to analytical STEC isolation procedure on the induction of Stx phages from STEC O26:H11

BONANNO Ludivine ^{1,2}, DELUBAC Benjamin³, MICHEL Valérie ², AUVRAY Frédéric ^{1*}

¹Université Paris-Est, Anses, Laboratory for Food Safety, Department of Microbiology, Maisons-Alfort, France

²Actalia Produits Laitiers, Laboratoire de microbiologie d'intérêt laitier, La Roche sur Foron, France

³Université Toulouse III, Paul Sabatier, Toulouse, France

*Corresponding author: Frédéric Auvray, Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments, 14 rue Pierre et Marie Curie, 94706 Maisons-Alfort cedex, France. Tel: +33 1 49 77 28 36; Fax: +33 1 49 77 46 66. E-mail: frederic.auvray@anses.fr

Running title: Stress factors on Stx phages induction

ABSTRACT

The producing *Escherichia coli* Shiga toxin (STEC) are responsible for human infections, ranging from mild watery diarrhea to hemorrhagic colitis (CH) may be complicated by hemolytic uremic syndrome (HUS), sometimes fatal. STEC are usually worn by cattle and transmission to humans occurs mainly through the ingestion of contaminated food of animal origin (meat, milk, cheese) and vegetable (salads, sprouts ...). The main STEC virulence factor is Shiga toxin encoded by the *stx* gene, localized in the genome of a bacteriophage integrated into the bacterial chromosome. The serotype O26:H11 was the second serotype causing HUS in the world (after O157:H7), and the first found in dairy product. Although a small number of cases of HUS caused by serotype O26:H11 was identified each year in France, the consumption of raw milk cheeses contaminated with STEC O26:H11 should not be excluded. The aim of this study was to evaluate the induction rate *in vitro* of different Stx phages from three dairy strains of STEC O26:H11 in the presence of various inducing agents, compared to their spontaneous production. The potential inducing agents studied were related to cheese-making process and included H₂O₂, NaCl, lactic acid and temperature. In addition, selective agents from the analytical STEC isolation procedure based on the technical specification XP CEN ISO/TS 13136 were also tested, including novobiocin, acrifavin, cefixim-tellurite and bile salts. Except for H₂O₂, no impact of physico-chemical factors from the cheese-making process was observed on Stx phage induction. The analytical STEC isolation procedure had no effect either except for acrifavin which reduced Stx1 phage production.

INTRODUCTION

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26:H11 were first identified as causes of hemolytic uremic syndrome (HUS) in 1983 (Karmali et al., 1983; Tarr et al., 2005). They correspond to one of the most commonly isolated non-O157:H7 serotype worldwide,

accounting for 12% of all clinical enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) in Europe in 2012 (Zimmerhackl et al., 2010;EFSA, 2014) and for 22% of clinical non-O157 EHEC isolates in the United States between 1983 and 2002 (Brooks et al., 2005). Transmission of STEC O26:H11 to humans occurs through food, water and direct contact with or animals and their environment. In 2005, in France, STEC O26:H11 was involved in an outbreak that included 16 HUS cases and was linked to consumption of contaminated unpasteurized Camembert cheese (Espie et al., 2006). Since the early 2000s, The French institute for public health surveillance (InVS) has observed a significant increase in France in the proportion of reported HUS cases due to non-O157 serogroups, with 11% of HUS cases caused by the serogroup O26 over the period 1996-2013 (InVS, 2013).

Shiga toxin, the main virulence factor of STEC, is encoded by *stx* genes within the genome of a prophage (Stx phages) located in the bacterial chromosome (Smith et al., 1983;O'Brien et al., 1984;Schmidt, 2001). Two Stx groups, Stx1 and Stx2, have been identified, each divided into 3 (a, c and d) and 7 subtypes (a-g), respectively (Scheutz et al., 2012). The first Stx1 phage described was phage H19B which was isolated from a clinical EHEC O26 strain (Smith et al., 1983). Stx phages are inducible from the host strain by DNA-damaging agents such as antibiotics (Kimmitt et al., 2000;Kohler et al., 2000), which trigger the SOS response of *E. coli* (Little and Mount, 1982) and result in the derepression of phage lytic genes, lysis of the bacterial host cells and release of the phage particles. Recently we described the induction of Stx phages from STEC O26:H11 with mitomycin C, and showed that Stx2 phages were more inducible than Stx1 phages (Bonanno et al., 2015).

Exposure of STEC to other stress full agents such as NaCl, temperature, hydrogen peroxide and pH can also lead to Stx prophage activation (Los et al., 2009;Los et al., 2010;Harris et al., 2012;Imamovic and Muniesa, 2012). Stx phage induction in food could result in the presence of free phage particles. The density of Stx phages can reach 1.27×10^4

stx gene copies (GCs) and 2.3×10^3 *stx* GCs in 25 g of food in minced beef and salad, respectively (Imamovic and Muniesa, 2011).

In Europe screening of STEC within the framework of official controls is carried out according to the technical specification XP CEN ISO/TS 13136 (ISO, 2012). This method includes an enrichment step of food samples in the presence of selective agents (such as acriflavin, novobiocin and bile salts) in order to allow the growth of STEC and obtain STEC detectable levels preferentially higher relative to background microorganisms. Imamovic *et al.*, (2011) also demonstrated a significant increase in the densities of Stx phages after incubation in an enrichment culture in average of 3 log₁₀ for 52 to 56% of minced beef samples and 39 to 65% of salad samples (Imamovic and Muniesa, 2011). Presence of free Stx phage might interfere with the analysis of food samples for contamination by STEC. When testing food samples by PCR for the presence of *stx* gene can lead to high amount of *stx*-positive samples which are not confirmed by STEC isolation. In addition, *stx*-negative *E. coli* also named attaching and effacing *E. coli* (AEEC) can be isolated, suggesting a possible loss of Stx phage during the STEC isolation step. Effectively, STEC O26:H11 have the particularity to frequently lose and acquire Stx phages (Karch *et al.*, 1992; Bielaszewska *et al.*, 2007).

In this study, the level of Stx phage induction from three STEC O26:H1 strains was analyzed in conditions related to the cheese-making process and to the analytical STEC isolation procedure. Induction level of Stx phages was quantified by qPCR and compared according to the Stx types Stx1 and Stx2.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains.

Three STEC O26:H11 strains (2976-1, F46-223 and 09QMA277.2), isolated from dairy products and containing *stx1*, *stx2* and both *stx1* and *stx2* genes, respectively, were used in this study. *E. coli* strains were cultivated in Lysogeny broth (LB) at 37°C.

Bacteriophage induction.

An overnight culture of STEC O26:H11 was inoculated at 2% in a fresh LB medium with 5mM of CaCl₂ and incubated at 37°C. At the exponential growth phase (OD₆₀₀ of 0.3), cultures were further incubated at 37°C for 24 h with shaking at 240 rpm, in the presence of inducing agents (listed below). The rate of phage production was evaluated by measuring OD₆₀₀ of induced and non-induced cultures. All cultures were centrifuged at 7,200 x *g* for 10 min, and the supernatants were filtered through low-protein-binding 0.22 µm-pore-size membrane filters (Millex-GP PES; Millipore) for phage purification.

The factors linked to cheese manufacturing studied for their impact on Stx phage induction were lactic acid at 0.05, 0.5, 1.5 and 3%, hydrogen peroxide (H₂O₂) at 0.25 and 3 mM, salt (NaCl) at a final concentration of 3% (taking into account NaCl from the LB broth). The effect of temperature, 9°C and 42°C, was also tested.

Other studied factors related to the analytical STEC isolation procedure included acriflavin (12 mg/l), novobiocin (20 mg/l) and bile salts (1.5 g/l). Finally, the supplement, cefixime-tellurite (C-T; 0.05 mg/l and 2.5 mg/l), used for the isolation of STEC belong the O26 serogroup in the Rhamnose MacConkey agar (RMAC) (Hiramatsu et al., 2002) was also evaluated for its ability to induce Stx phage.

A culture without inducing agent to represent the spontaneous induction of Stx phages was performed as a control. These experiments were performed in duplicate.

Quantification of Stx phage by quantitative PCR.

Filtered supernatants obtained after Stx phage induction were treated with DNase using the Turbo DNA-free™ kit (Ambion®, life technologies) and phage DNA was released by heat treatment for 10 min at 100°C. Quantitative PCR (qPCR) assays targeting *stx1* and *stx2* genes, was then used with the LightCycler® 480 instrument (Roche Diagnostics) as described by Derzelle *et al.* (Derzelle et al., 2011), with minor modifications as follows. The amplification reaction mixture contained 1X LightCycler® 480 Probes Master mix (Roche Diagnostics), 500 nM of each primer (*stx1B*-for, *stx1*-rev, *stx2*-for, *stx2*-rev), and 200 nM of each probe (*stx1*- and *stx2* probes). Three microliter of extracted DNAs were used as templates in qPCR. Linearity and limit of quantification of the qPCR assay was formerly determined by using calibrated suspensions of STEC corresponding to dilutions of pure cultures of *stx1* and *stx2*-positive control EDL933 strain containing both *stx1* and *stx2* genes. The amplification efficiency (E) was calculated using the following equation: $E = 10^{-1/s} - 1$, where *s* is the slope of the linear regression curve obtained by plotting the log genomic copy numbers of *E. coli* strains in the PCR reaction against Ct values. The cycle threshold value (Ct) was defined as the PCR cycle at which the fluorescent signal exceeded the background level. The Ct was determined automatically by the Lightcycler 480 software with the second derivative maximum method and the *stx1* and *stx2* gene copy numbers were calculated from the standard curve.

RESULTS AND DISCUSSION

Four factors related to the cheese manufacturing were selected in this study and tested for their ability to induce Stx phages. Lactic acid (at different concentrations) was used to mimic acid stress provoked by lactic bacteria during the coagulation step. Salt (NaCl) at 3% was tested due to its role in the conservation and flavor enrichment step. Hydrogen peroxide (H₂O₂, at different concentrations) was used to mimic oxidative stress caused by other

bacteria present in the cheese. Finally, the initial milk heating step and final refinement (cooling) step were tested by performing bacterial growth at 42°C and 9°C, respectively.

When STEC were grown in the presence of H₂O₂ 3 mM an increase in the concentrations of Stx phages was observed, i.e. between 0.78 and 1.68 log₁₀ stx genes copies per milliliter (GCs/ml) compared to the spontaneous induction (Table 1). This result was in agreement with previous reports which described the inducing effect of Stx phages by H₂O₂ 3mM (Los et al., 2009; Los et al., 2010).

Interestingly, NaCl 3% induced Stx1 phage from 2976-1 strain by more than 1 log₁₀ GCs/ml compared to uninduced conditions, but this was not the case for the Stx2 phage from F46-226 strain, nor for both Stx1 and Stx2 phages from 09QMA277.2 strain (Table 1). Harris *et al.* described that NaCl 3% inhibited Stx phage induction presumably because of the inhibitory effect of 3% salt on vital physiological processes (Harris et al., 2012). On the other hand, they also demonstrated that the presence of a salt concentration (2%) equivalent to that found in the meat processing process induced Stx phages (Harris et al., 2012). Moreover, Wagner *et al.* demonstrated that Stx1 phages induction could be regulated by RecA-independent pathway and not therefore by the SOS response (Wagner et al., 2002). In this study, Stx phage induction did not occur in the presence of NaCl 3% except for Stx1 phage from 2976-1 strain. Whether this strain uses the alternative RecA-independent induction system remains to be determined. This phenomenon was not observed for the Stx1 phage from 09QMA277.2 which possesses two Stx phage (Stx1 and Stx2). However, when two Stx prophages are integrated into the bacterial chromosome, the production of Shiga-toxin and the activation rate of the lytic cycle of phage each are greatly reduced (Muniesa et al., 2003; Serra-Moreno et al., 2008).

The presence of lactic acid at 0.05% did not result in Stx phage induction and a slight decrease in Stx phage production was even observed with 0.5% lactic acid (Table 1). Moreover, no Stx phages were detected with higher concentrations of lactic acid such as 1.5 and 3% (data not shown). This is in agreement with a previous study by Imamovic et al.

which showed that when the pH is lower than 5.5, inhibition of the induction of Stx phages could be observed, even in the presence of mitomycin C (Imamovic and Muniesa, 2012). In addition, *stx* gene transcription was shown to be very low or nonexistent in pH 5.5 (Olesen and Jespersen, 2010), consistent with Stx phage repression at low pH. This phenomenon could be linked to the RpoS system involved in the survival of bacteria triggered by acid stress (Cheville et al., 1996).

Finally, incubation of STEC at a low temperature (9°C) revealed an important decrease in the amount of Stx phages of -0.71 to -2.16 log₁₀ GCs/ml compared to incubation at 37°C (Table 2). This reduction was higher for Stx2 phages, -1.62 and -2.16 log₁₀ GCs/ml than for Stx1 phage, -0.71 log₁₀ GCs/ml only from 2976-1 strain. However, at 9°C the bacterial growth was slowed (i.e. OD600 decrease of *ca* 0.9 units) which could explain that at this temperature Stx phages production was lower (data not shown).

Similar results were obtained at 42°C but less markedly (Table 2). In fact, the reduction was between -0.28 and -1.36 log₁₀ GCs/ml and is was more pronounced for Stx2 phages. Interestingly, the amount of Stx1 phages from the double lysogenic strain 09QMA277.2 was equivalent for the three conditions of temperature tested (9, 37 and 42°C). A previous study showed that the temperature has an effect on the induction of Stx phage but in the presence of inducing agents such as mitomycin C, UV irradiation and H₂O₂. It was demonstrated that at 30°C, the induction efficiency is lower than 37°C whereas at 43°C, it was considerably increased (Los et al., 2009).

The analytical STEC isolation procedure based on the technical specification XP CEN ISO/TS 13136 relies on the use of several selective agents. Acriflavin (at 12 mg/l) and novobiocin (at 20 mg/l) are used for STEC isolation from cheese and meat, respectively. They are added to the enrichment medium, triptic soy broth (TSB) modified with bile salts at 1.5 g/l (mTSB). Moreover, the supplement cefixime-tellurite (C-T, at 0.05 mg/l and 2.5 mg/l, respectively) is used for the isolation of STEC O26 onto Rhamnose MacConkey agar (CT-

RMAC) (Hiramatsu et al., 2002). This aim of these specific culture media is to allow the enrichment and isolation of STEC from the background microflora. The presence of C-T had no effect on Stx phage induction (Table 1).

It was also the case for novobiocin and acriflavin, with two exceptions. Stx1 phage production from 09QMA277.2 was reduced by $-1.56 \log_{10}$ GCs/ml in the presence of novobiocin compared to spontaneous condition (Table 1). And Stx1 phage production from 2976-1 strain reduced by $-1.06 \log_{10}$ GCs/ml in the presence of acriflavin (Table 1). An additional test performed with two other *stx1*-positive STEC O26:H11 strains (10d and 09QMA245.2) showed also a decrease of Stx1 phage production of $0.93 \log_{10}$ GCs/ml but only for one strain (10d) (data not shown). Distinct genetic backgrounds for strains tested could explain on the differences observed in Stx phage production in response to acriflavin. Acriflavin was shown to induce cell wall changes in *Staphylococcus aureus* (Kawai and Yamagishi, 2009). Moreover, it has the capacity to bind on the cell wall of *E. coli* and the acriflavin-binding capacity was controlled by the *acrA* gene of *Escherichia coli*. A mutation of *acrA* gene leads to sensitivity not only to acriflavin but also to mitomycin C (Nakamura and Shinya, 1985). This observation may suggest differences in *arcA* gene and acriflavin sensitivity in 2976-1 and 10d strains on one hand and 09QMA277.2 and 09QMA245.2 strains on the other hand. Moreover, these differences might also explain the higher production of Stx1 phage observed elsewhere for 2976-1 and 10d strains compared to 09QMA277.2 and 09QMA245.2 strains, in the presence of mitomycin C (Bonanno et al., 2015).

Finally, induction of Stx phage by bile salts at 1.5 g/l could not be not quantified by qPCR due to the inhibition of PCR by bile salts. However, a slight decrease of OD₆₀₀ (of -0.13 to -0.57 units) was observed with bile salts at 1.5 g/l for the three strains tested (data not shown) might suggest induction of Stx phages or simply inhibition of bacterial growth.

Table 1. Stx phage production in the presence of various compounds related to the cheese-making process and analytical STEC isolation procedure.

Induction condition	STEC O26:H11 strain (type of Stx phage)			
	2976-1 (Stx1)	F46-223 (Stx2)	09QMA277.2 (Stx1)	(Stx2)
Spontaneous				
Without inducing agent ^a	5.25	6.70	6.20	6.13
Cheese-making process ^b				
H ₂ O ₂ (3 mM)	+1.68	+1.22	+1.38	+0.78
Lactic acid (0.05%)	+0.18	+0.03	+0.28	+0.21
Lactic acid (0.5%)	-0.39	-1.34	-1.48	-0.98
NaCl (3%)	+1.33	+0.10	+0.43	+0.33
Analytical STEC isolation procedure ^b				
Acriflavin (12 mg/l)	-1.06	+0.53	-0.09	+0.71
Novobiocin (20 mg/l)	+0.10	+0.06	-1.56	+0.15
C-T (0.05 mg/l; 2.5 mg/l) ^c	+0.33	+0.14	-0.11	+0.02

^a Amount of Stx phages production expressed to log₁₀ stx genes copies per milliliter (GCs/ml).

^b Data correspond to the difference between the amount of Stx phages produced in the various tested conditions and the amount of Stx phages produced spontaneously. The results were expressed to log₁₀ stx genes copies per milliliter (GCs/ml).

^c C-T, Cefixime-Tellurite mix at respectively 0.05 mg/l and 2.5 mg/l.

The data were obtained from two independent analyses, and the average copy numbers for each phage DNA are shown.

Table 2. Stx phage production at high (42°C) and low (9°C) temperature.

Temperature condition	STEC O26:H11 strain (type of Stx phage)			
	2976-1 (Stx1)	F46-223 (Stx2)	09QMA277.2 (Stx1)	(Stx2)
Reference temperature				
37°C ^a	5.47	7.69	5.44	7.09
Temperature variation^b				
9°C	-0.71	-2.16	+0.60	-1.62
42°C	-0.28	-1.36	+0.63	-0.71

^a Amount of Stx phages production expressed as $\log_{10}$ stx genes copies per milliliter (GCs/ml).

^b Data correspond to the difference between the amount of Stx phages quantified at the tested low or high temperature with that at the reference temperature. The results were expressed to $\log_{10}$ stx genes copies per milliliter (GCs/ml).

The data were obtained from two independent analyses, and the average copy numbers for each phage DNA are shown.

CONCLUSION

In this study, we demonstrated that oxidative stress that may occur during the cheese-making process could induce Stx phages *in vitro*. Consequently, Stx phages could be present as free particles in cheeses and could infect other *E. coli* strains from the microflora.

Concerning the analytical STEC isolation procedure based on the technical specification XP CEN ISO/TS 13136, no real effect on the Stx phages induction was observed. However, it should be noted that all these factors were tested separately. Combining these factors is therefore needed to conclude about the capacity of the enrichment and isolation steps to induce Stx phages.

Consequently, the presence of AEEC isolated from food samples identified as "stx +" by PCR may not derive from STEC by loss of their Stx phage during the enrichment or isolation procedure.

If AEEC do not derive from STEC during the analytical procedure, another explanation would be that they co-exist in food and that, over the time, or during the analytical process,

AEEC overgrow STEC leading to their isolation to the detriment of STEC. Whether STEC lysis is triggered by Stx phage induction during the analytical procedure and thus contribute to STEC isolation failure should also be investigated.

Moreover, the carriage of Stx phages by non-E.coli species such as *Shigella dysenteriae* type 1, *Shigella sonnei* and occasionally other *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter freundii* and *Enterobacter cloacae*) (Herold et al., 2004) could be responsible for PCR *stx*-positive samples without further confirmation by STEC isolation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Estelle Loukiadis for supplying two STEC O26:H11 dairy product strains and Emeline Cherchame for technical assistance. This work was supported by funds from the Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt and the Association de Coordination Technique pour l'Industrie Agro-alimentaire (UMT-ARMADA). Ludivine Bonanno is the recipient of a doctoral fellowship (CIFRE No. 2012/0975) co-financed by ACTALIA and the Association Nationale de la Recherche Technique (ANRT). This study was also supported by the National Interprofessional Center for the Dairy Economy (CNIEL, Paris).

REFERENCES

- Bielaszewska, M., Prager, R., Kock, R., Mellmann, A., Zhang, W., Tschape, H., Tarr, P.I., and Karch, H. (2007). Shiga toxin gene loss and transfer *in vitro* and *in vivo* during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. *Appl Environ Microbiol* 73, 3144-3150. doi: 10.1128/AEM.02937-06.
- Bonanno, L., Petit, M.A., Loukiadis, E., Michel, V., and Auvray, F. (2015). Induction of Stx phages from STEC O26:H11 isolated from humans and dairy products and infection of *stx*-negative *E. coli* O26:H11. *submitted in Appl. Environ. Microbiol.*
- Brooks, J.T., Sowers, E.G., Wells, J.G., Greene, K.D., Griffin, P.M., Hoekstra, R.M., and Strockbine, N.A. (2005). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J Infect Dis* 192, 1422-1429. doi: 10.1086/466536.

- Cheville, A.M., Arnold, K.W., Buchrieser, C., Cheng, C.M., and Kaspar, C.W. (1996). *rpoS* regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 62, 1822-1824.
- Derzelle, S., Grine, A., Madic, J., de Garam, C.P., Vingadassalon, N., Dilasser, F., Jamet, E., and Auvray, F. (2011). A quantitative PCR assay for the detection and quantification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in minced beef and dairy products. *Int J Food Microbiol* 151, 44-51. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.039.
- EFSA (2014). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA journal* 12, 3547.
- Espie, E., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Pithier, N., Vaillant, V., Francart, S., de Walk, H., and Vernozy-Rozand, C. (2006). "Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurised cows cheese, France 2005", in: *The 6th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) - producing Escherichia coli infections*. (ed.) J. Sofronidis. (Melbourne, Australia).
- Harris, S.M., Yue, W.F., Olsen, S.A., Hu, J., Means, W.J., McCormick, R.J., Du, M., and Zhu, M.J. (2012). Salt at concentrations relevant to meat processing enhances Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol* 159, 186-192. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.007.
- Herold, S., Karch, H., and Schmidt, H. (2004). Shiga toxin-encoding bacteriophages--genomes in motion. *Int J Med Microbiol* 294, 115-121. doi: 10.1016/j.ijmm.2004.06.023.
- Hiramatsu, R., Matsumoto, M., Miwa, Y., Suzuki, Y., Saito, M., and Miyazaki, Y. (2002). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains. *J Clin Microbiol* 40, 922-925.
- Imamovic, L., and Muniesa, M. (2011). Quantification and evaluation of infectivity of shiga toxin-encoding bacteriophages in beef and salad. *Appl Environ Microbiol* 77, 3536-3540. doi: 10.1128/AEM.02703-10.
- Imamovic, L., and Muniesa, M. (2012). Characterizing RecA-independent induction of Shiga toxin2-encoding phages by EDTA treatment. *PLoS One* 7, e32393. doi: 10.1371/journal.pone.0032393.
- InVS (2013). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2013.
- ISO (2012). *ISO/TS 13136:2012, Microbiologie des aliments -- Méthode basée sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments -- Méthode horizontale pour la détection des Escherichia coli producteurs de Shigatoxines (STEC) et la détermination des sérogroupes O157, O111, O26, O103 et O145* [Online]. Available: http://www.iso.org/iso/fr/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=53328 [Accessed].
- Karch, H., Meyer, T., Russmann, H., and Heesemann, J. (1992). Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect Immun* 60, 3464-3467.
- Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M., and Lim, C. (1983). Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1, 619-620.

- Kawai, M., and Yamagishi, J. (2009). Mechanisms of action of acriflavine: electron microscopic study of cell wall changes induced in *Staphylococcus aureus* by acriflavine. *Microbiol Immunol* 53, 481-486. doi: 10.1111/j.1348-0421.2009.00151.x.
- Kimmitt, P.T., Harwood, C.R., and Barer, M.R. (2000). Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg Infect Dis* 6, 458-465. doi: 10.3201/eid0605.000503.
- Kohler, B., Karch, H., and Schmidt, H. (2000). Antibacterials that are used as growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting bacteriophages and Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* strains. *Microbiology* 146 (Pt 5), 1085-1090.
- Little, J.W., and Mount, D.W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* 29, 11-22.
- Los, J.M., Los, M., Wegrzyn, A., and Wegrzyn, G. (2010). Hydrogen peroxide-mediated induction of the Shiga toxin-converting lambdoid prophage ST2-8624 in *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Immunol Med Microbiol* 58, 322-329. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00644.x.
- Los, J.M., Los, M., Wegrzyn, G., and Wegrzyn, A. (2009). Differential efficiency of induction of various lambdoid prophages responsible for production of Shiga toxins in response to different induction agents. *Microb Pathog* 47, 289-298. doi: 10.1016/j.micpath.2009.09.006.
- Muniesa, M., de Simon, M., Prats, G., Ferrer, D., Panella, H., and Jofre, J. (2003). Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak. *Infect Immun* 71, 4554-4562.
- Nakamura, H., and Shinya, T. (1985). Acriflavine-binding capacity controlled by the *acrA* gene of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 131, 1639-1647.
- O'Brien, A.D., Newland, J.W., Miller, S.F., Holmes, R.K., Smith, H.W., and Formal, S.B. (1984). Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* 226, 694-696.
- Olesen, I., and Jespersen, L. (2010). Relative gene transcription and pathogenicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* after long-term adaptation to acid and salt stress. *Int J Food Microbiol* 141, 248-253. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.019.
- Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Pierard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N.A., Melton-Celsa, A.R., Sanchez, M., Persson, S., and O'Brien, A.D. (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol* 50, 2951-2963. doi: 10.1128/JCM.00860-12.
- Schmidt, H. (2001). Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res Microbiol* 152, 687-695.
- Serra-Moreno, R., Jofre, J., and Muniesa, M. (2008). The CI repressors of Shiga toxin-converting prophages are involved in coinfection of *Escherichia coli* strains, which causes a down regulation in the production of Shiga toxin 2. *J Bacteriol* 190, 4722-4735. doi: 10.1128/JB.00069-08.
- Smith, H.W., Green, P., and Parsell, Z. (1983). Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs. *J Gen Microbiol* 129, 3121-3137.

- 400 Tarr, P.I., Gordon, C.A., and Chandler, W.L. (2005). Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*
401 and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 365, 1073-1086. doi: 10.1016/S0140-
402 6736(05)71144-2.
- 403 Wagner, P.L., Livny, J., Neely, M.N., Acheson, D.W., Friedman, D.I., and Waldor, M.K.
404 (2002). Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia*
405 *coli*. *Mol Microbiol* 44, 957-970.
- 406 Zimmerhackl, L.B., Rosales, A., Hofer, J., Riedl, M., Jungraithmayr, T., Mellmann, A.,
407 Bielaszewska, M., and Karch, H. (2010). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*
408 O26:H11-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: Bacteriology and Clinical
409 Presentation. *Semin Thromb Hemost* 36, 586-593. doi: 10.1055/s-0030-1262880.
410

II. Travaux complémentaires de l'article 3

Des travaux complémentaires ont été réalisés en lien avec l'article 3 et dans le cadre du projet STECLAIT dont les partenaires sont : ACTALIA, VetAgroSup, l'INRA d'Aurillac, l'institut de l'élevage et le pôle fromager AOC Massif Central. Ce projet avait pour but d'améliorer les connaissances sur les STEC d'origine laitière : détermination des profils PFGE d'un grand nombre de souches d'origine laitière et non laitière, profil de virulence et comportement en technologie fromagère. Pour ce dernier point, les expérimentations réalisées ont permis de quantifier, *in situ* l'induction des phages Stx libres dans des échantillons de fromages produits à partir de laits artificiellement contaminés par des STEC. Cependant, ces expérimentations ont nécessité de déterminer au préalable le seuil de détection des phages Stx dans les fromages.

II.1. Détermination du seuil de détection des phages Stx dans les fromages

Pour déterminer ce seuil, un fromage au lait pasteurisé (Saint Nectaire) a été artificiellement contaminé par un phage Stx2, issu de la souche 5917/97, à des concentrations connues. Pour cela, 10g de fromage ont été mixés dans un « *waring blendeur* » (mixeur) avec 90ml d'eau peptonée et 1ml de phage Stx2 à diverses concentrations décroissantes, de 10^6 à 10^2 GC/ml (concentrations finales dans le mélange). Les fromages ont été mixés une première fois à vitesse maximale durant 20s puis deux fois à vitesse minimale durant 20s. Deux échantillons pour chaque broyat ont ensuite été prélevés, puis centrifugés à $8000 \times g$ pendant 10min à 4°C et les surnageants ont été récupérés et filtrés sur des membranes à faible rétention des protéines et avec des pores de $0,22\mu\text{m}$ de diamètre (Millex-GP PES ; Millipore). Les filtrats ont ensuite été traités à la DNase avec le kit Turbo-DNA free™ (Ambion®, life technologies) puis l'extraction de l'ADN de phages a été réalisée par un traitement thermique à 100°C pendant 10min. Le dosage des phages Stx2 a ensuite été déterminé grâce à l'amplification du gène *stx2* par PCR quantitative (PCRq) et effectué en duplicat. Les résultats ont montré que le seuil de détection des phages Stx par PCRq se situe à $1,37.10^4$ copies/ml ou $1,37.10^5$ copies/g de fromage.

II.2. Induction des phages Stx durant les phases de transformation et d'affinage d'un fromage

Une première étude visait à suivre le comportement d'un nombre conséquent de souches durant les phases de transformation et d'affinage d'une pâte pressée non cuite (PPNC) de type Saint Nectaire. Ces travaux avaient pour but d'évaluer l'induction des phages Stx de souches STEC dans des échantillons de fromages à PPNC de type Saint Nectaire. Des prélèvements ont été réalisés à différents temps : 24h, 8j et 28j, soit un total de 72 échantillons de fromages analysés (fabrications effectuées en duplicat). Ces fromages ont été fabriqués à partir de lait contaminés par des souches de sérotypes différents : 12 souches de STEC possédant le gène *stx1* et/ou *stx2* dont quatre appartenant au sérotype O26:H11, trois au sérotype O157:H7, trois au sérotype O103:H2, et deux souches d'*E. coli* non-STECS.

Les échantillons de fromages ont été traités selon le protocole suivant : 10g de ces échantillons ont été broyés dans 90ml de milieu mTSB + acriflavine (milieu utilisé dans la méthode de référence XP CEN ISO/TS 13136) et homogénéisés au « *stomacher* » pendant 2min. Un échantillon de broyat a ensuite été prélevé puis centrifugé à 10000 x *g* pendant 10min. Le surnageant est ainsi récupéré et filtré sur une membrane à faible rétention des protéines et avec des pores de 0,22µm de diamètre (Millex-GP PES ; Millipore). Le filtrat a ensuite été traité à la DNase avec le kit Turbo-DNA free™ (Ambion®, life technologies) puis l'extraction de l'ADN de phages a été réalisée par un traitement thermique à 100°C pendant 10min. Le dosage des phages Stx a ensuite été déterminé grâce à l'amplification des gènes *stx1* et *stx2* par PCRq.

Aucun phage Stx n'a été détecté dans les 72 échantillons de fromages (tableau 4). On ne peut exclure toutefois que des phages Stx soient présents mais à de faibles quantités et sous le seuil de détection déterminé précédemment ($1,37 \cdot 10^5$ copies/g de fromage).

Une étape d'enrichissement des suspensions mères d'échantillons de fromages a été réalisée pour ceux contenant des STEC O26:H11 (quatre souches testées dont trois *stx1*+ et une *stx2*+). Cet enrichissement a été effectué dans du milieu mTSB + acriflavine pendant 24h à 37°C. Les phages Stx ont ensuite été récupérés selon la méthode décrite précédemment. Des phages Stx ont été détectés uniquement dans les échantillons de fromages contaminés par la souche *stx2*+, en quantité moyenne de 10^7 copies/ml (tableau 4). Il est important de noter que la souche *stx2*+ utilisée dans cette étude est la souche 21765 issue de l'épidémie de 2005 impliquant des camemberts au lait cru et dont le génome a été récemment séquencée (Espie *et*

al., 2006b, Galia *et al.*, 2015). Aucun phage Stx1 issu des trois souches testées n'a été détecté après l'étape d'enrichissement. Ceci est en accord avec les résultats précédemment obtenus (article 2) et indiquant que les phages Stx2 étaient plus inductibles que les phages Stx1.

En revanche, la réalisation du même type d'analyse à partir d'un échantillon de fromage artificiellement contaminé par une souche STEC O26:H11 (par l'ajout de 10^3 CFU/ml final dans 25g de fromage) n'a pas permis de reproduire cette observation.

Tableau 4. Résultats de la recherche des phages Stx dans des échantillons de fromages

Sérotype STEC	Souche	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	Présence de phages Stx dans les fromages	Présence de phages Stx après une phase d'enrichissement /concentration
O26:H11	21765*	-	+	-	+ → 10^7 copies/ml
	11368*	-	+	-	-
	F15-338 A	+	-	-	-
	M99-6A	+	-	-	-
O157:H7	EDL933*	+	+	-	NT
	LASAT*	+	-	-	NT
	H13	-	+	-	NT
O103:H2	419-133	+	+	-	NT
	32396*	+	+	-	NT
	2217.1A*	+	-	-	NT

NT : non testée ; * : souches utilisées dans la seconde étude

II.3. Impact de la température et du pH sur l'induction des phages Stx dans des modèles fromages

La seconde étude visait à mieux suivre l'effet d'un pH fixe (pH 5,3 et 6,3) et d'une température fixe (22 ou 33°C) durant les 24 premières heures de fabrication d'un modèle fromage à PPNC sur le comportement de quelques souches de STEC et sur l'induction des phages. Des prélèvements ont été réalisés à différents temps : 6h, 24h, 8j et 28j soit un total de 288 échantillons analysés (fabrifications effectuées en triplicat). Cette étude a été réalisée à partir de 6 souches de STEC possédant le gène *stx1* et/ou *stx2*, chaque sérotype testé (O26:H11, O157:H7 et O103:H2) étant représenté par deux souches STEC. Les analyses des modèles fromages issus de cette seconde étude ont été réalisées au laboratoire de microbiologie d'ACTALIA (La Roche) par Marie-Odile Perron (technicienne).

Des phages Stx ont été détectés dans 42 échantillons parmi les 288 testés soit 14,6%, et ceci de manière inconstante entre les différents réplicats. Le tableau 5 indique le nombre d'échantillons pour lesquels des phages Stx ont été détectés ainsi que la concentration des phages. On a constaté que les phages Stx1 étaient plus fréquemment identifiés dans les matrices et surtout à 33°C (température associée à une croissance plus importante des STEC) (données non montrées). En revanche, la mise en évidence de la présence majoritaire de phages Stx1 est biaisée par le choix des souches STEC. En effet, cinq souches STEC possèdent le gène *stx1* contre trois avec le gène *stx2* (généralement en association avec *stx1*).

Tableau 5. Résultats de la recherche des phages Stx dans des échantillons de modèles fromagers

Sérotype STEC	Souche	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	Présence de phages Stx ^a	Concentration de phages Stx ^b
O26:H11	21765	-	+	7/48 (14,6%)	<10 ⁴ à 10 ⁸ copies/ml
	F15-338 A	+	-	3/48 (6,25%)	
O157:H7	EDL933	+	+	15/48 (31,2%) dont 5 <i>stx1</i> + (10,4%) et 10 <i>stx2</i> + (20,8%)	<10 ⁴ à 10 ⁸ copies/ml
	LASAT	+	-	5/48 (10,4%)	
O103:H2	32396	+	+	7/48 (14,6%) seulement <i>stx1</i> +	De 10 ⁴ à 10 ⁹ copies/ml
	2217.1A	+	-	5/48 (10,4%)	

^a Nombre d'échantillons positifs/nombre d'échantillons analysés

^b Seuil de détection : 10⁴ copies/ml

En conclusion de cette étude, l'induction des phages Stx n'est pas systématique, ni constante entre les répétitions des modèles fromagers. Il n'y a pas de réelle différence entre les sérotypes. Le pH et la température ne semblent pas avoir d'effet, excepté à 33°C où l'induction est plus fréquente pour quelques échantillons, en lien avec une meilleure croissance bactérienne. Il serait intéressant de poursuivre l'étude en sélectionnant, en proportion équivalente, des souches STEC possédant un seul des deux gènes *stx* (*stx1* ou *stx2*).