



Comment garantir la sécurité microbiologique de la viande bovine ?

Survie des *Escherichia coli* entérohémorragiques depuis les aliments pour bovins, le tube digestif animal, jusqu'à la viande bovine, et moyens non antibiotiques de réduction du risque sanitaire

Mots-clés : Bovin, Viande, Tube digestif, EHEC, STEC, Toxi infection alimentaire, Microorganismes antagonistes, Probiotiques

Auteurs : Frédérique Chaucheyras-Durand^{1,2}, Lysiane Dunière^{1,2}, Evelyne Forano²

¹ Lallemand Animal Nutrition, 19 rue des Briquetiers, BP59, 31702 Blagnac cedex, France ; ² INRA Centre Auvergne Rhône-Alpes, UR454 Microbiologie, 63122 Saint Genès Champanelle, France

* E-mail de l'auteur correspondant : fchaucheyrasdurand@lallemand.com / frederique.durand@inra.fr

Des *Escherichia coli* entérohémorragiques pathogènes pour l'Homme sont naturellement présents dans le tractus digestif des bovins qui sont porteurs sains. Cet article fait le point sur les récentes recherches concernant l'écologie et la physiologie de ces pathogènes de la ferme à l'assiette, et les possibles stratégies de biocontrôle au niveau des élevages bovins.

Résumé :

Des produits d'origine animale (en particulier la viande de bœuf hachée) peuvent être contaminés par des souches d'*Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) et provoquer des toxi-infections alimentaires. Le réservoir naturel de ces souches est le tractus gastro-intestinal du bovin. Les souches pathogènes ont une forte capacité de survie dans l'environnement de la ferme, ainsi qu'au niveau de la viande. Afin de réduire le risque de transmission à l'homme, il est important de mettre en place des stratégies en amont de la chaîne alimentaire, permettant de limiter le portage de ces souches par l'animal. Un des moyens envisagés consisterait à ajouter dans l'alimentation des animaux des microorganismes antagonistes capables d'inhiber le développement des EHEC dans le tractus gastro-intestinal de l'animal.

Abstract: How to guarantee microbiological safety in bovine meat

Products of animal origin (especially ground beef meat) may be contaminated by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and trigger food borne infections. The natural reservoir of these strains is the bovine gastro-intestinal tract. The pathogenic strains possess a strong capacity to survive in the farm environment as well as in the meat. In order to reduce the risk for transmission to humans, it is important to set up strategies upstream in the food chain to limit animal carriage of these strains. One of the means could be to add in animal feed some antagonistic microorganisms that inhibit EHEC development in the animal gastro-intestinal tract.

INTRODUCTION

En Europe, la viande bovine représente un marché crucial. En effet, 7,5 millions de tonnes équivalent carcasse sont consommés chaque année. La France, l'Italie et la Suède sont parmi les plus forts consommateurs per capita et par an (FranceAgriMer, 2010). Il est donc très important pour la filière de garantir une haute valeur nutritionnelle, des qualités organoleptiques optimales, et une sécurité maximale pour les produits carnés d'origine bovine, tout en offrant des prix raisonnés pour l'ensemble de la filière, de l'éleveur au consommateur.

Afin de garantir la sécurité de la viande bovine, et ainsi préserver la santé du consommateur, une stratégie « de la fourche à la fourchette » est nécessaire. L'EFSA (European Food Safety Agency), dans un récent rapport, met en exergue *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, *E. coli* producteurs de Shiga toxines (STEC) et *Listeria* comme les 5 pathogènes les plus fréquemment incriminés dans des toxi-infections alimentaires chez l'Homme (EFSA Journal, 2015). Si *Campylobacter* est de très loin le germe responsable du plus grand nombre de cas (Tableau 1), le taux de mortalité associé est très faible, alors que pour *Listeria*, un faible nombre de cas a été recensé mais avec un taux élevé de mortalité.

Concernant les STEC, près de 6 000 cas confirmés d'infections ont été enregistrés en 2014 avec un taux de mortalité de 0,20%. S'agissant du type d'aliment incriminé, les infections à *Campylobacter* et *Salmonella* sont davantage associées à la consommation d'œufs et de viande de volaille, alors que les STEC sont majoritairement contaminants des produits d'origine bovine (viande et lait).

Ainsi, les infections à STEC représentent une problématique majeure pour la filière viande bovine. Il est très important de comprendre les mécanismes biologiques qui sous-tendent la survie de ces bactéries depuis l'environnement de la ferme, jusqu'au produit fini (viande, lait cru, fromages au lait cru). Il sera donc possible de définir des stratégies de lutte, qui pourraient être basées non pas sur le recours aux antibiotiques ou désinfectants chimiques, dont l'utilisation se doit d'être réduite du fait de leurs effets néfastes sur les écosystèmes naturels et du développement possible de souches pathogènes insensibles à ceux-ci, mais sur l'utilisation d'additifs à base de microorganismes antagonistes. Ces microorganismes font actuellement l'objet de nombreuses recherches partout dans le monde.

Tableau 1 : Nombre de cas de toxi-infections alimentaires à *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, STEC et *Listeria* et pourcentages de mortalité associée en Europe en 2014 (d'après EFSA Journal, 2015)

Toxi-infection	Nombre de cas	Mortalité (%)
Campylobactériose	236 851	0,01
Salmonellose	88 715	0,15
Yersiniose	6 625	0,13
Infection à STEC	5 955	0,20
Listériose	2 161	15,0

I. QUI SONT CES STEC ?

Les STEC sont des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (Stx). Ces bactéries sont commensales du tractus gastro-intestinal de nombreux animaux (ruminants sauvages et domestiques, porcins, équins, volailles, amphibiens, espèces aquatiques...) et le portage digestif de celles-ci n'a majoritairement que très peu d'impact sur leur hôte (Persad et Lejeune, 2014). En effet, dans la plupart des cas, les récepteurs intestinaux pour les Shiga-toxines bactériennes sont absents. Chez l'Homme, la présence de ces récepteurs (Gb3) et l'expression concomitante d'autres facteurs de virulence explique la haute pathogénicité de certaines souches STEC. Celles-ci sont appelées EHEC, pour Entero-hémorragic *E. coli*, lorsqu'elles ont été isolées d'échantillons biologiques prélevés chez des sujets ayant développé la maladie. Les sérotypes les plus associés à des cas d'infection chez l'Homme sont O157:H7, O26:H11, O45:H2, O103:H2, O111:H8, O121:H19 et O145:H28. Une fois ingérés *via* l'aliment contaminé, les EHEC vont adhérer à la muqueuse intestinale, déstructurer l'épithélium intestinal en générant des lésions d'attachement et d'effacement des villosités, ce qui au niveau clinique se traduit par une diarrhée aqueuse. Ces

cas de diarrhée évoluent dans 90% des cas vers des colites hémorragiques du fait des dommages à l'épithélium intestinal. Les bactéries produisent leurs Shiga-toxines, principal facteur de virulence, qui peuvent alors passer la barrière intestinale et rejoindre la circulation sanguine, par laquelle elles sont transportées jusqu'à leurs organes cibles (côlon, rein, cerveau). L'effet de la Stx provoque des atteintes rénales telles que le SHU (Syndrome Hémolytique et Urémique) ou cérébrales telles que le PTT (Purpura Thrombotique et Thrombocytopénique). Les personnes les plus sensibles sont les enfants de moins de 5 ans et les personnes âgées.

Il est à noter que la dose bactérienne infectieuse peut être très faible : quelques dizaines de cellules bactériennes suffisent à déclencher une pathologie intestinale. Aucune stratégie thérapeutique n'est efficace à ce jour. Les antibiotiques classiquement utilisés pour des infections à *E. coli* sont inefficaces, voire contre-indiqués car ils peuvent provoquer une production accrue de Stx (Pacheco et Sperandio, 2012).

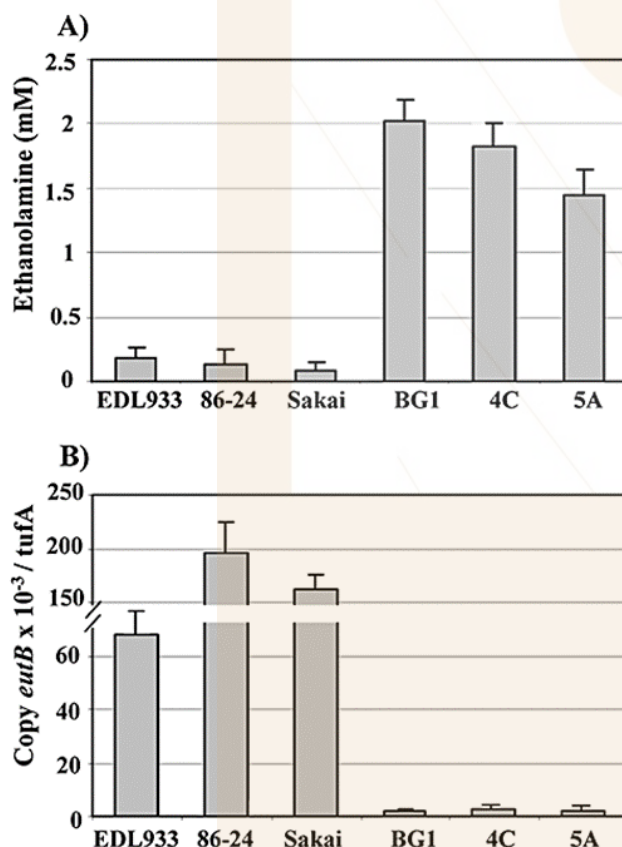
II. RESERVOIR ANIMAL ET MODES DE TRANSMISSION A L'HOMME

Les bovins sont considérés comme le principal réservoir de STEC. Keen et al. (2010) ont isolé des STEC O157 à tous les niveaux du tractus gastro-intestinal (TGI), de la cavité buccale à l'ampoule rectale. Ces bactéries ne déclenchant aucune pathologie, les bovins sont donc porteurs asymptomatiques. Seules quelques études ont observé le développement de lésions hémorragiques intestinales liées à la présence de STEC chez des veaux chez qui de faibles concentrations de mycotoxines avaient été mesurées (Baines et al., 2013). Ces auteurs ont d'ailleurs suggéré que les mycotoxines avaient un rôle de « catalyseur » dans l'activité cytotoxique des STEC. En France, à partir de données collectées chez plus de 1300 bovins répartis dans près de 700 élevages, et abattus en 2010-11, la prévalence des STEC a été recensée. Un gène codant pour la Shiga-toxine (*stx2*) a été détecté dans les matières fécales surtout chez les jeunes bovins laitiers (JBL, 75%), puis chez les jeunes bovins à viande (60%), les vaches laitières (62%) et enfin les vaches à viande (63%) (Bibbal et al., 2015). L'isolement de souches STEC de sérotypes variés a été positif dans 4,5% des JBL, et dans 5% de ces effectifs, des souches du sérotype hautement

pathogène O157:H7 ont été isolées.

Les STEC sont capables de survivre, voire de se multiplier, dans le TGI bovin. En effet, de récents travaux démontrent que les STEC peuvent utiliser des composés présents dans le tube digestif bovin pour leur croissance (Bertin et Forano, 2013). Par exemple, l'utilisation de l'éthanolamine, petite molécule entrant dans la composition des phospholipides membranaires et relativement abondante au niveau du segment jéjuno-iléal, a été mise en évidence grâce à des expériences d'incubation de souches STEC *in vitro* dans des contenus digestifs bovins prélevés à l'abattoir (Bertin et al., 2011). Les résultats montrent également que des souches d'*E. coli* commensales du tube digestif bovin sont incapables de métaboliser ce composé (Figure 1). De plus, il a été démontré que les STEC peuvent utiliser certains sucres entrant dans la composition du mucus intestinal, ce qui leur donne un avantage compétitif sur le microbiote commensal de l'intestin du bovin (Bertin et al., 2013), et que la voie de la néoglucogénèse est importante dans la persistance des STEC au sein du TGI bovin (Bertin et al., 2014).

Figure 1 : Les souches STEC (EDL933, 86-24 et Sakai) utilisent plus efficacement l'éthanolamine que des souches d'*E. coli* commensales (BG1, 4A, 5A) (Bertin et al., 2011)



Légende technique : A) concentrations d'éthanolamine dans des cultures de STEC ou d'*E. coli* commensales en jus intestinal bovin pendant 5h à 39°C. B) niveau d'expression du gène *eutB* impliqué dans le métabolisme de l'éthanolamine.

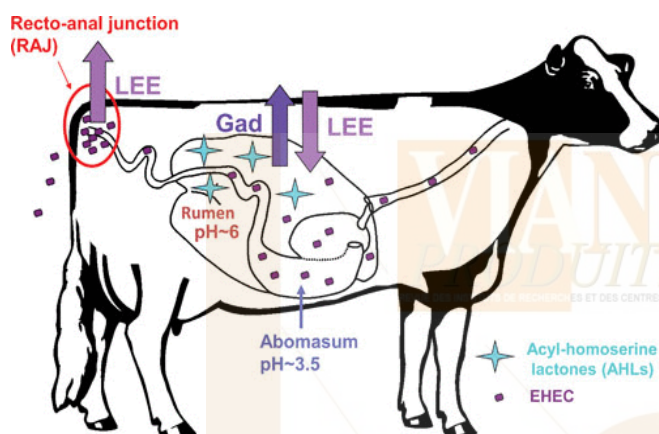
Le décryptage des interactions entre les souches STEC et le microbiote digestif animal semble important pour mieux comprendre l'écologie des STEC au sein du TGI bovin. En effet, les bovins hébergent un microbiote très complexe au niveau du rumen et du gros intestin, jouant un rôle majeur sur la digestion des composants de la ration alimentaire, et donc sur la modulation des conditions de l'environnement digestif qui peuvent être plus ou moins favorables aux STEC. Ainsi, il a été montré que le microbiote du rumen exerce un effet

« barrière » empêchant leur croissance, et que l'établissement d'un environnement anaérobie strict défavorisait également leur développement (Chaucheyras-Durand et al., 2006). Le pH et les concentrations en métabolites issus de l'activité fermentaire du microbiote du rumen (acides gras volatils, ou autres acides organiques) jouent également un rôle majeur sur la survie des STEC (Chaucheyras Durand et al., 2010). Certains travaux suggèrent que le microbiote ruminal produit des molécules « signal » perçues par les STEC, qui

induiraient l'activation de gènes de résistance à l'acidité (Pifer et Sperandio 2014, Figure 2), permettant aux pathogènes de survivre lors de leur passage dans la caillette, où le pH est très bas (entre 2 et 4) et ainsi d'atteindre les compartiments postérieurs, où les conditions sont plus favorables. Les STEC seraient capables de se multiplier dans

la région terminale du TGI, notamment au niveau de la zone recto-anale où l'expression de facteurs de virulence serait également stimulée (Hughes *et al.*, 2010). Ainsi, ces bactéries seraient particulièrement aptes à exprimer leur pathogénicité dès l'excrétion via les fèces.

Figure 2 : Impact du métabolisme du microbiote commensal du rumen sur l'expression de facteurs de virulence des EHEC (d'après Pifer et Sperandio, 2014)



Légende technique : LEE : gènes du locus d'attachement/effacement des entérocytes ; Gad : gènes de la résistance à l'acidité. Au niveau du rumen, les molécules d'acyl-homoserine lactone sont produites par le microbiote ruminal et vont activer l'expression des gènes Gad et réprimer ceux du LEE. Au niveau de la jonction recto anale (RAJ), les gènes du LEE sont activés ce qui permet une colonisation et une multiplication des EHEC à ce niveau du tractus digestif, conduisant à une augmentation de l'excrétion bactérienne.

La transmission des pathogènes à l'Homme se fait donc principalement *via* l'ingestion d'aliments contaminés par des contenus digestifs ou des matières fécales bovines. La contamination des viandes peut se produire à l'abattoir, à la suite de contacts (directs ou indirects) avec des cuirs contaminés par des matières fécales porteuses de STEC, ou en cas d'accident d'éviscération (les carcasses sont alors en contact direct avec du contenu digestif renfermant des STEC).

La viande est donc une voie de contamination importante, en particulier la viande hachée (King *et al.*, 2014) car les bactéries de surface se retrouvent mélangées au cœur du produit, et peuvent survivre si le produit est insuffisamment cuit. Il a été montré que des souches O157:H7 sont capables d'interagir avec des protéines de la matrice extracellulaire (collagènes, fibronectine, élastine) et ainsi former un biofilm dense à la surface de la viande (Chagnot *et al.*, 2013). Ces travaux indiquent par ailleurs qu'une incubation préalable

dans du fluide jéuno-iléal bovin augmente la capacité des pathogènes à adhérer à cette matrice, en comparaison avec des incubations en contenu de caecum bovin ou en milieu de laboratoire. Il semble également que lorsque l'adhésion se produit à 25°C et à pH 7, ce qui correspond aux conditions rencontrées lors de l'étape de dépouillage (arrachage des cuirs), une réfrigération ou une acidification (jusqu'au pH ultime) ne permettent pas de détacher les bactéries adhérentes (Chagnot *et al.*, 2013).

Des procédures ont été mises en place par les acteurs de la filière pour éviter ces problèmes, notamment le renforcement des mesures de contrôle de propreté des animaux à l'abattoir. Des autocontrôles sont également pratiqués au niveau du transformateur, conduisant à l'identification rapide de lots positifs et la mise en place de mesures de retrait-rappel de produits avant même leur commercialisation. Cependant, le risque de contamination ne peut être totalement exclu.

III. CIRCULATION ET PERSISTANCE DES STEC DANS L'ENVIRONNEMENT DE LA FERME

Les STEC sont particulièrement résistantes dans l'environnement de la ferme. Par exemple, elles sont capables de survivre pendant plusieurs semaines dans l'eau, le sol ou les effluents d'élevage (Frémaux *et al.*, 2008). La dissémination du pathogène peut se faire à partir d'un animal excréteur *via* le contact avec les matières fécales, l'abreuvoir, le contact animal – animal, mais également *via* d'autres porteurs tels que les oiseaux ou les rongeurs (Persad et Lejeune, 2014). La contamination croisée est d'autant plus facile que la densité des animaux est importante, c'est pourquoi davantage de problèmes liés aux infections à STEC sont observés dans les pays à systèmes très intensifs d'élevage (feedlot), comme les USA ou le Canada. Il a par ailleurs été suggéré que certains animaux au sein d'un troupeau pourraient être « super-excréteurs », c'est-à-dire plus fréquemment porteurs et disséminateurs de STEC et à

des taux plus élevés (>10⁴ bactéries par gramme de fèces), et qu'ils représenteraient ainsi une source importante de contamination (Omisakin *et al.*, 2003). La raison de cette propension à la super-excrétion est encore mal connue. Il a été montré que des bovins super-excréteurs d'*E.coli* O157:H7 hébergeaient un microbiote fécal de composition différente de celui présent chez des bovins non super-excréteurs, suggérant que les composants de l'écosystème microbien joueraient un rôle dans la persistance des EHEC au sein du tractus digestif (Xu *et al.*, 2014).

Des protistes parasites tels que les amibes, communément présentes dans le sol, l'eau, ou les effluents d'élevage, semblent également jouer un rôle dans la circulation du pathogène. En effet, elles protégeraient les STEC dans leur espace intracellulaire et leur permettraient ainsi de résister aux stress de l'environnement (Chekabab *et al.*, 2013). Par

ailleurs, la capacité des STEC de former des biofilms, qui a été montrée pour le sérotype O157:H7, représente un avantage car sous forme de biofilm, les bactéries sont davantage protégées des processus de nettoyage-désinfection pouvant être mis en place dans les installations d'élevage (Fremaux *et al.*, 2008). Au niveau des aliments distribués aux bovins, plusieurs travaux indiquent que l'ensilage peut être un milieu dans lequel les STEC sont susceptibles de se maintenir, voire se développer (Pedroso *et al.*, 2010, Dunière *et al.*,

2011, Ogunade *et al.*, 2016). Si la phase de fermentation anaérobie représente une condition très défavorable à la survie des STEC, l'exposition à l'air au moment du désilage peut être une condition favorable. Une inoculation de souches O157 ou O26 au moment de l'ouverture de mini-silos d'ensilage de maïs (Pedroso *et al.*, 2010, Dunière *et al.*, 2011) ou de luzerne (Ogunade *et al.*, 2016), suivie d'une exposition à l'air pendant quelques jours, a conduit à une forte croissance des pathogènes dans l'ensilage.

IV. STRATEGIES DE PREVENTION DU RISQUE DE CONTAMINATION

Comme souligné plus haut, les moyens susceptibles d'être efficaces pour traiter une pathologie à EHEC chez des patients infectés sont à ce jour inexistantes. Cependant, plusieurs études rapportent l'effet inhibiteur de souches de levure probiotiques (*Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces boulardii*) sur l'adhésion de souches EHEC à l'épithélium intestinal de souris infectées expérimentalement (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2015), ou sur la croissance et la virulence des EHEC *in vitro* en système artificiel simulant la digestion humaine (Thévenot *et al.*, 2015). Ceci dit, il semble très difficile de pouvoir mettre en place cette stratégie préventive chez des patients suffisamment tôt pour être

réellement efficace. Ainsi, une approche de contrôle du portage digestif des pathogènes par les bovins semble plus applicable au niveau de la ferme, par le biais de l'apport par l'alimentation de microorganismes sélectionnés pour leur effet inhibiteur/antagoniste des STEC. L'utilisation de microorganismes vivants comme additifs alimentaires est bien acceptée par l'éleveur et le consommateur, les souches microbiennes sélectionnées ayant fait la preuve de leur innocuité (Chaucheyras-Durand et Durand, 2010). De plus, elle fait l'objet d'une réglementation stricte au niveau de l'UE (Règlement 1831/2003).

IV.1. Utilisation de microorganismes additifs pour ensilage

L'ensilage est un mode de conservation des fourrages grâce à un procédé de fermentation liée à l'activité d'un écosystème microbien complexe. Il peut représenter jusqu'à 75% de la composition d'une ration pour une vache laitière. Sa confection demande des pratiques strictes afin d'assurer une conservation et donc une qualité et une sécurité maximales. Ces pratiques ne sont pas toujours respectées sur le terrain, ce qui crée un risque de contamination par les STEC (Dunière *et al.*, 2013). Des études récentes ont montré l'intérêt de microorganismes additifs constitués de souches de bactéries lactiques pour limiter la croissance de souches EHEC dans l'ensilage (Tableau 2). Les résultats indiquent que, même si des effets positifs sur la limitation du développement de germes indésirables (levures, moisissures) et sur le pH de l'ensilage ont été mesurés suite à l'inoculation de ces souches bactériennes, celles-ci n'ont eu que peu

d'impact sur la cinétique de survie des EHEC, ces dernières étant en effet éradiquées de l'ensilage au bout de quelques jours dans tous les mini silos et quel que soit le fourrage étudié. Par contre, après inoculation des EHEC au désilage, l'inhibition de la croissance des pathogènes au cours de l'exposition aérobie était très claire en présence des microorganismes introduits à la mise en silo, et concomitante avec le maintien d'un pH bas (<4). Outre un effet sur le pH, les souches inoculées pourraient avoir un effet inhibiteur via la production de molécules antibactériennes (bactériocines, acides organiques...). Ces données indiquent que l'utilisation de certains additifs à base de bactéries lactiques sélectionnées représente un moyen de réduire le développement des EHEC dans les ensilages, et donc de limiter le risque de transfert à l'animal.

Tableau 2 : Effet de microorganismes additifs pour ensilage sur la survie ou la croissance des EHEC dans l'ensilage

Type de fourrage ensilé	Type de microorganisme additif	Sérotypes d'EHEC	Survie/croissance des EHEC		Référence
			Phase de conservation	Phase d'exposition aérobie *	
Maïs plante entière	<i>Pediococcus pentosaceus</i> + <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>L. buchneri</i> + <i>P. pentosaceus</i>	O157:H7	Pas de survie après 3 j quel que soit le traitement	Eradication des EHEC avec <i>L. buchneri</i> + <i>P. pentosaceus</i> , réduction d'1 Log avec <i>L. buchneri</i>	Pedroso <i>et al.</i> , 2010
Maïs plante entière	<i>Propionibacterium sp.</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	O26:H11 et O26:H-	Pas de survie après 5j quel que soit le traitement	Eradication des EHEC avec <i>L. mesenteroides</i>	Dunière <i>et al.</i> , 2011
Luzerne	<i>L. plantarum</i> , <i>L. buchneri</i>	O157:H7	Pas de survie après 16j dans les ensilages traités avec <i>L. buchneri</i> ou <i>L. plantarum</i> . Plus de survie après 100j dans le témoin	Eradication des EHEC avec les deux additifs	Ogunade <i>et al.</i> , 2016

* exposition à l'air pendant 144h (Pedroso *et al.*, 2010 et Dunière *et al.*, 2011), ou 168h (Ogunade *et al.*, 2016)

IV.2. Utilisation de microorganismes antagonistes des EHEC dans le TGI bovin

L'utilisation de microorganismes antagonistes, ajoutés dans la ration alimentaire des bovins, représente une piste intéressante dans le but de réduire le portage digestif bovin des EHEC. L'apport d'additifs microbiens vivants (ou probiotiques) est de plus en plus pratiqué en élevage bovin lait

IV.2.1. Etudes *in vitro*

Des études réalisées *in vitro* à partir de contenus digestifs de ruminants ont montré l'intérêt de certains de ces additifs dans l'inhibition de la croissance de souches STEC. Par exemple, *Lactobacillus acidophilus* BT-1386 a eu un effet dose-dépendant sur le développement de STEC O157:H7 en suspensions fécales (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2006). Cette même souche, ainsi qu'une levure vivante *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077, ont été efficaces pour diminuer significativement, voire éradiquer des souches STEC en contenu de rumen ovine (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010).

IV.2.2. Etudes *in vivo*

La démonstration scientifique *in vivo* de ces effets n'est pas aisée, car il faut avoir recours à des animaux infectés expérimentalement par des EHEC, ce qui exige des conditions d'hébergement spécifiques (animalerie confinée et autorisation préalable par le comité d'éthique régional). Le taux et la durée d'excrétion des EHEC étant très variable d'un animal à l'autre, et ce type d'étude ne pouvant se limiter qu'à un petit effectif d'animaux, le risque de ne pas observer d'effets significatifs est important. Certaines études ont cependant montré l'effet de microorganismes additifs avec ce type de modèle. L'effet d'une combinaison de souches d'*E. coli* commensales a été évalué sur l'excrétion fécale de souches de différents sérotypes de STEC (O157:H7, O26:H11 et O111:NM) inoculées chez des veaux d'une semaine ou chez des veaux sevrés de 8 à 10 semaines (Tkalcic *et al.*, 2003, Zhao *et al.*, 2003). Chez les jeunes veaux, l'excrétion des souches de O26:H11 et de O111:NM était diminuée avec l'apport des souches d'*E. coli*, alors qu'aucun effet n'était observé pour les O157:H7 (Zhao *et al.*, 2003). Chez les veaux sevrés, une réduction substantielle des niveaux de populations des souches O157:H7 et O111:NM a pu être mesurée avec la combinaison d'*E. coli*, mais aucun effet n'a été observé pour

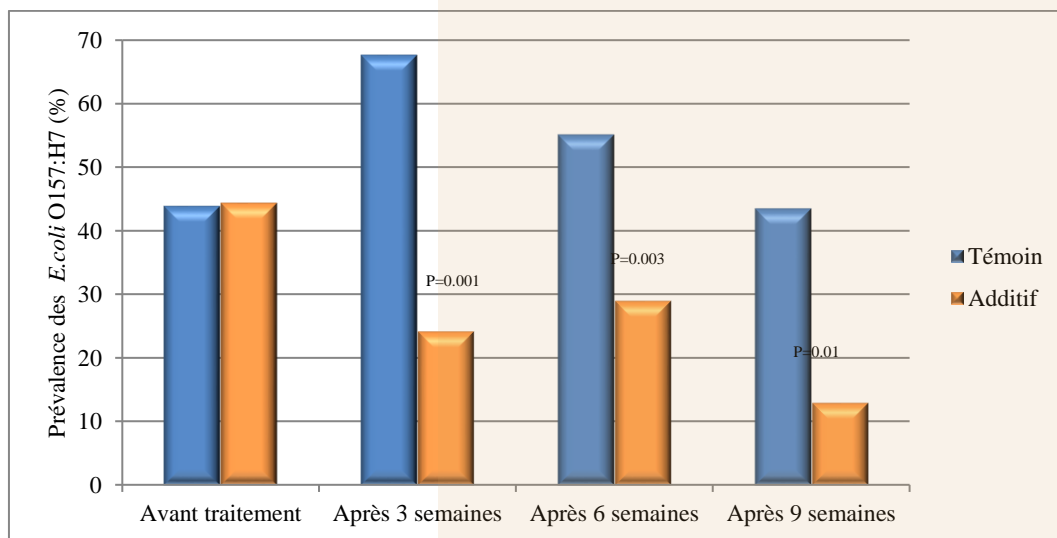
ou viande, dans le but d'optimiser les équilibres des communautés microbiennes du rumen et ainsi orienter favorablement les processus digestifs, se traduisant par des bénéfices au niveau des performances mais aussi de la santé de l'animal (Chaucheyras-Durand et Durand, 2010).

Dans cette dernière étude, les souches STEC avaient été sélectionnées selon leur capacité d'acido-résistance, et même les souches les plus résistantes ont été inhibées. Plus récemment, une souche sélectionnée de *Lactobacillus reuteri* s'est montrée très efficace pour éradiquer des EHEC O157:H7 en contenu ruminal bovin, en présence de glycérol et en anaérobiose stricte (Bertin *et al.*, 2016). Ces travaux *in vitro* démontrent le potentiel des probiotiques à limiter la charge bactérienne dans les compartiments digestifs des animaux.

Les O26:H11 (Tkalcic *et al.*, 2003). Du fait de la plus grande facilité de recenser les animaux porteurs et de surcroît sur un grand effectif, mais aussi du fait de la fréquence importante de cas épidémiques ou sporadiques à EHEC identifiés, de nombreuses études ont été réalisées en Amérique du Nord chez des bovins en engraissement élevés en feedlot, déjà porteurs d'EHEC. Dans ces études, seule la prévalence des O157:H7 est mesurée par la détection des souches EHEC au niveau fécal.

Différents additifs probiotiques à base de bactéries actuellement sur le marché (*Lactobacillus acidophilus*, *Propionibacterium freudenreichii*) ont montré des effets variables sur la prévalence des O157:H7. Sur la base de la littérature scientifique existante, différents additifs à base de souches de *Lactobacillus acidophilus* et/ou *Propionibacterium freudenreichii* ont été évalués en 2015 par le BIFSCO (Beef Industry Food Safety Council) aux USA, pour leur efficacité à réduire la prévalence des *E. coli* O157:H7 chez le bovin en engraissement (Figure 3). Cette évaluation a conduit le comité à reconnaître ces additifs comme « Production Best Practice ».

Figure 3 : Pourcentage d'individus excréteurs de *E. coli* O157: H7 parmi un effectif de bovins en feedlot (n=138) recevant ou non pendant 9 semaines un additif à base de microorganismes (*L. acidophilus* + *P. freudenreichii*) (d'après Tabe *et al.*, 2008)



Légende technique : en bleu : bovins témoins (sans additif), en orange : bovins recevant l'additif (10⁹ CFU (colonie formant unité) de chaque souche microbienne par gramme d'aliment et par jour).

IV.3. Modes d'action possibles

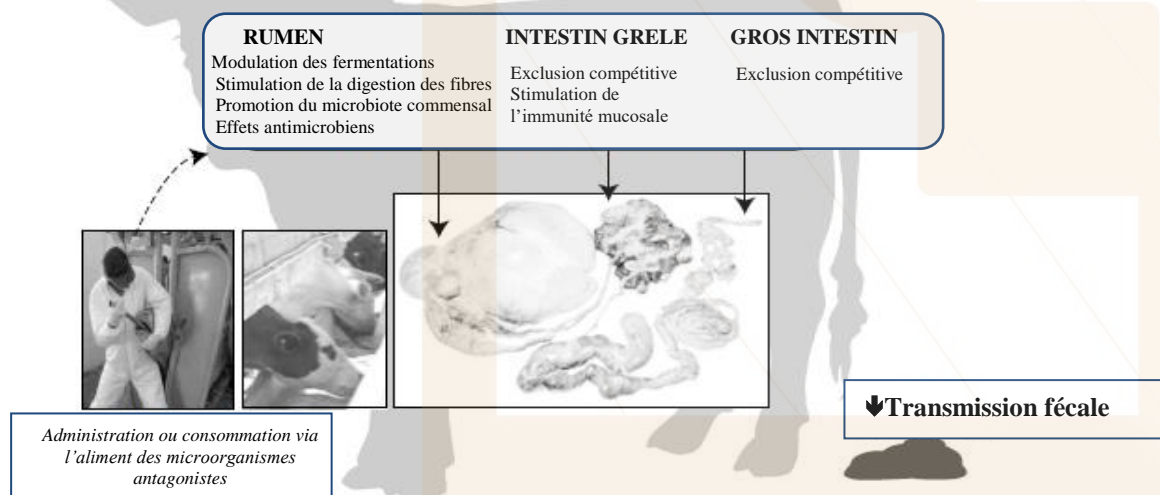
Différents modes d'action de ces additifs microbiens ont été proposés pour expliquer l'inhibition des STEC à différents niveaux du tractus gastro-intestinal (McAllister *et al.*, 2011, Figure 4) :

- la production de composés antibactériens (éthanol, hydroxypropionaldéhyde, acides lactique, acétique, propionique...),
- la modulation des espèces microbiennes commensales digestives permettant d'accroître l'effet de barrière,
- l'exclusion du pathogène par compétition pour des nutriments ou pour des sites d'adhésion,
- la stimulation du système immunitaire de l'animal.

Cependant, jusqu'à présent, aucun de ces mécanismes n'a réellement été démontré *in vivo* chez le ruminant. Concernant la compétition pour l'adhésion à l'épithélium intestinal, il a par exemple été montré que l'adhésion préalable de *L. helveticus* R0052 et de *L. rhamnosus* R0011 à des cellules intestinales en culture permettait d'inhiber la colonisation d'*E. coli* O157:H7 (Sherman *et al.*, 2005). Il est également possible que la paroi de certains probiotiques

puisse interagir avec les *fimbriae* produits à la surface des cellules de STEC et ainsi les empêcher d'adhérer, comme cela a été décrit pour la levure *Saccharomyces boulardii* (Gedek, 1999). Les probiotiques pourraient également moduler l'expression de gènes impliqués dans la survie ou la virulence des STEC. Par exemple, des molécules sécrétées par *L. acidophilus* La-5 ont réduit l'expression de gènes impliqués dans la colonisation et le quorum sensing chez *E. coli* O157:H7 (Medellin-Pena *et al.*, 2007 ; 2009). Des surnageants de culture de *L. reuteri* ont réprimé l'expression d'un régulateur clé impliqué dans le phénomène d'attachement et d'effacement des villosités intestinales (Jelcic *et al.*, 2008). Dans un modèle de souris infectées par une souche O157:H7, la supplémentation par voie orale de *S. boulardii* CNCM I-1079 ou de *L. helveticus* R0052 a permis de réduire significativement la colonisation colique par les EHEC ; les probiotiques ont par ailleurs modulé l'expression des gènes de la réponse inflammatoire au niveau colique et amélioré le score histologique de l'épithélium (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2015).

Figure 4 : Modes d'action possibles des microorganismes probiotiques ou antagonistes des EHEC chez le ruminant (d'après McAllister *et al.*, 2011)



IV.4. Autres stratégies

L'utilisation de bactériophages possédant une activité lytique est une stratégie de biocontrôle potentiellement intéressante pour réduire l'excrétion des STEC. Du fait de leur haute spécificité vis-à-vis de leurs cibles, il paraît nécessaire de combiner plusieurs types de phages pour élargir le spectre d'inhibition. Plusieurs produits sont actuellement commercialisés en Amérique du Nord, ciblant essentiellement les O157:H7 (Cox *et al.*, 2014). Cependant, la présence de bactériophages endémiques dans le tube digestif bovin, possédant eux-mêmes des activités lytiques contre les EHEC, rend l'interprétation des résultats d'efficacité de ces produits difficile (Kropinski *et al.*, 2012).

Le développement de vaccins spécifiques contre les O157:H7 a également été proposé. L'objectif est ici d'induire

une réponse mucoale dirigée contre les pathogènes afin de prévenir leur colonisation au niveau du tractus gastro-intestinal bovin. Les antigènes ciblés sont soit des protéines du système de sécrétion de type III, impliqué dans la formation des lésions d'attachement/effacement des villosités intestinales, soit des récepteurs membranaires bactériens impliqués dans la captation du Fer, ou des porines membranaires.

Les études conduites jusqu'à présent rapportent des résultats plutôt variables (Cox *et al.*, 2014). En effet, de nombreux facteurs (âge des animaux, dose(s) vaccinale(s), type d'adjuvants, sérotype ciblé) peuvent intervenir dans le succès de cette approche vaccinale. D'autres études sont donc nécessaires pour faire la preuve de l'efficacité de ces vaccins.

CONCLUSION

La sécurité des aliments d'origine bovine est un critère très important à prendre en compte par la filière viande qui se doit de proposer toutes les garanties possibles au consommateur. Dans le cas du risque STEC, de nombreux efforts ont déjà été faits mais la récente épidémie d'ampleur en Allemagne en 2011 et les nombreux cas sporadiques régulièrement enregistrés aux USA, ou en Europe, poussent à réfléchir à d'autres stratégies de prévention de la transmission du pathogène à l'homme. La réduction du portage animal des STEC apparaît une stratégie à privilégier car en limitant l'excrétion fécale en amont de la chaîne alimentaire, le risque

de contamination des produits animaux, en particulier la viande, pourrait ainsi être réduit. Dans ce contexte, le développement de solutions à base de microorganismes antagonistes est prometteur mais demande encore des efforts de recherche afin de démontrer, en particulier chez l'animal, leur efficacité. Il est probable qu'une approche intégrant des stratégies complémentaires (microorganismes antagonistes pour le TGI, vaccins, bactériophages, microorganismes antagonistes de la formation de biofilms STEC au niveau de la viande...) sera nécessaire pour réduire au maximum le risque sanitaire.

Références :

- Baines D., Sumarah M., Kuldau G., Juba J., Mazza A., Masson L. (2013). Aflatoxin, fumonisin and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in calves and the effectiveness of Celmanax®/Dairyman's Choice™ applications to eliminate morbidity and mortality losses. *Toxins* (Basel). 5(10), 1872-1895.
- Bertin Y., Chaucheyras-Durand F., Robbe-Masselot C., Durand A., de la Foye A., Harel J., Cohen P.S., Conway T., Forano E., Martin C. (2013). Carbohydrate utilization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. *Environ Microbiol.* 15(2), 610-622.
- Bertin Y., Deval C., de la Foye A., Masson L., Gannon V., Harel J., Martin C., Desvaux M., Forano E. (2014). The gluconeogenesis pathway is involved in maintenance of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. *PLoS One.* 9(6), e98367. doi: 10.1371/journal.pone.0098367.
- Bertin Y., Forano E. (2013). Sécurité microbiologique de la viande de bœuf. *VPC.* 30, 1-4.
- Bertin Y., Girardeau J.P., Chaucheyras-Durand F., Lyan B., Pujos-Guillot E., Harel J., Martin C. (2011). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* gains a competitive advantage by using ethanolamine as a nitrogen source in the bovine intestinal content. *Environ Microbiol.* 13(2), 365-377.
- Bertin Y., Habouzit C., Laurier M., Durand A., Duchez D., Segura A., Thévenot-Sergentet D., Dunière L., Baruzzi F., Chaucheyras-Durand F., Forano E. (2016). *Lactobacillus reuteri* suppresses enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine ruminal fluid. In: Proceedings of the 10th INRA Rowett Symposium, Clermont Ferrand, 20-22 juin.
- Bibbal D., Loukiadis E., Kérouédan M., Ferré F., Dilasser F., Peytavin de Garam C., Cartier P., Oswald E., Gay E., Auvray F., Brugère H. (2015). Prevalence of carriage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among slaughtered adult cattle in France. *Appl Environ Microbiol.* 81(4), 1397-1405.
- Chagnot C., Caccia N., Loukiadis E., Ganet S., Durand A., Bertin Y., Talon R., Astruc T., Desvaux M. (2014). Colonization of the meat extracellular matrix proteins by O157 and non-O157 enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol.* 188, 92-98.
- Chaucheyras-Durand F., Durand H. (2010). Probiotics in animal nutrition and health. *Benef Microb.* 1(1), 3-9.
- Chaucheyras-Durand F., Faqir F., Ameilbonne A., Rozand C., Martin C. (2006). Fates of acid-resistant and non-acid-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in ruminant digestive contents in the absence and presence of probiotics. *Appl Environ Microbiol.* 72(6), 4136-4142.
- Chaucheyras-Durand F., Madic J., Doudin F., Martin C. (2010). Biotic and abiotic factors influencing in vitro growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminant digestive contents. *Appl Environ Microbiol.* 76(3), 640-647.
- Chaucheyras-Durand F., Verdier C., Matrat S., Rousseau V., Jubelin G., Gobert A.P. (2015). Protective effect of *Lactobacillus helveticus* R052 and *Saccharomyces boulardii* I-1079 against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection. *VTEC 2015*, Boston (USA), 13-16 septembre.
- Chekabab S.M., Daigle F., Charette S.J., Dozois C.M., Harel J. (2013). Shiga toxins decrease enterohaemorrhagic *Escherichia coli* survival within *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol Lett.* 344(1), 86-93.
- Cox E., Melkebeek V., Devriendt B., Goddeeris B.M., Vanrompay D. (2014). Vaccines against enteric *Escherichia coli* infections in animals. DOI: 10.13140/2.1.3181.1526.
- Dunière L., Gleizal A., Chaucheyras-Durand F., Chevallier I., Thévenot-Sergentet D. (2011). Fate of *Escherichia coli* O26 in corn silage experimentally contaminated at ensiling, at opening or after aerobic exposure and protective effect of various bacterial inoculants. *Appl Environ Microbiol.* 77(24), 8696-8704.
- Dunière L., Sindou J., Chaucheyras-Durand F., Chevallier I., Thévenot-Sergentet D. (2013). Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. Mini review. *Anim Feed Sci Technol.* 183, 1-15.
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal.* 13(12):4329, 191 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4329.
- Fremaux B., Prigent-Combaret C., Vernozy-Rozand C. (2008). Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an updated review. *Vet Microbiol.* 132(1-2), 1-18.
- Gedek B. R. (1999). Adherence of *Escherichia coli* Serogroup O 157 and the *Salmonella typhimurium* Mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. *Mycoses.* 42 (4), 261-264.
- Hughes D.T., Terekhova D.A., Liou L., Hovde C.J., Sahl J.W., Patankar A.V., Gonzalez J.E., Edrington T.S., Rasko D.A., Sperandio V. (2010). Chemical sensing in mammalian host-bacterial commensal associations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(21), 9831-9836.
- Keen J.E., Laegreid W.W., Chitko-McKown C.G., Durso L.M., Bono J.L. (2010). Distribution of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157 in the gastrointestinal tract of naturally O157-shedding cattle at necropsy. *Appl Environ Microbiol.* 76(15), 5278-5281.
- King L.A., Loukiadis E., Mariani-Kurkdjian P., Haeghebaert S., Weill F.X., Baliere C., Ganet S., Gouali M., Vaillant V., Pihier N., Callon H., Novo R., Gaillot O., Thevenot-Sergentet D., Bingen E., Chaud P., de Valk H. (2014). Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:[H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011. *Clin Microbiol Infect.* 20(12), O1136-1144.
- Kropinski A.M., Lingohr E.J., Moyles D.M., Ojha S., Mazzocco A., She Y.M., Bach S.J., Rozema E.A., Stanford K., McAllister T.A., Johnson R.P. (2012). Endemic bacteriophages: a cautionary tale for evaluation of bacteriophage therapy and other interventions for infection control in animals. *Virol J.* 9, 207.

- Medellin-Peña M.J., Griffiths M.W. (2009). Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. *Appl Environ Microbiol.* 75, 1165-1172.
- Medellin-Peña M.J., Wang H., Johnson R., Anand S., Griffiths M.W. (2007). Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 73, 4259-4267.
- McAllister T.A., Beauchemin K.A., Alazeh A.Y., Baah J., Teather R.M., Stanford K. (2011). Review: The use of direct fed microbials to mitigate pathogens and enhance production in cattle. *Can J Anim Sci.* 91,193-211.
- Ogunade I.M., Kim D.H., Jiang Y., Weinberg Z.G., Jeong K.C., Adesogan A.T. (2016). Control of *Escherichia coli* O157:H7 in contaminated alfalfa silage: Effects of silage additives. *J Dairy Sci.* 99(6), 4427-4436.
- Omisakin F., MacRae M., Ogden I.D., Strachan N.J. (2003). Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. *Appl Environ Microbiol.* 69(5), 2444-2447.
- Pacheco A.R., Sperandio V. (2012). Shiga toxin in enterohemorrhagic *E.coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. *Front Cell Infect Microbiol.* 2, 81, doi: 10.3389.
- Pedroso A.F., Adesogan A.T., Queiroz O.C., Williams S.K. (2010). Control of *Escherichia coli* O157:H7 in corn silage with or without various inoculants: efficacy and mode of action. *J Dairy Sci.* 93(3),1098-1104.
- Persad A.K., LeJeune J.T. (2014). Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 2(4), EHEC-0027-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0027-2014.
- Pifer R., Sperandio V. (2014). The Interplay between the Microbiota and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 2(5), doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0015-2013.
- Sherman P. M., Johnson-Henry K. C., Yeung H. P., Ngo P. S. C., Goulet J., Tompkins T.A.(2005). Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect Immun.* 73 (8), 5183-5188.
- Tabé E.S., Oloya J., Doetkott D.K., Bauer M.L., Gibbs P.S., Khaita M.L. (2008). Comparative effect of direct-fed microbials on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in naturally infected feedlot cattle. *J Food Prot.* 71(3),539- 544.
- Thévenot J., Cordonnier C., Rougeron A., Le Goff O., Nguyen H.T., Denis S., Alric M., Livrelli V., Blanquet-Diot S. (2015). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection has donor-dependent effect on human gut microbiota and may be antagonized by probiotic yeast during interaction with Peyer's patches. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99(21),9097-9110.
- Jelčić I., Hüfner E., Schmidt H., Hertel C. (2008). Repression of the locus of the enterocyte effacement-encoded regulator of gene transcription of *Escherichia coli* O157:H7 by *Lactobacillus reuteri* culture supernatants is LuxS and strain dependent. *Appl Environ Microbiol.* 74, 3310-3314.
- Tkalcic S., Zhao T., Harmon B.G., Doyle M.P., Brown C.A., Zhao P. (2003). Fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in weaned calves following treatment with probiotic *Escherichia coli*. *J Food Prot.* 66, 1184-1189.
- Xu Y., Dugat-Bony E., Zaheer R., Selinger L., Barbieri R., Munns K., McAllister T.A., Selinger LB. (2014). *Escherichia coli* O157:H7 super-shedder and non-shedder feedlot steers harbour distinct fecal bacterial communities. *PLoS One.* 9(5), e98115. doi: 10.1371/journal.pone.0098115.
- Zhao T., Tkalcic S., Doyle M.P., Harmon B.G., Brown C.A., Zhao P. (2003). Pathogenicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves and evaluation of fecal shedding by treatment with probiotic *Escherichia coli*. *J Food Prot.* 66, 924-930.