

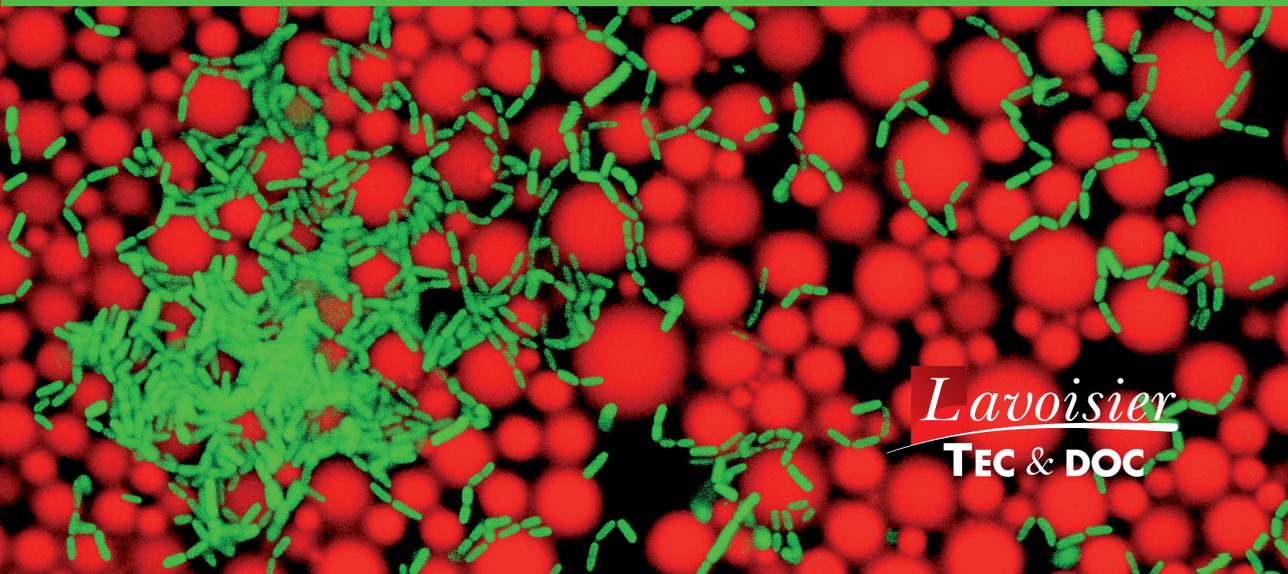
SCIENCES & TECHNIQUES
AGROALIMENTAIRES



Risques microbiologiques alimentaires

MURIELLE NAÏTALI, LAURENT GUILLIER
FLORENCE DUBOIS-BRISSENET

Coordonnateurs



Lavoisier
TEC & DOC



Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines (STEC)

ESTELLE LOUKIADIS

En 1885, le bactériologiste et médecin Theodor Escherich isola et décrit pour la première fois dans les selles de nourrisson un bacille qu'il nomma *Bacterium coli commune*. Castellani et Chalmers proposèrent en 1919 de renommer ce bacille *Escherichia coli*, en l'honneur des travaux d'Escherich (Grimont, 1987).

Escherichia coli constitue l'espèce bactérienne dominante de la microflore anaérobie facultative de l'intestin des animaux à sang chaud (Kaper *et al.*, 2004). Elle est généralement considérée comme une bactérie commensale, inoffensive et constitue le modèle d'étude bactérien le plus courant en laboratoire de recherche. Cependant, certaines souches d'*E. coli* sont devenues pathogènes suite à l'acquisition de gènes de virulence et sont responsables d'infections diverses (Kaper *et al.*, 2004). Parmi ces souches, les *E. coli* entérohémorragiques sont considérés comme des pathogènes majeurs en santé publique. Ils sont en effet responsables d'épidémies parfois de grande envergure et souvent gravissimes. Ils font donc l'objet du présent chapitre.

1. Nature et principales caractéristiques de l'agent pathogène

1.1. Nature et taxonomie de l'agent

E. coli est un bacille de la famille des *Enterobacteriaceae*, à coloration de Gram négative, aéro-anaérobie et pouvant fermenter les nitrates. Ces bactéries sont catalase-positives et ne possèdent pas d'oxydase (Le Minor *et al.*, 1990). Elles fermentent le glucose et habituellement le lactose (coloration rouge/rosée des colonies cultivées sur gélose MacConkey), cependant quelques souches ne possèdent pas cette dernière propriété.

Chez l'Homme, les souches impliquées dans des infections intestinales sont classées en sept « pathotypes », en fonction de leur mode d'interaction avec leur hôte et des signes cliniques associés (Croxen *et al.*, 2013) : les EPEC (*Enteropathogenic E. coli*), les EHEC (*Enterohaemorrhagic E. coli*), les ETEC (*Enterotoxigenic E. coli*), les EIEC (*Enteroinvasive E. coli*), les EAEC (*Enteropathogenic E. coli*), les DAEC (*Diffusely Adherent E. coli*) et récemment les AIEC (*Adherent and Invasive E. coli*) (Strober, 2011). D'autres pathovars sont responsables d'infections extra-intestinales (infections urinaires, méningites...) et sont regroupés sous le terme de ExPEC (*Extra-intestinal Pathogenic E. coli*) (Kaper *et al.*, 2004). Néanmoins, l'émergence de souches « hybrides », possédant des facteurs de virulence

spécifiques de pathotypes différents, telles que la souche EAHEC O104:H4 (*Enteroaggregative Haemorrhagic E. coli*) des épidémies allemandes et françaises de 2011, a montré les limites de cette classification (Beutin et Martin, 2012 ; Mariani-Kurkdjian et Bingen, 2012).

Les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) (également appelés VTEC pour *E. coli* producteurs de vérotoxines) sont définis comme des *E. coli* possédant un gène *stx* codant pour une puissante toxine, la Shiga-toxine (Stx). Cette toxine n'entraîne des symptômes chez l'Homme que si la bactérie qui la produit, après avoir été ingérée, adhère à la muqueuse intestinale de l'hôte : les Shiga-toxines produites par les souches responsables d'épidémies alimentaires ne sont donc pas préformées dans les aliments (Caprioli *et al.*, 2005). Les gènes *stx* présents chez les STEC sont portés par des phages intégrés dans le chromosome (ou prophages) des souches EHEC (Herold *et al.*, 2004). Des prophages codant pour les toxines Stx (dits prophage Stx) ont été identifiés chez *E. coli* mais aussi chez *Shigella dysenteriae* type 1, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* ou *Shigella flexneri* (Herold *et al.*, 2004). Les phages Stx infectieux à l'état libre ont par ailleurs été mis en évidence dans l'environnement et dans les aliments (Muniesa et Jofre, 2004 ; Dumke *et al.*, 2006 ; Imamovic *et al.*, 2009 ; Imamovic et Muniesa, 2011).

Toutes les souches EHEC sont des STEC. En revanche, toutes les souches STEC ne sont pas pathogènes pour l'Homme et ne sont donc pas des EHEC (Caprioli *et al.*, 2005). La figure 17.1 illustre le système de classification actuel des souches d'*E. coli* à partir des signes cliniques et des facteurs de virulence associés.

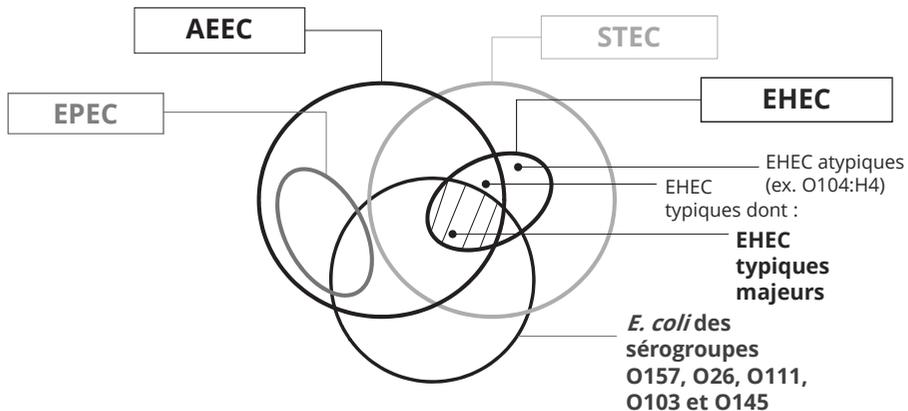


Figure 17.1. Diagramme de Venn illustrant le système de classification actuel des EPEC/EHEC/STEC/AEEC à partir des signes cliniques et des facteurs de virulence associés aux souches d'*E. coli* (adapté d'Afssa, 2010).

Toutes les souches possédant le *locus* d'effacement des entérocytes (LEE), incluant le gène *eae*, quels que soient les signes cliniques associés, appartiennent au groupe des *Attaching and Effacing E. coli* (AEEC). Toutes les souches possédant les gènes codant pour les toxines Stx, quels que soient les signes cliniques associés, sont des STEC. Les souches EPEC sont associées à une diarrhée aqueuse chez l'Homme et sont définies comme des souches possédant le LEE et ne produisant pas de toxine Stx. Les souches EHEC sont associées chez l'Homme à une colite hémorragique et/ou à un syndrome hémolytique et urémique (SHU) et produisent des toxines Stx. La grande majorité des EHEC possède le LEE et ces souches EHEC LEE(+) Stx(+) sont dénommées EHEC typiques. Les souches EHEC typiques appartenant aux sérotypes O157:H7, O26:H11, O111:H8, O103:H2 et O145:H28 (et leurs dérivés non mobiles) sont les souches les plus souvent associées à des signes cliniques graves (SHU) et aux épidémies en France ; elles sont dites souches EHEC typiques majeures.

Le sérotypage permet de distinguer les différentes souches d'*E. coli* grâce à leurs antigènes de surface et, à ce jour, plus de 380 sérotypes de souches STEC ont été décrits chez l'Homme mais aussi chez l'animal (Karmali *et al.*, 2010). Or, seul un petit nombre d'entre eux semble être associé à la majorité des cas humains graves recensés dans le monde. Bien qu'il y ait des

variations en fonction du pays et de l'année, une étude a montré, en 2003, que les sérotypes les plus « à risque » appartiennent aux sérogroupes O26, O91, O103, O111, O113, O121, O145 et O157 (Karmali *et al.*, 2003b). En 2013, à partir des données recensées en Europe entre 2007 et 2010, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESa, ou EFSA en anglais) a montré que les souches STEC les plus « à risque » appartenaient aux sérogroupes O26, O103, O104, O111, O145 et O157. Elle a également souligné que les données étant parcellaires (seules 2 033 souches avaient pu être sérotypées parmi les 13 545 cas étudiés), le risque associé aux autres sérogroupes de souches restait difficile à estimer (EFSA, 2013). La dénomination « 5 sérotypes majeurs » ou « 5 sérotypes les plus à risque » se réfère classiquement aux sérotypes O157, O26, O111, O103 et O145 (*voir* figure 17.1).

1.2. Habitat et réservoir du pathogène

Les ruminants domestiques, notamment les bovins, semblent être les principaux réservoirs des souches STEC pathogènes pour l'Homme, en particulier des souches EHEC O157 (Gyles, 2007). Chez ces animaux, le portage digestif et l'excrétion de souches EHEC sont le plus souvent asymptomatiques, et le contact direct ou indirect avec leurs fèces (souillure fécale d'aliments notamment) constitue la principale voie de contamination de l'Homme. Quelques souches de STEC pathogènes pour l'animal peuvent cependant être pathogènes pour l'Homme telles que les souches EHEC O118 retrouvées chez des veaux présentant de la diarrhée dont la transmission à l'Homme a été démontrée (Beutin *et al.*, 2000).

Des STEC potentiellement pathogènes ont également été retrouvés chez un grand nombre d'autres espèces domestiques ou sauvages telles que le porc, le sanglier, le daim, le cerf, le chien, le lapin, ainsi que chez certains rongeurs, oiseaux et insectes (Ferens et Hovde, 2011). Ceci démontre la capacité des STEC à être disséminés à large échelle dans le règne animal et souligne la multiplicité des voies d'exposition de l'Homme à ces souches. Néanmoins, il convient de noter que certaines souches d'EHEC particulières comme les souches O157:H7 fermentant le sorbitol ou les souches O104:H4, n'ont que très rarement, voire jamais, été isolées d'animaux et que leur réservoir principal semble plutôt être le tube digestif de l'Homme (Karch et Bielaszewska, 2001 ; Wieler *et al.*, 2011).

Bien que toutes les souches de STEC isolées chez l'animal ne soient pas systématiquement des souches EHEC (Mainil et Daube, 2005), seules les données relatives au portage animal de souches STEC existent et permettent d'estimer la prévalence des souches EHEC chez l'animal, notamment chez les bovins. À l'échelle mondiale, le pourcentage de bovins porteurs de STEC varie selon les études et les sérotypes recherchés : entre 0,2 et 48,8 % pour les STEC O157 et entre 0,4 et 75 % pour les STEC non-O157 (Hussein et Sakuma, 2005 ; Hussein, 2007). Les données relatives à la prévalence du gène *stx* doivent être interprétées avec prudence, car elles ne reflètent pas la réelle prévalence des souches STEC, notamment en raison de l'existence de phages *Stx* à l'état libre dans les fèces des bovins (Gyles, 2007).

L'excrétion fécale individuelle des STEC O157 semble soit intermittente et brève suite à un simple passage des bactéries dans le tractus digestif de l'animal, soit prolongée en raison d'une véritable colonisation de la muqueuse digestive par les bactéries (Karmali *et al.*, 2010). Contrairement aux autres individus du troupeau, certains animaux excréteraient dans leurs fèces de grande quantité de STEC ($> 10^4$ UFC par g de fèces) et ce pendant plusieurs semaines (Matthews *et al.*, 2006a, 2006b). Ces animaux sont qualifiés de super-excréteurs. Près de 80 % des transmissions de souches de STEC entre individus au sein d'un même troupeau seraient dues à ces super-excréteurs qui représentent moins de 20 % des animaux (Arthur *et al.*, 2009). Plusieurs autres études (Berry et Wells, 2010) ont confirmé l'importance

du rôle de ces super-excréteurs dans la dissémination et la persistance des STEC pathogènes dans les élevages et donc dans l'augmentation du risque de contamination de l'Homme. Le rôle de ces bovins restent toutefois encore à préciser (Munns *et al.*, 2014).

Des souches de STEC ont été détectées aussi bien chez des bovins de type boucher que de type laitier, même si la prévalence d'animaux porteurs dans cette dernière catégorie semble plus importante. En France, la prévalence des souches STEC appartenant aux sérotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28 chez les jeunes bovins laitiers est de 4,5 % contre seulement 2,4 % chez les jeunes bovins à viande, 1,8 % chez les vaches laitières et 1,0 % chez les vaches de réforme (Bibbal *et al.*, 2015). Cette différence selon les catégories de bovins a été rapportée sur tous les continents, ce qui a permis de proposer des facteurs favorisant l'excrétion des STEC, même si certains restent controversés (Berry et Wells, 2010) : le jeune âge, un régime riche en céréales, le type d'habitat (par exemple le logement des bovins en stabulation), le stress, une taille de troupeau importante et la contamination antérieure par d'autres pathogènes.

De plus, les souches STEC potentiellement pathogènes pour l'Homme peuvent survivre et rester infectieuses dans les fumiers, les lisiers et les sols sur lesquels les déjections animales ont été épandues (Loukiadis, 2007). La fertilisation des pâtures et des sols pourrait être à l'origine, par ruissellement et lessivage des sols, de la contamination des rivières, des lacs et des eaux profondes. Le réservoir environnemental, que ce soit dans le sol, les végétaux, le fumier et le lisier, l'eau, les locaux d'élevages, ou les aliments pour bétail, constitue ainsi un réservoir important de STEC, car il participe à la recontamination des bovins et élargit les modalités de contamination de l'Homme (Berry et Wells, 2010 ; Chekabab *et al.*, 2013).

1.3. Principales caractéristiques physiologiques de croissance

Les STEC, comme la plupart des *E. coli*, sont capables de croître à des températures comprises entre 6 et 46 °C, avec un optimum à 37 °C (40 °C pour *E. coli* O157:H7) (ICMSF, 1996) (tableau 17.I). Leur capacité à se développer à des températures inférieures à 15 °C a été récemment attribuée à des mécanismes génétiques spécifiques à certaines souches pathogènes, notamment O157 (Vidovic *et al.*, 2011).

Le tableau 17.I présente également les autres principales caractéristiques de croissance (pH, a_w , teneur en sel) de la majeure partie des souches d'*E. coli* O157:H7, le sérotype le plus étudié. Il convient néanmoins de noter que les valeurs cardinales présentées dans ce tableau sont des valeurs moyennes obtenues principalement en milieu synthétique de laboratoire (et non dans des matrices complexes, telles que les aliments), en fixant les paramètres non étudiés à leur valeur optimale. Par ailleurs, à ce jour, très peu de données sont disponibles pour les souches non O157:H7, qui pourraient présenter des valeurs cardinales différentes (Afssa, 2003).

Tableau 17.I. Caractéristiques de croissance d'*E. coli* O157:H7 (adapté d'Anses, 2011).

Facteurs environnementaux	Valeurs minimales	Valeurs optimales	Valeurs maximales
Température	6	40	45,5
pH	4,4	7	9
a_w	0,95	0,995	-
NaCl (%)	-	0	8,5

- : sans objet

1.4. Caractéristiques de résistance aux traitements de stabilisation et de destruction

La plupart des études de survie ont été réalisées chez les STEC O157:H7. Les souches non-O157 présentent probablement une résistance similaire aux STEC O157 dans la mesure où ces deux types de souches ont été retrouvés dans des aliments ayant subi des traitements identiques (Hussein, 2007 ; Baylis, 2009). Le tableau 17.II présente quelques données relatives à l'efficacité de traitements d'inactivation d'*E. coli* O157:H7.

Tableau 17.II. Traitements d'inactivation en milieu industriel d'*E. coli* O157:H7 (adapté d'Anses, 2011).

Désinfectants
Sensibles à tous les désinfectants autorisés en IAA, sous réserve de suivre les recommandations d'utilisation. Traitement avec des solutions d'hypochlorite de sodium : - salade : 20 ppm de chlore actif pendant 2 min → moins d'une réduction décimale ; - myrtilles : 1,7 mg.L ⁻¹ d'eau → 1,3 réduction décimale ; - pommes : 22 mg.L ⁻¹ d'eau → 2,6 réductions décimales. Pour les végétaux, l'efficacité des biocides (ozone, chlore, etc.) se limite à leur surface (aucun effet sur les bactéries qui se trouvent à l'intérieur des tissus).
Effet de la température
$D_{60} = 0,5$ à 3 min* et $z_T = 3,5$ à 7 °C** Remarque : la teneur en matière grasse des produits carnés augmente la thermorésistance.
Ionisation
Viande de bœuf : 2 kGy → 5 réductions décimales Salade : 1,5 kGy → 4 réductions décimales Épinards : 1,5 kGy → 3 réductions décimales
UV (253,7 nm)
Salade : 24 mJ/cm ² → 2,8 réductions décimales
Hautes pressions
Graines de luzerne (alfalfa) : 650 MPa ; 15 min à 20 °C → environ 5 réductions décimales Salami : 600 MPa ; 3 min → environ 4 réductions décimales

* D_T est le temps nécessaire, à la température T (°C), pour diviser par 10 la population du danger microbiologique initialement présente.

** z_T est l'écart de température (°C) correspondant à une variation d'un facteur 10 du temps de réduction décimale (D_T).

Les souches STEC ne sont pas particulièrement thermorésistantes dans des conditions de neutralité de pH et d'activité de l'eau élevée ($a_w = 0,95$) (Kaur *et al.*, 1998), et la valeur de quelques paramètres dans différentes matrices alimentaires a été synthétisée (Afssa, 2003). L'établissement de barèmes thermiques de sécurité vis-à-vis des STEC doit tenir compte à la fois des caractéristiques de la matrice (pH, a_w , teneur en lipides...) ainsi que de l'état physiologique des souches présentes dans l'aliment avant l'application du traitement (chocs thermiques, acides...) (Afssa, 2003) (*voir* chapitre 3). Ces facteurs peuvent en effet considérablement modifier l'efficacité d'un barème thermique ; par exemple, un traitement thermique à 72 °C pendant 15 s va conduire à des réductions comprises entre 0,5 et 2 log₁₀ de la concentration en fonction des caractéristiques de la matrice et/ou des souches (Van Asselt et Zwietering, 2006). Les STEC O157:H7 peuvent survivre pendant plusieurs semaines à -18/-20 °C dans des produits congelés (viande, fruits, jus de fruits, glaces) et un simple traitement de congélation/décongélation n'entraînant que de faibles

réductions des populations, ne peut être considéré comme une stratégie de maîtrise des STEC en l'absence d'autres traitements assainissants (Farrokh *et al.*, 2013).

Certaines souches STEC pathogènes se distinguent des autres *E. coli* par une capacité de survie bien supérieure en conditions acides (pH < 2,5) (produits carnés ou laitiers fermentés, jus de fruits, mayonnaise, salade de choux et même vinaigre) (Farrokh *et al.*, 2013). L'acido-résistance varie considérablement en fonction des souches, du type d'acide utilisé et de leur concentration, et des caractéristiques de la matrice étudiée : comme pour de nombreuses souches (*voir* chapitre 2), les acides organiques inhibent davantage les STEC que les acides minéraux (Dunière, 2012). La résistance à l'acide dépend aussi de la présence simultanée d'additifs alimentaires : le sel, par exemple, favoriserait l'acido-résistance des souches O157:H45 (Casey et Condon, 2002). Les additifs tels que l'acide sorbique sont autorisés dans les aliments sous certaines conditions, notamment de concentration. L'utilisation de certains acides organiques et composés chlorés pour la décontamination de surface des viandes et des végétaux par aspersion ou fumigation est également documentée, en particulier pour les souches d'*E. coli* O157:H7 (Berry et Wells, 2010) mais elle est soumise à une autorisation préalable : la décontamination des viandes rouges par des sprays d'acide lactique, acétique ou citrique est par exemple autorisée aux États-Unis mais pas en Europe.

L'action d'autres produits utilisés comme conservateurs ou d'autres additifs alimentaires sur la survie des STEC est également documentée et une synthèse est proposée par l'Afssa (2003). L'activité antimicrobienne du nitrite de sodium semble fortement dépendante du pH et est d'autant plus élevée que la température de conservation est basse. Les bactéricines produites par les bactéries présentes dans l'aliment présenteraient également un effet antimicrobien sur les STEC (Dunière, 2012). Enfin, un certain nombre de substances extraites de plantes, dont l'ail, le thym, ou d'épices comme le clou de girofle possèdent un effet bactériostatique ou bactéricide avéré (Afssa, 2003 ; Pei *et al.*, 2009) mais les doses nécessaires doivent être compatibles avec la préservation des propriétés organoleptiques des aliments et/ou le coût de l'application de ce type de traitement.

En ce qui concerne les procédés physiques de décontamination des aliments (Afssa, 2003), l'efficacité des traitements ionisants sur l'inactivation des STEC O157 a été démontrée, en particulier sur les surfaces des fruits frais et des légumes (dose de 0,2 à 0,8 kGy). L'application de rayonnements ionisants pour le traitement des viandes de bœuf est autorisée aux États-Unis depuis 1997 sous réserve de mention dans l'étiquetage, mais pas en Europe à ce jour (<http://www.fsis.usda.gov/Oa/topics/hotboned.htm>). Les traitements par ultraviolets sont, quant à eux, largement utilisés pour la désinfection des eaux mais il existe des différences de sensibilité, et des doses de 400 J.m⁻² apparaissent nécessaires pour obtenir un nombre de réductions de la population suffisant. Par ailleurs, les STEC sont inactivés dans les aliments traités par des hautes pressions, l'efficacité étant toujours nettement accrue lorsque la température d'application est portée à 50 °C (par exemple, près de 6 réductions décimales de *E. coli* O157:H7 NCTC 12079 sont obtenues dans du lait UHT ou dans du poulet avec un traitement de 400 MPa à 50 °C pendant 15 min) (Patterson et Kilpatrick, 1998) ; ce type de traitement est actuellement utilisé dans différents pays y compris en Europe pour des jus de fruits, jambon, yaourts, guacamole... (Afssa, 2003).

Enfin, les STEC O157:H7 ne montrent pas de résistance particulière aux désinfectants et semblent avoir une sensibilité proche d'autres *E. coli* et d'autres bactéries pathogènes comme *Salmonella enterica*. Ils semblent de plus présenter une plus faible capacité à coloniser des surfaces que d'autres bactéries formant des biofilms telles que *Listeria monocytogenes* (Farrokh *et al.*, 2013) (*voir* chapitres 5 et 19).

2. Mode de transmission à l'Homme par l'aliment

2.1. Principaux aliments impliqués et prévalence

La principale voie de transmission des STEC à l'Homme est l'ingestion d'aliments contaminés, mais une contamination résultant du contact avec des animaux porteurs et excréteurs de ces bactéries ou leur environnement, de l'ingestion d'eau contaminée ou une transmission interhumaine féco-orale ont également été rapportées. Le tube digestif des bovins étant le principal réservoir naturel des STEC pathogènes, la contamination des aliments est la plupart du temps liée à une contamination fécale, le plus souvent à l'abattoir ou lors de la traite lorsque l'hygiène n'est pas maîtrisée. Les végétaux peuvent également être contaminés par des effluents ou de l'eau contaminée par des déjections animales (Caprioli *et al.*, 2005).

Les principaux aliments à risque ont été identifiés à partir des données épidémiologiques mondiales disponibles (Caprioli *et al.*, 2005). Ce sont :

- les viandes crues ou peu cuites de bœuf et éventuellement d'autres ruminants ;
- le lait cru et les produits au lait cru ;
- les produits végétaux crus ou peu cuits.

Notons que ces dernières années, d'autres types d'aliments ont également été mis en cause (chou fermenté, pâte à cookies crue, glace artisanale, farine utilisée pour la production de mini-pizzas...) (Batz *et al.*, 2012).

Une synthèse relativement récente de la bibliographie internationale (Hussein, 2007) montre que les prévalences mondiales dans les viandes crues de bœuf, des STEC O157 et des STEC non-O157, varient entre 0,1 et 54,2 % et entre 2,4 et 30 % respectivement, selon les études. Les données obtenues restent difficilement comparables, car les plans d'échantillonnage choisis, les types de souches recherchées et les méthodes de détection utilisées diffèrent. Notamment, certaines études se limitent à une estimation de la prévalence des STEC à partir de la seule détection du gène *stx* dans l'aliment et proposent donc des valeurs de prévalence largement supérieures aux études qui estiment cette prévalence à partir du nombre de souches STEC effectivement isolées ; c'est cette dernière approche qui a d'ailleurs été retenue à l'échelon international, la détection étant basée sur la spécification technique (TS) de l'ISO (*International Organisation for Standardization*), ISO/TS 13136:2012 (*voir* paragraphe 2.2.2). En France, le taux de contamination des viandes de bœuf par des souches STEC appartenant aux sérotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O145:H28 et O111:H8 est faible (compris entre 0 et 0,5 %) et comparable quel que soit le type de produit étudié (viandes surgelées ou réfrigérées, prélevées à la distribution ou à la production). Parmi les 38 souches STEC isolées de ces viandes entre 2005 et 2011, la majorité appartient au sérotype O26:H11 puis, par ordre d'importance, aux sérotypes O157:H7, O103:H2, O145:H28 et O111:H8 (Loukiadis *et al.*, 2012).

La consommation de lait cru et de fromages au lait cru de vache, de brebis et de chèvre a également été à l'origine de plusieurs épidémies dans le monde (Baylis, 2009). La prévalence des STEC dans le lait cru varie généralement entre 0 et 2 % (Farrokh *et al.*, 2013). Cette prévalence semble plus élevée lorsque les filtres des tanks sont analysés plutôt que les laits eux-mêmes (Van Kessel *et al.*, 2001). Elle peut également varier en fonction du type de fromage analysé puisque les techniques de fabrication utilisées ont un impact sur la survie et la croissance des STEC dans les fromages (Miszczycha *et al.*, 2013). La prévalence des

souches STEC O157 et non-O157 dans des fromages au lait cru en Europe varie entre 0 et 7,8 %, et 0 et 13,1 % respectivement selon les études (Farrokh *et al.*, 2013). En France, le taux de contamination des fromages au lait cru par des souches STEC appartenant aux 5 sérotypes les plus « à risque » semble faible ($\leq 0,9$ %) (Loukiadis *et al.*, 2012). Parmi les 17 souches STEC isolées entre 2005 et 2011, la majorité appartient au sérotype O26:H11. Les sérotypes les plus fréquemment retrouvés sont ensuite O103:H2, O145:H28 et O157:H7 (Loukiadis *et al.*, 2012).

Un grand nombre des légumes et des fruits contaminés au champ, pendant leur récolte ou leur préparation et consommés crus, a été incriminé dans des cas humains (Park *et al.*, 2012). La consommation de graines germées contaminées, bien qu'ayant déjà été pointée du doigt, notamment au Japon (Mermin et Griffin, 1999), a été à l'origine en 2011 de la plus grande épidémie recensée en Europe (Beutin et Martin, 2012). Des souches STEC ont été mises en évidence dans les tissus internes des graines, et la désinfection de leur surface avant consommation n'a donc pas été suffisante. D'autres types de produits végétaux tels que les salades, les pousses d'épinards, le coleslaw mais également les jus de fruits non pasteurisés, ont également été impliqués (Caprioli *et al.*, 2005). La prévalence des STEC dans les végétaux semble cependant très faible (EFSA, 2011) et, à ce jour, en France, aucune souche appartenant aux 5 sérogroupes les plus « à risque » n'a été identifiée au cours des plans de surveillance (Loukiadis *et al.*, 2012). Néanmoins, il convient d'être prudent quant à l'interprétation de ces résultats, car il a été montré que les végétaux contiennent en général un niveau élevé de flore annexe (Tzschoppe *et al.*, 2012), ce qui pourrait représenter un biais analytique important.

2.2. Surveillance dans les aliments

2.2.1. Organisation de la surveillance en Europe

Tous les exploitants du secteur alimentaire veillent au respect des règles générales d'hygiène, depuis la production primaire jusqu'à la vente ou la mise à disposition des aliments au consommateur final (règlement européen (CE) n° 852/2004 (CE, 2004a) et aucune denrée alimentaire préjudiciable à la santé ne peut être mise sur le marché (règlement européen (CE) n° 178/2002 (CE, 2002)). En ce qui concerne les analyses microbiologiques des aliments, les professionnels intègrent dans leur plan d'autocontrôles les critères définis dans le règlement (CE) n° 2073/2005 (CE, 2005). Pourtant, ce règlement ne prévoit de critère relatif aux STEC que dans les graines germées (critère récemment introduit par le règlement modificatif (UE) n° 209/2013 (UE, 2013)), car c'est bien la maîtrise préventive de l'hygiène des procédés à toutes les étapes de la chaîne alimentaire, et le plus en amont possible, qui permet de réduire la contamination des aliments. En particulier, la prévention des contaminations fécales à l'abattoir reste essentielle. Le plan d'autocontrôles défini par un exploitant s'intègre dans une démarche préventive de la maîtrise de la sécurité sanitaire des denrées, et ne doit pas se limiter à des contrôles *a posteriori* sur les produits finis. Néanmoins, compte tenu de la faible fréquence de contamination par des souches STEC pathogènes (comprise, en France, entre 0 et 0,5 % pour les viandes de bœuf et inférieure à 0,9 % pour les fromages au lait cru) et des limites de détection des plans d'échantillonnage (voir chapitre 12), la gestion des contaminations détectées dans le cadre des autocontrôles a pour principal objectif de limiter le risque d'apparition d'épidémies et non de maîtriser les contaminations plus faibles à l'origine de cas sporadiques. Néanmoins, même si la

présence de STEC pathogènes dans un aliment n'est pas corrélée aux concentrations des indicateurs microbiens usuels, l'application des critères d'hygiène des procédés doit permettre la maîtrise de l'hygiène et particulièrement celle d'une éventuelle contamination fécale (Anses, 2011). Il n'existe, à l'heure actuelle, pas de meilleur indicateur d'hygiène des procédés pour suivre la contamination fécale que celui concernant *E. coli* (possédant une bêta-glucuronidase et se développant à 44 °C), tel que défini dans le règlement (CE) n° 2073/2005 modifié.

Les contrôles officiels permettent quant à eux de vérifier et d'assurer le respect des législations européennes relatives à l'application des bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*, règlement (CE) n° 882/2004 (CE, 2004b)). Ils sont effectués régulièrement, à n'importe quel stade de la production, de la transformation et de la distribution des aliments. Des plans de surveillance et de contrôle sont ainsi programmés annuellement en France. Outre la pression de contrôle exercée sur les filières, ces plans permettent d'estimer les niveaux de contamination des aliments et d'identifier des facteurs de risque potentiels. Ils sont toutefois limités en nombre d'analyses et ne permettent pas d'assurer, à eux seuls, la sécurité des aliments mis sur le marché (Loukiadis *et al.*, 2012).

Compte tenu de la gravité des infections liées à ces bactéries, tout aliment contaminé par une souche STEC pathogène doit être considéré comme préjudiciable à la santé humaine (règlement (CE) n° 852 (CE 2004a)), ce qui conduit à la mise en place de mesures de gestion proportionnées au risque (retrait, rappel, destruction ou traitement thermique assainissant des lots contaminés, révision des plans de maîtrise sanitaire), en tenant compte des conditions d'utilisation prévisibles par le consommateur. Les mesures de gestion reposent donc sur un ensemble d'informations disponibles relatives au produit, à l'utilisation prévisible par le consommateur, à la situation épidémiologique des cas humains au niveau national et international.

2.2.2. Méthodes de détection des STEC

En ce qui concerne les méthodes d'analyses pour la recherche des STEC dans les aliments, la méthode de référence ISO 16654:2001 pour la recherche des souches STEC O157 dans les aliments (ISO, 2001) était la seule méthode harmonisée disponible jusqu'à très récemment, en 2012. Cette méthode culturale repose sur l'utilisation de billes magnétiques recouvertes d'anticorps dirigés contre les antigènes somatiques O157 pour capturer et concentrer les bactéries présentant ces antigènes et potentiellement présentes dans le bouillon de culture d'une prise d'essai alimentaire, préalablement incubé à 41,5 °C (température optimale des *E. coli* O157). Les bactéries ainsi capturées sont ensuite cultivées sur une gélose MacConkey contenant du sorbitol à la place du lactose (milieu SMAC). Les *E. coli* O157 forment en effet sur ce milieu des colonies brun/beige (car ne fermentent pas le sorbitol) alors que les autres *E. coli* apparaissent en rouge/rose. Cependant, cette méthode ne permet pas de retrouver certains clones O157:H7 fermentant le sorbitol ainsi que les souches STEC non-O157 pourtant responsables d'affections humaines sévères (Karmali *et al.*, 2010).

Aussi, la Commission européenne a chargé le Comité européen de normalisation (CEN) de développer une méthode de référence harmonisée pour la détection des souches STEC dans les aliments et les aliments pour animaux : une première version de cette méthode visant à rechercher les souches STEC identifiées par l'AESA comme les plus fréquemment impliquées dans les cas sévères (*i.e.* appartenant aux 5 sérotypes les plus « à risque ») a été finalisée en 2008. Suite à la survenue en 2011 en Allemagne et en France de l'épidémie alimentaire due à des souches STEC O104:H4, le champ d'application de cette méthode a

été revu et élargi à la recherche de toutes les souches STEC (quelles que soient leurs autres caractéristiques). Le document final a été approuvé et publié par l'ISO en novembre 2012 en tant que spécification technique, ISO/TS 13136 (ISO, 2012). Cette spécification technique repose sur une approche séquentielle pour la recherche des STEC dans les aliments. Aux États-Unis, la méthode officielle pour la recherche des souches STEC non-O157 dans les viandes et les produits carnés, officialisée par la *Food and Drug Administration* (FDA) en janvier 2010, adopte la même démarche séquentielle avec les mêmes étapes que la spécification technique mais cible une liste précise de sérogroupes : les sérogroupes non-O157 les plus « à risque » (O26, O111, O103 et O145) et 2 sérogroupes supplémentaires, car responsables de cas humains aux États-Unis, O45 et O121.

Dans ces démarches séquentielles :

- la première étape du dépistage consiste en une phase d'enrichissement de la prise d'essai de l'aliment investigué, permettant aux souches de STEC éventuellement présentes de se multiplier jusqu'à atteindre des niveaux détectables, et de façon préférentielle par rapport aux autres microorganismes présents dans ces matrices. Cette étape est une étape clé pour la détection des STEC dans les aliments, car elle conditionne toutes les étapes suivantes. Or, comme le soulignent différents rapports de l'EFSA (EFSA, 2009), la recherche des STEC dans les aliments est délicate, principalement en raison de la diversité des matrices alimentaires susceptibles d'être contaminées (diversité physico-chimique et microbiologique), de la diversité des sérogroupes de STEC recherchés, et de l'absence de caractéristiques biochimiques communes permettant de les distinguer sans ambiguïté des autres *E. coli* non pathogènes. De plus, la faible quantité et le faible ratio des STEC par rapport aux autres bactéries dans les produits alimentaires nécessitent une phase d'enrichissement optimale de manière à éviter les résultats faussement négatifs ;
- suit ensuite une étape de détection par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (q-PCR) du principal gène de virulence des STEC, le gène *stx*. Si ce gène est détecté, d'autres étapes de détection par q-PCR pour la recherche du gène *eae* (un des gènes d'adhésion à l'épithélium intestinal) et des 5 sérogroupes majeurs peuvent être entreprises afin de préciser le danger et aider au choix des étapes ultérieures (recours à une étape d'immunoséparation magnétique, choix des milieux de culture utilisés). Or, la détection de gènes dans un bouillon d'enrichissement d'une matrice alimentaire n'est pas suffisante pour prendre une décision quant à la dangerosité des aliments analysés, car elle ne conduit qu'à une conjecture (détection de gènes dans le bouillon d'enrichissement de l'aliment étudié *i.e.* dans l'ensemble des ADN des microorganismes et virus présents) et seule une confirmation par l'isolement d'une souche STEC permet d'affirmer la présence d'un danger avéré ;
- l'étape de confirmation par isolement peut faire appel, lorsque la présence de souche appartenant à certains sérogroupes est suspectée (O26, O45, O111, O103, O121, O145 et O157), à des techniques d'immunoséparation (IMS) préalables (kits commerciaux disponibles). Cette technique ne permet pas de capturer les souches *rough* (rugueuses), cependant ce type de souches a en général perdu son pouvoir pathogène et est rapidement phagocyté. Le choix du milieu de culture pour l'isolement des souches non-O157 reste un véritable challenge dans la mesure de l'absence de caractéristiques biochimiques communes distinctes des autres *E. coli*, qui permettraient l'utilisation de milieux d'isollements sélectifs et chromogènes. Plusieurs milieux d'isolement alternatifs ont cependant été proposés tels que la gélose « entérohémolyse » (Beutin *et al.*, 1989), les milieux décrits par Possé *et al.* (2008), le milieu Rainbow® O157 agar additionné de céfixime et tellurite (Tillman *et al.*, 2012) ou la gélose commerciale

CHROMagar™ STEC (Gouali *et al.*, 2013). Il convient néanmoins de noter qu'aucun de ces milieux ne permet à lui seul de retrouver l'ensemble des souches EHEC éventuellement présentes, y compris au sein des groupes de souches ciblées (Bielaszewska *et al.*, 2005 ; Gouali *et al.*, 2013 ; Kérangart *et al.*, 2016). Enfin, la mise en œuvre de la technique d'hybridation sur colonies est également rapportée mais reste à ce jour l'apanage de quelques laboratoires spécialisés (Cobbold et Desmarchelier, 2001). Les colonies ainsi sélectionnées sont ensuite testées en PCR pour la présence du gène *stx* et éventuellement des autres gènes préalablement détectés dans le bouillon d'enrichissement afin de confirmer la présence d'un danger avéré dans l'aliment testé. À noter que le faible nombre d'échantillons suspects véritablement confirmés rapportés dans la littérature (Hussein et Sakuma, 2005 ; Hussein, 2007) pourrait s'expliquer soit par le non-isolément des souches STEC présentes, soit par le fait que les signaux positifs en PCR étaient dus à des phages Stx, à des bactéries mortes, ou à des bactéries différentes portant chacune et séparément les gènes détectés en PCR lorsque l'on recherchait conjointement les gènes *stx* et *eae*.

2.3. Moyens de maîtrise et bonnes pratiques d'hygiène

La maîtrise du danger que représentent les STEC pathogènes, notamment dans les aliments, implique la mise en place de stratégies de contrôle « de la fourche à la fourchette ». Des appréciations quantitatives du risque et des modèles de simulation décrivant les différentes étapes tout au long de la chaîne alimentaire sont disponibles et permettent d'identifier les facteurs de risque et les moyens de prévention possibles (Ebel *et al.*, 2004 ; Afssa, 2007 ; Park *et al.*, 2012) (*voir* chapitre 14).

2.3.1. Stratégies de prévention lors de l'élevage

Le contrôle des STEC chez les animaux, en particulier chez les bovins, présente l'avantage de réduire en amont, à l'échelon de la ferme, non seulement le risque de contamination des carcasses à l'abattoir mais également le risque d'exposition de l'Homme aux STEC par contact direct avec les animaux, leur environnement ou par l'ingestion de végétaux ou d'eau contaminés.

Une stratégie globale de contrôle visant à réduire la fréquence et l'intensité de l'excrétion fécale du pathogène par le bétail en ciblant les sources environnementales de « recontamination » par transmission oro-fécale des animaux peut être mise en place. Le respect des bonnes pratiques d'élevage conduit à limiter la transmission des pathogènes entériques en général et non spécifiquement celle des STEC pathogènes. Néanmoins, aucun impact significatif de pratiques d'élevage particulières, comme l'influence du régime alimentaire (notamment le type de céréales, les qualités ou la méthode de conservation des aliments pour animaux) ou le respect d'une période de jeûne avant abattage, sur l'excrétion spécifique des STEC O157, n'a pu être mis en évidence à ce jour (Ferens et Hovde, 2011).

Dans l'optique d'augmenter la résistance des animaux à l'infection, le recours aux probiotiques, à la vaccination, aux antimicrobiens, au chlorate de sodium ou aux bactériophages, a été envisagé. L'administration de probiotiques semble associée à une diminution de la survie de *E. coli* O157:H7 dans le tractus digestif des bovins : la combinaison de *Lactobacillus acidophilus* NP51 et de *Propionibacterium freundenreichii* fait par exemple l'objet d'un brevet commercial aux États-Unis. Mais leur emploi semble devoir être adapté à l'âge des

animaux et à leur régime alimentaire (Karmali *et al.*, 2010). Une méta-analyse des données disponibles montre que la vaccination semble une stratégie de maîtrise efficace pour limiter la colonisation de l'intestin de bovins par des *E. coli* O157:H7 (Varela *et al.*, 2013) et deux vaccins sont commercialisés à ce jour. Néanmoins, la dose ainsi que la fréquence d'administration restent des paramètres importants à maîtriser. Par ailleurs, l'efficacité de ces vaccins dans la prévention de la colonisation des bovins par des souches non-O157 reste à déterminer (Karmali *et al.*, 2010). L'effet de l'administration d'antimicrobiens a également été étudié chez les bovins : l'utilisation de sulfate de néomycine semble par exemple réduire l'excrétion de STEC O157:H7 (Woerner *et al.*, 2006). Mais l'utilisation de cet antibiotique dans l'alimentation des bovins n'est pas autorisée du fait du risque de développement d'antibiorésistance bactérienne (Karmali *et al.*, 2010). L'ajout de chlorate de sodium dans l'eau ou les aliments du bétail semble également efficace (Sargeant *et al.*, 2007 ; Berry et Wells, 2010). Enfin, l'activité lytique de différents phages envers des STEC d'origine bovine ou humaine a été démontrée (Niu *et al.*, 2009). Nombre de résultats ont été obtenus *in vitro* et des études restent nécessaires pour valider l'utilisation de phages comme stratégie de prévention du portage sain chez les bovins (EFSA, 2009 ; Rivas *et al.*, 2010). Enfin, il convient de rester prudent quant à l'utilisation des phages puisque leur devenir dans l'environnement et au contact des autres microorganismes ne peut être totalement maîtrisé.

2.3.2. Stratégies à l'abattoir et lors de la traite

La corrélation entre la présence de STEC dans les fèces des bovins et la contamination des cuirs et des carcasses à l'abattoir a été démontrée (Elder *et al.*, 2000). Des stratégies de maîtrise fondées sur une analyse HACCP des procédures d'abattage ainsi que l'application de bonnes pratiques d'hygiène permettent de réduire le risque de contamination fécale des carcasses. Certaines pratiques peuvent être citées comme par exemple : le contrôle de l'état de propreté des animaux avant abattage mis en place en France pour limiter les contaminations croisées entre animaux sales et propres ; l'utilisation d'équipements d'arrachage des cuirs conçus pour limiter les contaminations croisées ; la bonne formation des personnels aux opérations de ligature de l'œsophage et d'ensachage du rectum avant éviscération digestive et bien sûr le parage voire le déclassement des carcasses en cas d'accident d'éviscération majeur (CIV, 2012)... De nombreux traitements de décontamination ont également été décrits sur le cuir, les carcasses ou les minerais (mélange de muscles et de graisse issu de la découpe des carcasses et du désossage) tels que le lavage avec des substances chimiques ou antimicrobiennes, la pasteurisation par la vapeur, l'irradiation gamma... (Koohmaraie *et al.*, 2005).

En ce qui concerne la prévention de la contamination des produits laitiers par les STEC, il n'y a pas de mesures de maîtrise absolue hormis la pasteurisation (Farrokh *et al.*, 2013). Pour les produits au lait cru, la principale stratégie de limitation du risque repose sur une bonne hygiène de la traite, en particulier de l'équipement mais aussi des trayons de l'animal. Néanmoins, la flore naturelle située sur la peau des trayons intervient dans la qualité organoleptique de certains fromages au lait cru, et une destruction non maîtrisée de toutes les flores microbiennes n'est pas envisageable. D'autres mesures sont également citées comme la conservation du lait à moins de 8 °C dans des réservoirs, ou l'utilisation du lait pour la fabrication du fromage moins de 18 h après la traite (Farrokh *et al.*, 2013). Certains procédés technologiques comme la microfiltration permettent de réduire le niveau de contamination des fromages mais doivent être adaptés aux technologies de fabrication utilisées (Farrokh *et al.*, 2013). Enfin, il convient de noter qu'au cours de la fabrication des fromages, ni

l'acidification (pH final), ni la présence de flores compétitives, ni même un temps d'affinage long ne suffisent à éliminer les STEC présents dans les laits (Miszczycha *et al.*, 2013).

Ainsi, aucune stratégie spécifique ne permet d'éliminer les STEC dans les denrées mais la combinaison des « effets barrières » de plusieurs d'entre elles permet de réduire sensiblement le risque de contamination des aliments par ces pathogènes (Farrokh *et al.*, 2013).

2.3.3. Stratégies à la distribution et chez le consommateur

Les réglementations sanitaires de nombreux pays donnent des prescriptions en termes de barèmes de cuisson, de respect de la chaîne du froid et de bonnes pratiques d'hygiène à la distribution comme en restauration collective (Karmali *et al.*, 2010). Chez le consommateur, certaines pratiques de conservation, de préparation et de consommation des aliments ont été identifiées comme particulièrement à risque, comme l'utilisation de la même planche à découper pour parer de la viande crue et des légumes destinés à être consommés crus (Redmond et Griffith, 2009). Des recommandations ont été émises comme, par exemple, un lavage soigneux à l'eau vinaigrée des légumes avant de les consommer crus (Anses, 2011). Par ailleurs, en France, il est préconisé pour une cuisson au grill (+260 °C) de cuire un steak haché surgelé de 100 g pendant 13 min avec 3 retournements successifs à intervalles de temps réguliers et un steak haché frais, ou décongelé, pendant 8 min (Bergis *et al.*, 2009). Ainsi, les steaks hachés doivent être « bien cuits à cœur » ; la couleur brun-gris indiquant que les protéines ont été portées à une température supérieure à 70 °C, suffisante pour détruire les bactéries éventuellement présentes (CIV, 2012). La note DGS/SD7/DHOS/E2/DGAS/2B n° 2007-167 du 23 avril 2007 reprend ces recommandations pour les professionnels de la restauration collective et souligne l'importance de la sensibilisation des personnes préparant les repas et celles participant au service dans les offices à ces mesures de maîtrise. À noter que parmi les procédés d'inactivation des STEC présents dans les aliments détaillés ci-dessus (*voir* paragraphe 1.4), le plus accessible et simple à domicile reste la cuisson à cœur, à une température supérieure à 70 °C.

3. Maladie humaine

3.1. Nature de la maladie : mécanisme de pathogénie et effets sur l'Homme

Les EHEC sont à l'origine de symptômes cliniques variés : diarrhée non sanglante, colite hémorragique, syndrome hémolytique et urémique (SHU), particulièrement chez les jeunes enfants, ou purpura thrombotique thrombocytopenique (PTT) chez l'adulte (Tarr *et al.*, 2005). Le SHU apparaît généralement une semaine après le début des symptômes digestifs pour environ 10 % des personnes ayant déclaré une diarrhée sanglante (Decludt *et al.*, 2000). Les signes biologiques pathognomoniques du SHU sont une anémie hémolytique microangiopathique (altération des capillaires et petits vaisseaux sanguins), une thrombocytopenie (raréfaction du nombre de plaquettes sanguines) et une insuffisance rénale aiguë. Le SHU typique, ou SHU post-diarrhée, correspond à environ 90 % des cas de SHU de l'enfant et représente la première cause d'insuffisance rénale du nourrisson. D'autres organes (pancréas, système nerveux central) peuvent également être touchés. L'atteinte du système nerveux central est d'ailleurs la principale cause de décès (Decludt *et al.*, 2000).

Les mécanismes impliqués dans le développement des infections à EHEC chez l'Homme ont surtout été étudiés chez les souches O157:H7 (Kaper *et al.*, 2004) et sont illustrés dans la figure 17.2. L'essentiel des signes cliniques provoqués par les EHEC est dû à la production de Shiga-toxines (Stx) mais aussi à la colonisation de l'intestin. Cependant, le processus infectieux est multifactoriel et dépend à la fois de facteurs bactériens et de facteurs liés à l'hôte.

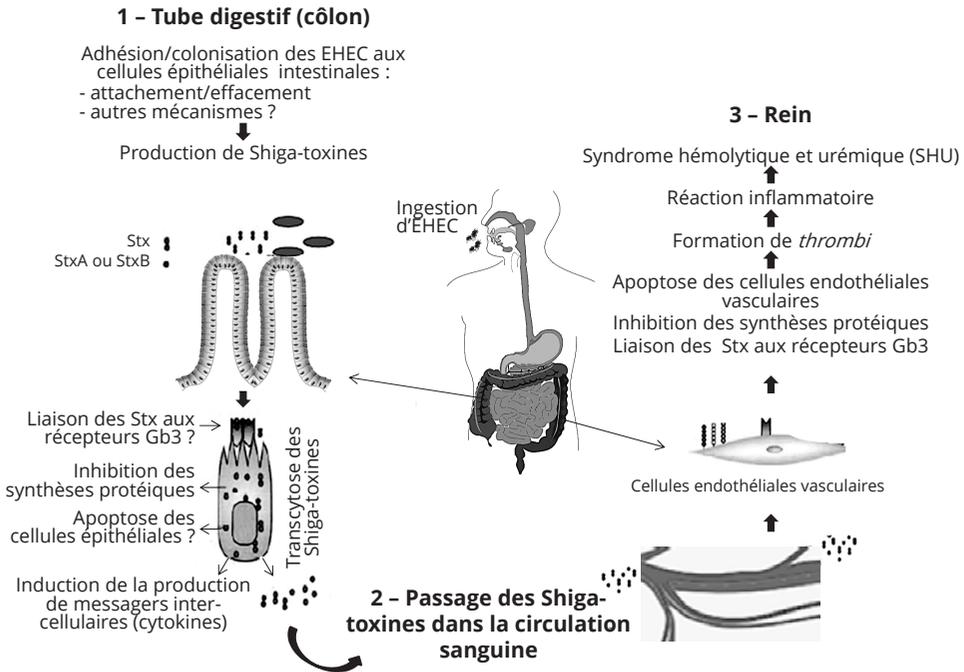


Figure 17.2. Principales étapes du processus infectieux des EHEC (adapté d'Afssa, 2003).

Après ingestion (moins de 100 bactéries suffisent), les EHEC résistent au pH acide de l'estomac et colonisent l'intestin par des processus complexes dont le plus typique et le plus connu est une adhésion intime des bactéries aux entérocytes, caractérisée par la lésion histopathologique dénommée lésion d'attachement et d'effacement. Les Shiga-toxines Stx traversent l'épithélium intestinal par transcytose, avant de rejoindre le système circulatoire. Elles peuvent alors atteindre les récepteurs glycolipidiques spécifiques (le globotriosyl céramide Gb3) localisés à la surface des cellules endothéliales des capillaires, principalement au niveau intestinal, rénal et cérébral. La sous-unité A (StxA) de Stx est responsable de l'action de la toxine et la sous-unité B (StxB) de son adhésion aux Gb3.

Après ingestion et passage de la barrière stomacale, les EHEC colonisent l'intestin par des processus complexes mettant en jeu plusieurs mécanismes dont certains restent à élucider (Nguyen et Sperandio, 2012). La plupart des EHEC provoque une lésion histopathologique caractéristique des cellules épithéliales intestinales, dénommée lésion d'attachement et d'effacement (A/E) (Frankel *et al.*, 1998). Ces lésions se caractérisent par la destruction des microvillosités intestinales et une adhésion des bactéries à la surface des entérocytes, notamment grâce à l'adhésine intimine (une protéine de la membrane externe de 94 kDa dont la fonction d'adhésion est assurée par les 280 acides aminés situés en position C-terminale qui assurent la reconnaissance d'un récepteur spécifique présent à la surface de la cellule cible), codée par le gène *eae*. Ces lésions A/E font suite à de profonds remaniements du cytosquelette de la cellule et à une accumulation d'actine sous la zone d'adhésion bactérienne (Kaper *et al.*, 2004). Ce mécanisme, en diminuant la surface d'absorption, pourrait entraîner les symptômes diarrhéiques observés lors des infections. La majorité des gènes impliqués dans la mise en place de lésions d'A/E sont regroupés dans un îlot de pathogénicité dénommé

locus d'effacement des entérocytes (LEE). Des souches STEC LEE-négatives sont néanmoins responsables de SHU ; elles possèdent alors d'autres adhésines permettant la colonisation de la muqueuse colique comme par exemple les adhésines impliquant notamment les gènes *aggR* ou *aaiC* de la souche STEC épidémique O104:H4 de 2011 (Caprioli *et al.*, 2005).

Après colonisation de la muqueuse, les bactéries produisent les toxines Stx qui traversent l'épithélium intestinal, rejoignent le système circulatoire et se fixent sur des récepteurs spécifiques Gb3 (pour globotriosyl céramide) principalement localisés à la surface des cellules endothéliales vasculaires intestinales, rénales et cérébrales. Après endocytose, les toxines, qui possèdent une activité N-glycosidase sur l'ARN ribosomique 28S, inhibent les synthèses protéiques et entraînent l'apoptose des cellules endothéliales (Croxen *et al.*, 2013). Les Stx stimuleraient également les monocytes et la production de cytokines (molécules de signalisation cellulaire), ce qui entraînerait une surexpression des récepteurs Gb3 favorisant l'action des toxines (Karmali *et al.*, 2010). Ces phénomènes entraîneraient ainsi la formation de saignements et de microthrombi (petits caillots), en particulier dans les glomérules rénaux et les autres organes. Les toxines Stx sont codées par des gènes *stx* portés par des bactériophages lambdoïdes intégrés dans le chromosome des souches (Herold *et al.*, 2004). Les gènes *stx* sont hautement exprimés lorsque le cycle lytique du prophage est activé, notamment par les agents capables de déclencher la réponse SOS bactérienne comme les rayons UV ou certains antibiotiques tels que les quinolones ou la mitomycine C (Herold *et al.*, 2004). Deux grandes classes de Shiga-toxines (Stx1 et Stx2) se distinguent par leurs propriétés immunologiques bien que leur mécanisme d'action et leurs propriétés biochimiques soient similaires ; plusieurs sous-types ont été décrits dans chaque classe. Ces sous-types présentent des différences d'activité biologique, de réactivité sérologique, de spécificité de liaison aux récepteurs ou de simples différences au niveau de la séquence nucléotidique de leurs gènes. Ils ne présentent donc pas tous la même cytotoxicité et certains semblent davantage associés aux souches responsables de SHU (Mainil et Daube, 2005).

De nombreux autres facteurs de virulence potentiels des EHEC ont été décrits à ce jour (liste détaillée décrite notamment par Kaper *et al.*, 2004 ; Gyles, 2007) et les combinaisons impliquées dans le pouvoir pathogène des EHEC restent encore à déterminer. Notamment, 177 îlots de pathogénicité ont été identifiés dans le génome des EHEC LEE-positives. Ceux-ci regroupent des gènes codant pour des effecteurs de type III appelés Nle (*Non LEE-encoded effector*) (Karmali *et al.*, 2010), qui sont des protéines spécifiques injectées par la bactérie directement dans le cytosol des cellules cibles, *via* un système de sécrétion de type III (SST3) (*voir* chapitre 1). La distribution des gènes *nle* au sein des îlots est variable d'une souche à l'autre, et plus les îlots contiennent de gènes *nle*, plus la maladie associée aux souches qui les contiennent est grave. Leur rôle dans la pathogénie reste néanmoins à élucider (Coombes *et al.*, 2008). En l'état actuel des connaissances, certains profils de souches ont été pointés du doigt comme plus « à risque », car plus fréquemment associés à des épidémies d'affections graves chez l'Homme. Hors d'un contexte clinique chez l'Homme, et en l'état actuel des connaissances, le consensus est de considérer que le risque associé à une souche est accru si elle possède un gène *stx* et au moins un des gènes d'adhésion *eae*, *aggR* ou *aaiC* et si elle appartient à l'un des 6 sérogroupe suivants O26, O103, O104, O111, O145 et O157 (Afssa, 2010 ; EFSA, 2013).

3.2. Relations dose-réponse

L'établissement de la relation dose-réponse repose sur la mise au point d'un modèle mathématique à partir de données provenant d'infections expérimentales animales ou humaines puis sur la validation de ce modèle à partir de données issues d'épidémies (Afssa, 2003).

Sur la base des données actuellement disponibles pour les EHEC, il est difficile de mettre en avant un modèle dose-réponse particulier. Selon les résultats rapportés par des enquêtes épidémiologiques, la quantité de bactéries ingérées entraînant la maladie chez l'Homme semble faible, inférieure à 100 bactéries pathogènes (Strachan *et al.*, 2001 ; Teunis *et al.*, 2004, 2008). Il convient toutefois de noter qu'un portage transitoire et asymptomatique chez l'Homme a également été décrit, ce qui souligne l'importance des facteurs de sensibilité liés à l'hôte (Caprioli *et al.*, 2005).

La majorité des cas d'infections sévères est recensée chez les jeunes enfants (Croxen *et al.*, 2013), et la probabilité associée à une souche EHEC d'entraîner un syndrome hémolytique et urémique associé à chaque cellule, est plus grande chez les enfants de moins de 5 ans que chez les enfants plus âgés (Delignette-Muller et Cornu, 2008). Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'ils possèdent davantage de récepteurs des toxines à la surface des cellules endothéliales de leurs glomérules rénaux (Ray et Liu, 2001) ou par une absence d'immunité antitoxine *via* leurs immunoglobulines G (Karmali *et al.*, 2003a). D'autres facteurs de sensibilité de l'hôte comme les modifications de la physiologie du tractus gastro-intestinal (ralentissement du transit, modification de la flore de barrière...) ou des immunisations contre les STEC (par contacts répétés et primo-infections), ont également été cités (Wilson *et al.*, 1996). Les facteurs liés à la souche (variants *stx*, présence d'îlots de pathogénicité complets...) interviennent également dans le développement de complications chez l'Homme (Croxen *et al.*, 2013). À titre d'exemple, l'efficacité de l'adhésion de la souche O104:H4 à l'épithélium intestinal favoriserait sa persistance dans le tractus digestif des patients et augmenterait la quantité de toxine passant dans le sang, ce qui expliquerait la fréquence particulièrement élevée d'apparition de SHU lors de l'épidémie de 2011 (Karch *et al.*, 2012). Enfin, les facteurs liés au vecteur de contamination (facteurs biotiques et abiotiques) doivent également être pris en compte dans l'établissement de la relation dose-réponse : par exemple, le comportement d'une même souche semble varier en fonction du type de fromages dans lequel elle se trouve (Miszczycha *et al.*, 2013). Aussi, de nombreux travaux restent nécessaires pour renforcer les informations actuellement disponibles et les protocoles d'investigations des épidémies alimentaires devraient être plus systématiquement complétés.

3.3. Diagnostic et traitement médical

L'infection à STEC chez l'Homme est d'abord suspectée par l'observation de symptômes cliniques évocateurs et peut être confirmée dans les selles des patients soit par utilisation de méthodes rapides génétiques (détection par PCR des gènes *stx*) ou immunologiques (détection des antigènes de surface somatiques de la bactérie – antigènes O – ou de *Stx*), soit par isolement de souches (Karmali *et al.*, 2010), bien qu'au stade du SHU post-diarrhée la souche ne soit fréquemment plus présente dans la lumière intestinale (Tarr *et al.*, 1990).

Le recours à l'isolement de souches implique l'utilisation de milieux de culture sélectifs et chromogènes dont le choix reste délicat comme évoqué précédemment lors de la recherche des souches dans les aliments. Lorsque les techniques rapides ou culturales sont négatives, l'infection récente à EHEC peut également être confirmée par la mise en évidence d'une augmentation chez le malade du titre sérique des anticorps dirigés contre les lipopolysaccharides les plus fréquents (Karmali *et al.*, 2010).

À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement spécifique des infections à STEC et de leurs complications telles que le SHU. Seuls des traitements symptomatiques peuvent être

entrepris (hospitalisation avec suivi des constantes vitales, dialyse...) (Tarr *et al.*, 2005). Malgré la sensibilité à de nombreuses classes d'antibiotiques de la majorité des EHEC, l'administration d'antibiotiques reste controversée, car elle favoriserait la libération de toxine Stx par les souches (Tarr *et al.*, 2005). Il convient également d'éviter d'utiliser des ralentisseurs de transit, des opiacés et des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Tarr *et al.*, 2005). Il n'existe pas à l'heure actuelle de vaccination anti-Shiga-toxine disponible bien que de nombreuses approches aient été envisagées *in vitro* et *in vivo* chez l'animal (Karmali *et al.*, 2010). Néanmoins, des travaux récents montrent que l'utilisation d'un vaccin conjugué (conjugaison du polysaccharide de surface bactérien à une protéine porteuse permettant une réponse immunitaire immunogène accrue), dirigé contre le lipopolysaccharide O157 semble efficace chez l'enfant (Ahmed *et al.*, 2006). Bien que prometteuse chez l'animal, l'administration orale ou systémique de composés porteurs de récepteurs fixant les Stx et permettant ainsi le blocage des dommages cellulaires provoqués par les toxines, reste une stratégie limitée, car elle doit être très précoce (Karmali, 2004).

3.4. Épidémiologie

Selon les pays, les infections dues aux EHEC sont recensées soit directement (déclaration obligatoire), soit indirectement (réseau de médecins volontaires). À l'échelon européen, 22 pays ont mis en place un système de surveillance direct pour les infections à STEC : Allemagne, Angleterre, Autriche, Belgique, Danemark, Écosse, Espagne, Finlande, Grèce, Irlande, Irlande du Nord, Italie, Luxembourg, Malte, Norvège, Pays-Bas, Pays de Galles, Pologne, Portugal, Slovénie, Suède, Suisse. Onze de ces pays ont également mis en place un système de surveillance indirecte pour les seuls cas de SHU (Espié *et al.*, 2008). En France, la surveillance des infections dues aux EHEC est basée, depuis 1996, sur les données de recensement indirect des SHU chez les enfants âgés de moins de 15 ans (Espie *et al.*, 2008). Ainsi, les données relatives à l'épidémiologie des affections humaines pourraient dépendre du système de surveillance mis en place dans chaque pays et pourraient être biaisées.

En 2010, les données d'épidémiosurveillance des infections à EHEC de 25 pays européens ont montré que leur incidence était de 0,83 cas pour 100 000 habitants. En 2011, en raison de l'épidémie due à la souche STEC O104:H4, le nombre d'infections a été multiplié par plus de 2 (9 485 cas confirmés recensés) (EFSA, 2013). Dans la grande majorité des cas, les symptômes associés aux infections ainsi que les sérotypes complets des souches incriminées ne sont pas précisément rapportés, ce qui souligne la difficulté d'évaluer le risque associé aux profils de virulence des souches et la nécessité de renforcer les enquêtes épidémiologiques chez les patients. Au cours de la période 2007-2010, 13 545 cas ont été recensés et le sérotype des souches incriminées n'a été rapporté que dans 2 140 cas (15,8 %). Lorsque qu'il a été déterminé, le sérotype le plus fréquent en Europe sur cette période reste le sérotype O157:H7 (774 cas), suivi du sérotype O157:H- (273 cas) et de O103:H2 (131 cas). En 2011, le sérotype le plus fréquent a été O104:H4 (118 cas parmi les 686 souches sérotypées cette année-là), suivi de O157:H- (117) et O157:H7 (114) (EFSA, 2013).

En France, la majorité des cas de SHU recensés (96 %) correspond à des formes sporadiques. Entre 1996 et 2010, 1 378 cas de SHU ont été notifiés à l'Institut de veille sanitaire (Afssa, 2010). L'incidence moyenne annuelle était de $0,8/10^5$ enfants de moins de 15 ans (extrêmes : $0,6/10^5$ en 1998 et $1,0/10^5$ en 2005 et en 2010) soit une centaine de cas de SHU par an. En ce qui concerne les caractéristiques des souches EHEC les plus

La collection Sciences & Techniques AgroAlimentaires accompagne tous les acteurs de l'agroalimentaire afin de leur apporter les connaissances et savoir-faire indispensables à leur pratique professionnelle. Elle fait appel à de nombreux experts pour proposer des ouvrages de référence et des guides pratiques centrés sur les grandes filières et les principaux domaines de recherche de l'agroalimentaire. Chaque ouvrage offre une synthèse complète d'un sujet présentant les dernières innovations et est illustré de nombreux exemples et cas pratiques. La collection est dirigée par Marie-Noëlle Bellon-Fontaine, professeur à AgroParisTech.

Pour garantir et maîtriser la sécurité microbiologique des aliments et prévenir les crises sanitaires alimentaires, la connaissance et la surveillance des microorganismes pathogènes depuis la production primaire jusqu'à la distribution des denrées alimentaires en passant par la transformation, sont indispensables.

Cet ouvrage de référence traite des dangers microbiologiques alimentaires majeurs (microorganismes infectieux ou toxines d'origine microbienne) et des risques associés pour l'Homme.

Illustré de nombreux schémas et tableaux de synthèse, il fait un point complet sur **les notions fondamentales de microbiologie générale, de physiologie microbienne et de modélisation**, en les appliquant aux microorganismes pathogènes des aliments et en y intégrant les dernières avancées. Il présente ensuite **les outils de gestion du risque microbiologique** mis en place au niveau européen et français. Enfin, les microorganismes avérés ou émergents d'intérêt font l'objet de **monographies claires et détaillées** permettant de bien les connaître pour mieux les maîtriser.

Cet ouvrage s'adresse aux managers, ingénieurs et techniciens des industries agroalimentaires (des secteurs qualité-hygiène, production, achats, recherche et développement...), aux professionnels du contrôle sanitaire et de la gestion du risque (laboratoires d'analyses et instances officielles) ainsi qu'aux enseignants-chercheurs et aux étudiants dans le domaine de la microbiologie appliquée à l'agroalimentaire et des risques sanitaires.

MURIELLE NAÏTALI est maître de conférences en microbiologie à AgroParisTech, département Sciences et procédés des aliments et bioproduits (Massy).

LAURENT GUILLIER est chargé de projets recherche au Laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses (Maisons-Alfort).

FLORENCE DUBOIS-BRISONNET est professeur de microbiologie et sécurité sanitaire des aliments à AgroParisTech, département Sciences et procédés des aliments et bioproduits (Massy).