

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***
N° d'ordre 576

Thèse

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

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

(SPÉCIALITÉ : NUTRITION ET SCIENCES DES ALIMENTS)

soutenue le 14 Février 2012

LYSIANE DUNIERE

**Stratégies de limitation du portage sain des *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) par les bovins.
Potentiel bio-protecteur des bactéries lactiques en
alimentation animale.**

Président : M. Jean-Marc Lobaccaro, Professeur Université Blaise Pascal

Membres : Mme Valérie Livrelli, Professeur Université d'Auvergne

Mme Frédérique Chaucheyras-Durand, Chargée de Recherche Lallemand, Theix

Mme Isabelle Chevallier, Professeur VetAgro Sup, Clermont-Ferrand

Mme Delphine Thévenot-Sergentet, Maître de Conférence, VetAgro Sup, Lyon

Rapporteurs : M. Djamel Drider, Professeur Université de Lille 1 (USTL), IUT « A »

M. Jean-Pierre Guyot, Directeur de Recherche IRD, Montpellier

UR 2011.03.100 « Consommateur-Aliments Typiques-Sécurité Santé »

« Tout chercheur est un révolutionnaire professionnel. »

(C. Saint-Simon)

Remerciements à...

Messieurs et Mesdames les membres du jury :

Monsieur le Professeur Jean-Marc Lobaccaro, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Qu'il reçoive ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

Madame le Professeur Isabelle Chevallier, Directrice de thèse. Qu'elle reçoive toute l'expression de notre reconnaissance pour nous avoir proposé ce sujet de recherche ainsi que pour son dynamisme et ses connaissances scientifiques qui ont permis d'enrichir cette thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

Madame le Docteur Delphine Thévenot-Sergentet, co-Directrice de thèse. Nous tenions à la remercier pour son encadrement, ses nombreux conseils et ses compétences scientifiques qui nous auront aidés tout au long de ce travail de thèse. Merci pour son soutien, ses nombreux encouragements et sa confiance !

Madame le Professeur Valérie Livrelli, Monsieur le Professeur Djamel Drider et Monsieur le Directeur de Recherche Jean-Pierre Guyot, pour avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Nous sommes reconnaissants pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et nous tenons à leur exprimer à cet égard nos sincères remerciements. Nous sommes également reconnaissants de l'honneur et du plaisir qu'ils nous ont fait en participant ainsi au jury de notre thèse.

Madame le Chargée de Recherche Frédérique Chaucheyras-Durand. Nous sommes très sensibles à sa présence dans ce jury et nous tenons sincèrement à la remercier pour son soutien durant notre cursus scientifique. Nous sommes reconnaissants de l'honneur et du plaisir qu'elle nous a fait en participant au comité de pilotage et au jury de notre thèse. Nous tenons à lui assurer toute notre admiration et notre amitié.

Que chacun d'entre vous soit vivement remercié de nous avoir fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury, et le plaisir d'assister à notre soutenance. Recevez ici, l'expression de notre respectueuse gratitude pour l'attention et l'intérêt que vous avez portés à ce travail.

Mes sincères remerciements vont tout particulièrement à **Marie-Laure Delignette-Muller**, pour son aide précieuse tout au long de ce travail, sa patience que j'ai mise à rude épreuve, et ses encouragements.

Je remercie également **Christine Martin**, pour ses conseils avisés ainsi que pour sa participation au comité de pilotage.

J'exprime mes sincères remerciements à **Julien Sindou**, pour son aide et ses conseils qui ont assuré la réussite de notre collaboration.

J'exprime ma plus sincère gratitude à **Christine Rozand**, qui m'a accueillie initialement au sein de ce laboratoire, et qui m'a donné le goût de la recherche. Merci pour son dynamisme et ses compétences scientifiques et humaines qui ont contribué à me lancer dans cette aventure.

J'adresse mes sincères remerciements à **Xavier Nesme** pour ses conseils avisés et ses nombreuses remarques pertinentes ainsi que pour sa disponibilité.

Je remercie également, l'équipe de QSA : **Alain Gonthier, Sylvie Mialet** et plus particulièrement **Pierre Demont** pour m'avoir fait confiance et permis de m'essayer au métier de l'enseignement.

Mes remerciements vont à l'équipe de Lyon :

Sarah et Marion, pour tous les bons moments passés ensemble, les fous rires, les séances de Calicéo, les « dégustations » du RU, nos magnifiques chansons au milieu du labo et tout le reste !
Merci, sans vous ça n'aurait pas été pareil !

Merci aussi à Audrey, sans qui je n'aurais pas pu venir à bout de mes manip. Merci à sa patience devant des milliers de boîtes de Pétri et merci à ses meringues d'encouragements.

Merci à Fanny, qui m'a précédée dans cette aventure doctorale !! Merci aussi pour ton soutien ta gentillesse et ton humour. Merci à Steph et Manue, mes colocs de bureau, pour toutes les discussions scientifiques (ou pas !!) qu'on a eu au cours des longues journées de labo ! Merci à Manue pour sa relecture attentive et ses encouragements. Merci à Steph pour ses précieux conseils biomoléculaires.

Merci à Delphine plus particulièrement !! Merci à Estelle, aux Christine's, à Franck, Julie, Patrice, Anthony, Cécile, Françoise, et à tous ceux qui ont fait des apparitions plus ou moins longues dans le labo : Brigitte, Béa, Elise, tous les stagiaires et particulièrement les « miens » : Romain, Karine, Jérémy et Laurence.

Sans oublier l'équipe de Clermont : Isabelle, Julien, Caroline, Armel, Arlette, Karine et tout le reste de l'équipe, qui m'ont accueillie dans leurs locaux avec beaucoup de gentillesse et de sympathie.

Merci aux thésards de l'Ecole véto, pour leur soutien inconditionnel et leur bonne humeur !

*« On ne doit pas escamoter l'incompréhensible, mais non plus s'en servir comme d'une
explication.»*

(Jean Rostand)

Je dédicace cette thèse...

A mes parents qui m'ont toujours soutenue, encouragée et qui m'ont donné toutes les chances pour réussir. Merci pour tout !

A mon grand-père qui m'a appris à capturer les neurones...

A ma sœur, pour son soutien sans faille.

A ma famille dans son ensemble, parce que même si on ne la choisit pas, la mienne est exceptionnelle !

A Tony, avec qui je me suis construite, et qui m'aura apporté tellement de choses. Que notre complicité dure encore longtemps !

A Julian, pour m'aider à voir la vie en jaune et violet (le rose étant trop cliché !). Merci pour sa présence à mes côtés et tous ces moments passés ensemble qui me sont précieux.

A mes amis, qui m'ont entourée durant cette aventure, en vrac et sans aucune priorité : Moum, So, Fan, Ju, Seb, Pop's ; à tous mes nombreux colocs qui ont illuminé ma vie au quotidien (Lulu, Mel, Sté, Pilou, Andréane, Nico, Stephen, Maxime, Aurélien, Arnaud du CDT, Vic, Lassina, Jérôme...), à tous les amis que je vois moins mais qui ne sont pas plus loin de mon cœur pour autant (Sarah, Gaétan, Step qui m'a accueillie au moment où j'en avais vraiment besoin, Tiennou, Lucile, Mathieu, Baubaude-Daph et l'équipe ardéchoise, Sylvain, Manon et tous ceux que je ne peux pas nommer sous peine d'écrire l'équivalent d'un chapitre de thèse...).

A ma lulu, pour son incroyable énergie qui fait qu'elle peut renverser les montagnes que la vie met sur notre chemin.

Merci à tous pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble et qui ont, sans aucun doute, contribué au bon déroulement de ma vie pendant ces 3 dernières années et par conséquent à la réussite de cette thèse.

A toutes ces nouvelles arrivées sous forme de bébés : Enora, Morgane, Gaétan, Pauline, et tous les autres en cours !

« Plus une découverte est originale, plus elle semble évidente par la suite. »

(Arthur Koestler)

RESUME

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-Toxines (STEC) sont responsables de maladies humaines sévères. Les ruminants sont considérés comme étant leur principal réservoir. La dissémination des STEC au sein des élevages est liée en partie à l'alimentation des animaux et donc potentiellement à l'ingestion d'ensilages contaminés.

Les bactéries lactiques peuvent être employées comme agents technologiques ou dans des stratégies de bio-protection. Sur le plan de l'ensilage, elles jouent un rôle de préservation mais peuvent également représenter une barrière à la survie de pathogènes comme les STEC.

Ce travail a permis de sélectionner des bactéries lactiques inhibitrices de la croissance de divers sérogroupes de STEC. Les études de compétitions ont mis en évidence un phénomène bactéricide sur certaines souches, dont le mécanisme reste encore non élucidé.

Le potentiel inhibiteur des bactéries lactiques sélectionnées a été testé indépendamment dans des ensilages de maïs contaminés à différentes étapes de leur réalisation : à la mise en silos, à l'ouverture ou après une période d'exposition aérobie.

En cas de contamination à la mise en silos, les souches de STEC testées n'ont pas survécu dans des ensilages correctement menés. Une souche de *Ln. mesenteroides* a permis de limiter la survie des souches de STEC dans les ensilages contaminés à l'ouverture. Cependant, après 144h d'aération, aucun additif n'a montré d'effet protecteur avéré.

Le contrôle de l'alimentation animale afin de limiter l'entrée des STEC dans le cycle épidémiologique pourrait donc passer par l'emploi de bactéries lactiques ; sans négliger cependant les Bonnes Pratiques nécessaires à la réalisation de l'ensilage.

Mots-clés : STEC, bactéries lactiques, ensilage, inhibition, Bonnes Pratiques.

Laboratoire d'accueil : Unité CALITYSS, Equipe EMSA, LMAP/LNR STEC

VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon

Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile

Title: Limitation of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) asymptomatic carriage by cattle, bio-protective potential of Lactic Acid Bacteria in cattle feed.

ABSTRACT

Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) are responsible for severe human diseases. Cattle are considered as the main reservoir of this pathogen. STEC dissemination in farm environment is linked to cattle feed and potentially to ingestion of contaminated silage.

Lactic Acid Bacteria (LAB) could be employed as starters in fermentations or in strategies of bioprotection. In silage, LAB play a preservative role and could also represent a barrier for the survival of pathogenic bacteria such as STEC.

The selection of LAB strains, able to inhibit the growth of several serogroups of STEC strains, was performed in this study. Competitions assays have shown a bactericidal effect on some STEC strains, but reasons of this phenomenon remain unclear.

Inhibiting potential of the selected LAB strains was tested independently in corn silages contaminated at different steps of their realizations: at ensiling, at opening or after aerobic exposure.

In case of contamination at ensiling, STEC strains tested did not survive in well-made silages. A *Ln. mesenteroides* strain allowed the limitation of the STEC strains survival in silage contaminated at opening. However, after 144 h of aerobic exposure, no inoculant showed any protective effect.

Control of cattle feed, in order to limit STEC entry in their epidemiological cycle, could be reached through LAB utilization; however, Good Manufacturing Practices involved in silage making should not be omitted.

Key words: STEC, Lactic Acid Bacteria, silage, inhibition, Good Manufacturing Practices.

Table des Matières

<i>Remerciements à</i>	5
Liste des Tableaux :	20
Liste des Figures :	21
Liste des abbréviations.....	24
Liste des annexes :	25
Avant-propos	27
MEMOIRE BIBLIOGRAPHIQUE.....	33
Chapitre 1 : Les <i>Escherichia coli</i> producteurs de Shiga-toxines (STEC)	35
1. Généralités sur les STEC	35
1.1 Caractères généraux de l'espèce <i>Escherichia coli</i>	35
1.2 Classification des <i>E. coli</i> en pathotypes responsables de troubles intestinaux	37
2. Pathogénie.....	41
2.1 Les facteurs de virulence des STEC	41
2.2 Pathologies humaines associées aux STEC.....	44
2.3 Epidémiologies.....	45
3. Cycle épidémiologique	49
3.1 Réservoir des STEC	49
3.2 Prévalence dans l'environnement de la ferme.....	52
3.3 Mode de transmission à l'homme	54
4. Stratégies de limitation de la présence des STEC au sein du réservoir animal	57
4.1 Actions globales.....	57
4.2 Actions ciblées :	61
Points clés	74
Chapitre 2. Les bactéries lactiques	75
1. Principales caractéristiques physiologiques.....	75
1.1.Taxonomie, classification et phylogénie.....	75
1.2 Brève présentation des principaux genres utilisés dans ce travail.....	80
1.3. Génomes	82
2. Métabolisme	83
2.1 Les voies fermentaires	84
2.2 Production de substances à activité antimicrobienne.....	87
3. Utilisation des bactéries lactiques.....	92

3.1 Utilisation directe en tant que probiotiques.....	92
3.2 Ajout des bactéries lactiques dans les produits d'alimentation humaine ou animale	96
Points clés	104
Chapitre 3: L'ensilage	105
1. Généralités.....	105
2. Fabrication de l'ensilage et rôle des différents groupes microbiens.	106
2.1 La phase aérobie.....	107
2.2 La phase fermentaire.....	108
2.3 La phase de stockage	109
2.4 Le désilage.....	109
3. Qualité nutritionnelle de l'ensilage	110
4. Les microorganismes indésirables.....	111
4.1 Les bactéries	111
4.2 Les eucaryotes.....	116
5. Stratégies de conservation de l'ensilage et limitation de l'impact économique et sanitaire	117
5.1. Les Bonnes Pratiques d'Ensilage (BPE).....	118
5.2 Les agents d'ensilages	121
Points clés :.....	128
6. Valorisation.....	129
Conclusion du mémoire bibliographique.....	131
MEMOIRE EXPERIMENTAL	133
Chapitre 4 : Etude <i>in vitro</i>	135
1. Matériel et méthodes	135
1.1 Matériel	135
1.2 Méthodes	142
2. Résultats.....	148
2.1Caractérisation des souches de STEC :	148
2.2 Etude de la proximité génétique des souches.....	148
2.3 Criblage sur gélose du potentiel inhibiteur des bactéries lactiques	152
2.3 Identification des produits responsables de l'inhibition.....	156
2.4 Cinétiques d'inhibition.....	159
3. Discussion.....	164
4. Valorisation des résultats obtenus.....	170
4.1 Publication prévue (Voir Annexe 2).....	170
4.2 Poster (Voir Annexe 3)	170

4.3 Communication orale n°1 (Voir Annexe 4).....	171
4.4 Communication orale n°2 (Voir Annexe 5).....	171
Chapitre 5 : Etude <i>in situ</i>	173
1. Matériel et méthodes	173
1.1 Matériel	173
1.2 Méthodes	175
2. Résultats.....	181
2.1 Etude <i>in situ</i> 1 : Devenir des <i>E. coli</i> O26 pendant la période de stockage en présence de divers inoculants bactériens.....	181
2.2 Etude <i>in situ</i> 2 : Devenir des <i>E. coli</i> O26 dans des ensilages de maïs préalablement traités avec divers inoculants bactériens lors d'une contamination à l'ouverture des silos.....	185
3. Discussion.....	193
4. Valorisation des résultats obtenus.....	201
4.1 Publication n°1 (Voir annexe 6).....	201
4.2 Poster n°2 (Voir Annexe 7).....	201
CONCLUSION	203
1. Identification de bactéries lactiques inhibitrices de diverses souches de STEC.....	205
2. Informations sur l'écologie des STEC dans l'ensilage.....	207
3. Potentiel bio-protecteur des bactéries lactiques envers les STEC dans l'ensilage.....	208
4. Utilisation des bactéries lactiques.....	209
BIBLIOGRAPHIE	215
ANNEXES	249

Liste des Tableaux :

Tableau 1 : Principaux critères différentiels des espèces du genre <i>Escherichia</i> d'après Grimont (1987).....	36
Tableau 2 : Principales épidémies dues au STEC dans le monde depuis 2000 avec une attention particulière pour les épidémies ayant eu lieu en France.....	48
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des études menées sur l'effet du régime alimentaire sur l'excrétion des STEC chez les bovins. Les conséquences sont observées par rapport au changement de : Régime initial → Régime modifié.....	63
Tableau 4 : Récapitulatif des études menées en inoculant des probiotiques aux animaux et en suivant l'excrétion d' <i>E. coli</i> dans les fèces.....	69
Tableau 5 : Principales caractéristiques biologiques et métaboliques des bactéries lactiques d'après Axelsson (1998)	78
Tableau 6 : Valeurs physico-chimiques dans l'ensilage de maïs en fonction de la teneur en matière sèche (MS) initiale, issus de INRA (2010).....	109
Tableau 7 : Valeurs nutritionnelles de l'ensilage de maïs en fonction des conditions de végétation, issus de INRA (2010).....	119
Tableau 8 : Effet des différents inoculants bactériens étudiés pour améliorer la conservation de l'ensilage, excepté <i>Lactobacillus buchneri</i> seul*.....	125
Tableau 9 : Genre, nombre et collection d'origine des souches de bactéries lactiques utilisées	136
Tableau 10 : Cible, gènes et références des réactions PCR utilisées pour la caractérisation.	137
Tableau 11 : Caractéristiques des souches STEC utilisées.....	138
Tableau 12 : Identification du genre ou de l'espèce des 23 souches considérées comme inhibitrices des 7 STEC testées dans la première partie du criblage.....	153
Tableau 13 : Genre ou espèce, agent inhibiteur identifié et concentration en acide lactique et acide acétique pour les 6 souches de bactéries lactiques inhibitrices des 36 souches de STEC.	159
Tableau 14 : Caractéristiques des souches STEC utilisées.....	163
Tableau 15 : Genre ou espèce, métabolisme fermentaire et collection d'origine des 8 souches de bactéries lactiques utilisées.....	173
Tableau 16 : Origine, sérotype et facteurs de virulence des souches de STEC testées.	174
Tableau 17 : Dénombrement et détection des souches de <i>E. coli</i> O26 dans les différents sacs-silos aux jours 0, 5, 8, 21 et 90 après mise en silo (n=3).....	184
Tableau 18 : Valeurs nutritionnelles moyennes des mini-silos et P-value des inoculants testés.	186
Tableau 19 : Dénombrement et détection des souches de <i>E. coli</i> O26 dans les mini-silos 24 et 48 heures après contamination à l'ouverture (n=3).....	190

Liste des Figures :

Figure 1 : Pathogénies associées aux 6 classes d' <i>E. coli</i> responsables de diarrhées d'après Nataro & Kaper (1998).	38
Figure 2 : Diagramme de Venn illustrant le système de classification actuel des AEEC/EPEC/STEC/EHEC à partir des signes cliniques et des facteurs de virulence associés aux souches d' <i>E. coli</i> d'après Naylor et al. (2005).	40
Figure 3 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines d'après Vernozy-Rozand & Montet (2001).	42
Figure 4 : Systèmes d'acido-résistance dépendant d'acides aminés chez <i>E. coli</i> : système arginine décarboxylase et système glutamate décarboxylase.	44
Figure 5 : Histogramme représentant les principaux sérogroupes de STEC responsables de SHU (%) chez l'enfant de moins de 15 ans (données de coproculture), France, 1996-2009.	47
Figure 6 : Schéma du tractus digestif d'un ruminant, issue de Barone (1997).	51
Figure 7 : Flux potentiel des STEC (AFSSA, 2003).	55
Figure 8 : Arbre consensus, basé sur la comparaison de séquence d'ARNr 16S, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques ayant un faible contenu mol% de G+C dans l'ADN ainsi que les bactéries Gram positives non reliées des genres <i>Bifidobacterium</i> et <i>Propionibacterium</i> (Holzapfel et al., 2001).	79
Figure 9 : Arbre phylogénétique des <i>Lactobacillales</i> construit sur la base des alignements concaténés de protéines ribosomales (Makarova et al., 2006).	80
Figure 10 : Voies homofermentaire, hétérofermentaire ou bifide de la dégradation du glucose. .	85
Figure 11 : Schéma de fermentation des acides mixtes (d'après Cocaign-Bousquet et al., 1996). .	86
Figure 12 : Mode d'action des bactériocines produites par les bactéries lactiques (Cotter et al., 2005).	90
Figure 13 : Représentation schématique des différents moyens par lesquels un probiotique peut contrôler un microorganisme pathogène.	94
Figure 14 : Mode d'action des bactéries probiotiques chez les ruminants (McAllister et al., 2011).	96
Figure 15 : Arbre décisionnel utilisée pour l'évaluation de l'innocuité d'une souche microbienne utilisée dans le secteur agro-alimentaire (AFSSA, 2002).	98
Figure 16 : Evolution théorique des teneurs en oxygène, des valeurs de pH et des populations microbiennes aux différentes étapes du processus d'ensilage, d'après Pitt & Sniffen (1985). ...	110
Figure 17 : Arbre décisionnel des modalités d'identification des produits responsables de l'inhibition portant sur la question de la croissance des STEC, (« oui » traduisant une croissance des STEC et « non » une absence de croissance) d'après Yaakoubi et al. (2009).	144
Figure 18 : Dendrogramme des profils de champs pulsés des souches de STEC obtenus avec l'enzyme <i>XbaI</i> en utilisant un coefficient de Dice de 1,5% et la méthode UPGMA.	149

Figure 19 : Dendrogrammes des profils MLVA des souches de STEC obtenus en utilisant le coefficient Categorical et l’algorithme de Ward.....	151
Figure 20 : Boîte à moustaches représentant la taille des zones d’inhibition (mm) observées lors du criblage des 268 bactéries lactiques envers 7 souches de STEC en triplicata.....	152
Figure 21 : Boîte à moustaches représentant la taille des zones d’inhibition (mm) observées lors du criblage des 23 bactéries lactiques envers 36 souches de STEC en fonction de leur séro groupe (21a) ou de leur origine (21b) en triplicata.....	154
Figure 22 : Boîte à moustaches de la taille des zones d’inhibition (mm) observées lors du criblage des 6 bactéries lactiques envers 36 souches de STEC en triplicata.	155
Figure 23 : Distribution des effets aléatoires estimés pour les facteurs bactéries lactiques (23a) et STEC (23b) avec les 3 groupes de sensibilité associés (A, B and C).....	156
Figure 24 : Moyenne des cinétiques de croissance pour les souches de STEC des groupes A, B et C (n = 3), en présence de chacun des surnageants de culture des 6 bactéries lactiques.	157
Figure 25 : Cinétiques de croissance des 3 souches de <i>E. coli</i> du groupe C (60.1, 116.1 et 435) testées en triplicata, en présence de chacun des 6 surnageants de cultures des bactéries lactiques ; SUR 1 surnageant seul (25a), SUR 3 surnageant traité avec la pepsine (25b) et SUR 2 surnageant neutralisé (25c).	158
Figure 26 : Croissance des souches de STEC A (C08), B (6352) et C (60.1) et de la bactérie lactique 6A1MLb4 (LAB) lors des co-inoculations ou en culture pure.....	160
Figure 27: Dénombrements et modélisation des co-inoculations de la bactérie lactique 6A1MLb4 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> et des 9 souches de STEC appartenant aux trois groupes de sensibilité A, B et C.	162
Figure 28 : Schéma récapitulatif du protocole d’ensemble suivi pour l’étude <i>in situ</i>	176
Figure 29 : Evolution des valeurs de pH dans les différents sacs-silos au cours de la période de stockage.	181
Figure 30 : Evolution de la teneur en matière sèche dans les différents sacs-silos au cours de la période de stockage.	182
Figure 31 : Dénombrement de la population totale de bactéries lactiques dans les différents sacs-silos au cours de la période de stockage.....	183
Figure 32 : Histogramme comparatif des valeurs nutritionnelles attendues pour un ensilage de maïs de très bonne qualité (INRA 2010) et valeurs moyennes obtenues dans les mini-silos (n = 26).	187
Figure 33 : Evolution des valeurs de pH au cours des 48 premières heures après ouverture dans les silos A (33a), B (33b) et C (33c), contaminés avec les 3 souches de <i>E. coli</i> 60.1, 114.2 et 4198.1.....	188

Figure 34 : Moyenne des dénombrements des souches de *E. coli* 60.1, 114.2 et 4198.1 dans les silos préalablement traités avec diverses souches de bactéries lactiques lors d'une contamination 144 h après ouverture (n = 3)..... 192

Liste des abbréviations

AEEC ou EAEC	Attaching and Effacing <i>E. coli</i>
AGV	Acides Gras Volatils
ANSES (anciennement AFSSA)	Agence nationale de Sécurité sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
BPE	Bonnes Pratiques d'Ensilage
DGAI	Direction Générale de l'Alimentation
EFSA	European Food Safety Authority
EHEC	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>
EPS	Exopolysaccharides
GRAS	Generally Recognized As Safe
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
InVS	Institut de Veille Sanitaire
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
MLVA	Multi-Locus VNTR Analysis
MS	Matière Sèche
PCR	Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis (électrophorèse en champs pulsé)
PTT	Purpura Thrombotique et Thrombocytopénique
QPS	Qualified Presumption of Safety
RT-PCR	Real-Time PCR (PCR en temps réel)
SHU	Syndrome Hémolytique et Urémique
STEC	Shiga-toxin producing <i>E. coli</i>
UFC	Unité Formant Colonie
VBNC	Viable Bacteria Non Culturable
VNTR	Variable Number Tandem Repeat

Liste des annexes :

Annexe 1 : Publication soumise à *Animal Feed Sciences and Technology* : « Silage processing and strategies to limit degradation due to undesirable microorganisms ».

Annexe 2 : Publication soumise prochainement à *Applied and Environmental Microbiology* : « Study of Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) growth inhibition *in vitro* by Lactic Acid Bacteria and characterization of the inhibition mechanism. »

Annexe 3 : Poster n°1 : « Study of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* growth inhibition by Lactic Acid Bacteria ».

Annexe 4 : Communication orale n°1 : « Etude de l'inhibition de croissance de souches d'*Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) par des bacteries lactiques. »

Annexe 5 : Communication orale n°2 : « Etude de l'inhibition de croissance des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) par des bacteries lactiques. »

Annexe 6 : Publication dans *Applied and Environmental Microbiology* : "Fate of *Escherichia coli* O26 in corn silage experimentally inoculated at ensiling, at silo opening, or after aerobic exposure, and protective effect of various bacterial inoculants".

Annexe 7 : Poster n°2 : "Pathogenic *E. coli* O26 survival in corn silage at two stages of contamination and protective effect of bacterial inoculants".

Laboratoire d'accueil

Les travaux de recherche présentés dans ce document ont été réalisés dans l'Unité de Recherche « Consommateur-Aliments Typiques-Sécurité Santé » (CALITYSS) UR2011.03.100, dirigée par Madame le Professeur Isabelle Chevallier, de l'Institut d'enseignement supérieur et de recherche en alimentation, santé animale, sciences agronomiques et de l'environnement, VetAgro Sup. Au sein de cette unité, l'équipe « Ecologie Microbienne et Sécurité Sanitaire des Aliments » (EMSA), dirigée par Madame le Docteur Delphine Thévenot, s'intéresse à l'étude des interactions microbiennes entre bactéries lactiques, *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) et *Pseudomonas*. Il s'agit plus précisément d'apporter des informations concernant les mécanismes d'interactions pouvant exister entre ces flores. Une partie des activités de recherche de cette unité propre est déléguée par le Laboratoire National de Référence (LNR) des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines.

Mon travail de thèse s'intègre dans 2 des 3 axes présentés ci-dessus : l'étude des flores technologiques et la thématique de recherche relative aux STEC sous la direction d'Isabelle Chevallier (Directrice de thèse) et de Delphine Thévenot (Co-Directrice de thèse). Ce travail a été en partie financé par le pôle ESTIVE, ayant pour objectif d'associer les structures de développement du territoire dans le domaine de l'agriculture et de l'agro-alimentaire. Une partie de ces travaux de recherche a été réalisée avec la participation financière de la Direction générale de l'Alimentation (DGAL).

Problématiques de Recherche de l'équipe

Problématique relative aux STEC :

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont considérés comme des pathogènes émergents en santé publique. Ces bactéries sont responsables d'épidémies alimentaires de grande ampleur aux conséquences parfois gravissimes. Durant ces trente dernières années, notre connaissance de l'épidémiologie des STEC a considérablement évolué, et il a été montré que les flux potentiels de contamination de l'homme étaient complexes et impliquaient de nombreuses étapes.

Les contaminations humaines sont principalement liées à la consommation d'aliments crus ou insuffisamment cuits mais peuvent également être dues à un simple contact avec un animal porteur ou son environnement. Les ruminants, et plus particulièrement les bovins, constituent le réservoir animal des STEC, et il a été montré que ces pathogènes peuvent survivre de manière durable dans l'environnement de l'élevage (sol, fèces, aliments...). L'excrétion des STEC dans l'environnement par les animaux porteurs *via* les fèces, constitue la principale voie d'introduction de ces bactéries en élevage. Les aliments et l'eau de boisson sont également une source potentielle de (re)contamination des animaux.

Cette capacité à survivre pendant de longues durées contribue au risque de dissémination des STEC au sein des troupeaux et entretient le portage sain par les ruminants.

Afin de limiter les risques de contamination humaine par les STEC, il est nécessaire de s'intéresser aux différentes étapes du cycle épidémiologique situées en amont de l'homme. Ainsi, ce travail de thèse s'est focalisé sur la niche environnementale de l'élevage et plus particulièrement sur le plan des aliments pour bétail tels que l'ensilage.

Problématique relative aux bactéries lactiques

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble très vaste de microorganismes ayant la capacité de produire de l'acide lactique par métabolisme fermentaire. Les bactéries lactiques sont utilisées depuis de très nombreuses années en tant qu'agents technologiques, notamment dans des opérations de fermentation des aliments. Elles sont aussi utilisées comme agent de bio-protection dans un intérêt sanitaire. Les bactéries lactiques ont fait preuve d'un potentiel protecteur au travers de compétitions ou par la production de substances à effet antimicrobien. Elles sont d'ores et déjà employées fréquemment à des fins préventives dans divers aspects de notre vie quotidienne (lait fermenté améliorant le transit intestinal, amélioration de la conservation de produits de la mer...).

La sécurité sanitaire des aliments est une priorité incontournable pour les états et organismes internationaux tels que la FAO (Food and Agriculture Organization) ou la WHO (World Health Organization). Actuellement, il y a une demande de plus en plus forte de la part des consommateurs pour obtenir des produits moins transformés, utilisant moins d'agents de protection chimique. C'est pourquoi, l'utilisation de bactéries lactiques pour garantir la sécurité alimentaire des produits est favorablement perçue par les consommateurs. Ce travail de thèse s'est ainsi intéressé à l'étude du potentiel bio-protecteur des bactéries lactiques dans un type d'aliment pour bétail : l'ensilage.

Problématique des travaux de thèse :

L'ensilage est un des nombreux points communs existants entre ces 2 thématiques de recherche. Cette technique de conservation des cultures par fermentation permet de conserver la valeur nutritionnelle de l'aliment initial, tout en garantissant la sécurité sanitaire du produit fini. L'ensilage fait partie de l'alimentation des ruminants et cet écosystème constitue un possible moyen de maîtrise du portage sain des STEC par les ruminants. Bien que la contamination des fourrages verts au moment de la récolte ne puisse pas être facilement contrôlée, il est envisageable de maîtriser le développement des STEC au travers des fermentations dans l'ensilage notamment par l'ajout de bactéries lactiques.

Ce travail de thèse s'inscrit dans une démarche préventive de gestion des risques d'infections humaines par les STEC. De nombreux sérogroupes ont été impliqués en clinique humaine et les informations relatives à l'épidémiologie environnementale de ces pathogènes restent parcellaires. Au cours de ce travail, nous avons fait le choix de nous focaliser uniquement sur l'ensilage, faisant partie du réservoir environnemental de ces pathogènes, et de développer des moyens de préservation pouvant être utilisés envers de nombreuses souches de STEC. Ce projet s'intéresse à l'utilisation des propriétés antagonistes des bactéries lactiques pour garantir la qualité sanitaire des aliments du bétail ; ayant pour conséquences la réduction du risque d'implantation des STEC dans le tube digestif des ruminants. Cette étude a donc pour ambition de diminuer l'entrée des bactéries pathogènes dans le cycle épidémiologique aboutissant à des contaminations humaines.

Les résultats de ce travail sont exposés dans un mémoire expérimental, précédé d'une synthèse bibliographique permettant de replacer notre étude dans son contexte scientifique général. Ce mémoire bibliographique s'articule autour de 3 parties :

- Tout d'abord, une présentation globale des STEC décrivant, entre autres, la pathogénie, leur cycle épidémiologique et les principales stratégies de limitation au sein du réservoir animal.
- Ensuite, une partie rassemblant les principales informations sur les bactéries lactiques, notamment leur taxonomie et classification, leurs métabolismes et leurs diverses utilisations.
- Enfin, une partie de présentation de l'ensilage, orientée sur les communautés microbiennes pouvant y être retrouvées que ce soit en tant qu'organismes technologiques ou organismes d'altération et pathogènes, ainsi que les principales stratégies à mettre en œuvre pour limiter d'éventuelles dégradations.

Les informations présentées dans cette dernière partie ont fait l'objet d'une synthèse soumise à la revue « Animal Feed Science and Technology ».

L'étude expérimentale reprend l'ensemble des travaux entrepris afin d'évaluer le potentiel bio-protecteur de diverses bactéries lactiques envers l'implantation et la survie des STEC dans des ensilages, afin de limiter leur portage asymptomatique par les bovins. Plus précisément, ce travail a été mené en 2 phases :

- Une première phase d'étude *in vitro* portant sur la recherche et l'identification de bactéries lactiques inhibitrices des STEC et sur l'étude de cette inhibition ;
- Une 2^{ème} phase d'étude *in situ* pour visualiser le devenir des STEC dans des ensilages expérimentaux en présence de ces bactéries inhibitrices.

Les résultats expérimentaux ont fait l'objet de deux publications, l'une publiée dans le journal « Applied and Environmental Microbiology » (Décembre 2011), et l'autre soumise prochainement dans ce même journal, ainsi que de 2 communications orales présentées lors de congrès nationaux et 2 communications affichées présentées lors de 2 congrès internationaux et 1 congrès national.

MEMOIRE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC)

Ce chapitre présente les principales informations disponibles sur les *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines. La pathogénie et le cycle épidémiologique de ces bactéries y sont abordés ainsi que les principales stratégies ciblées ou globales, pouvant limiter la présence des STEC au sein de leur réservoir.

1. Généralités sur les STEC

1.1 Caractères généraux de l'espèce *Escherichia coli*

C'est en 1885 que le pédiatre allemand Théodore Escherich isole et décrit pour la première fois le bacille *Bacterium coli commune*, fréquemment présent dans les selles des nourrissons. En 1919, en hommage aux travaux d'Escherich, Castellani et Chalmers proposent de renommer cette bactérie *Escherichia coli*.

Le genre *Escherichia* appartient, ainsi que *Salmonella* ou encore *Shigella*, à la famille des *Enterobacteriaceae*. Le genre *Escherichia* regroupe traditionnellement cinq espèces : *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* et *E. vulneris*. Cependant, Priest & Barker (2010) ont démontré que les souches d'*E. blattae* étaient en réalité à reclasser dans le genre *Shimwellia* en tant qu'espèce *Shimwellia blattae*. Chaque espèce d'*Escherichia* possède des caractéristiques biochimiques spécifiques, permettant de les différencier (Grimont, 1987) (Tableau 1).

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

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

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

Les *Escherichia coli* sont des bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs, oxydase négative faisant partie de la flore commensale de l'Homme et des animaux à sang chaud. Ces organismes colonisent généralement le tractus gastro-intestinal infantile de manière asymptomatique dans les premières heures de la vie et représente par la suite près de 80% de la flore colique anaérobie facultative humaine (Nataro & Kaper, 1998; Vernozy-Rozand & Montet, 2001).

Escherichia coli, et plus largement les coliformes thermotolérants, sont recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale ; leur présence fournit ainsi une indication sur une éventuelle contamination de l'aliment par des bactéries pathogènes d'origine digestive (e.g. *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O157:H7...).

Les *Escherichia coli* sont différenciés à l'aide de la classification fondée en grande partie sur les travaux de Kauffman en 1944, qui se base sur la détermination des antigènes de surface (Nataro & Kaper, 1998). Principalement deux antigènes sont pris en compte : les antigènes O somatiques et les antigènes H flagellaires. Les antigènes somatiques O définissent le sérotype des *E. coli*. Il existe 174 antigènes O (Stenutz et al., 2006) et 56 antigènes H différents chez *E. coli*. Une combinaison spécifique d'un antigène O et d'un antigène H définit le sérotype. Des souches d'*E. coli* appartenant à des sérotypes spécifiques sont régulièrement associées à des pathologies, mais en général ce ne sont pas les antigènes eux-mêmes qui confèrent la virulence aux bactéries (Gyles, 2007).

Par ailleurs, bien que la majorité des souches d'*E. coli* soient commensales, certaines d'entre elles sont associées à des pathologies intestinales ou extra-intestinales très diverses chez l'homme (Levine, 1987). Les pathovars à l'origine d'infections extra-intestinales, comme les UPEC (pour « Uropathogenic *E. coli* »), responsables d'infections du tractus urinaire, et les *E. coli* associés à des méningites (MNEC pour « Meningitis-associated *E. coli* ») ou à des septicémies ont récemment été regroupées sous le terme de ExPEC (pour « Extra-intestinal pathogenic *E. coli* ») (Russo & Johnson 2000).

1.2 Classification des *E. coli* en pathotypes responsables de troubles intestinaux.

Comme la plupart des pathogènes des muqueuses, les souches d'*E. coli* pathogènes utilisent une stratégie d'infection dont les points clés sont les suivants : colonisation des muqueuses, éventuellement invasion des cellules, multiplication, évasion des défenses de l'hôte, dommages à l'hôte. Sur la base des modes d'infection et des signes cliniques de l'infection, différents pathotypes intestinaux ont été décrits et sont présentés ci-dessous. Actuellement, les souches impliquées dans des infections intestinales chez l'homme sont classées en six pathotypes : (Figure 1).

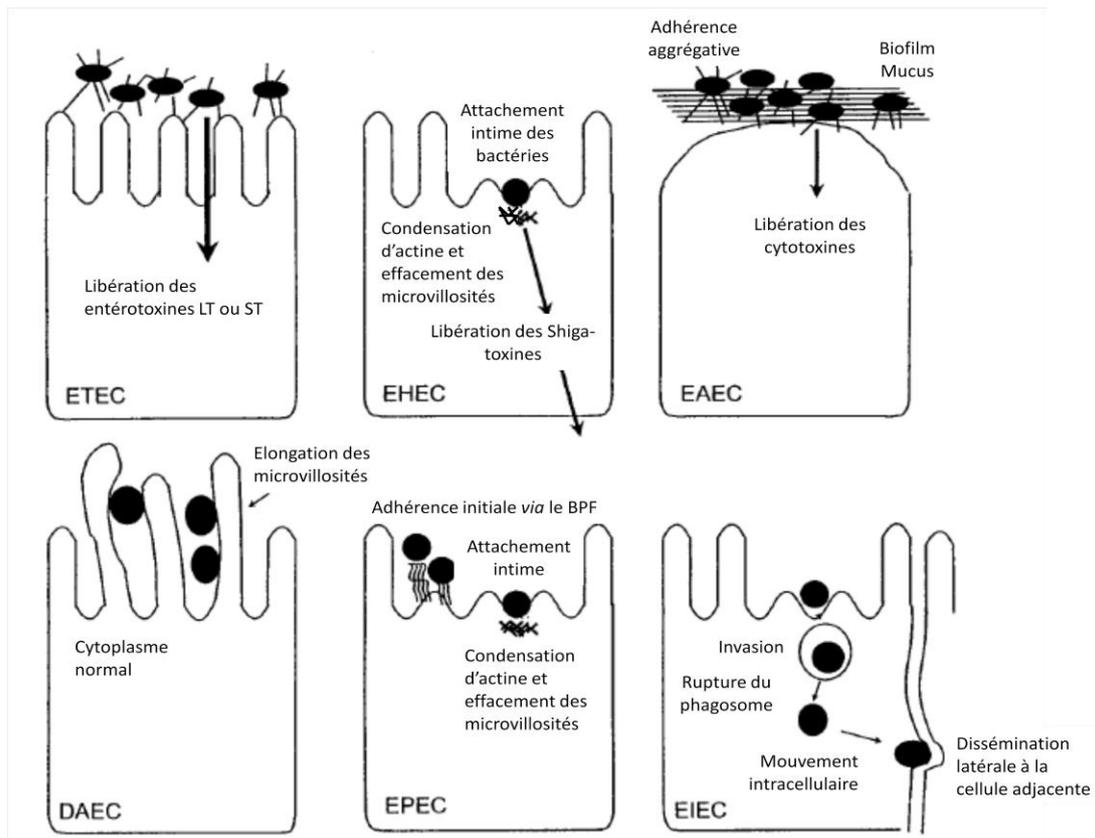


Figure 1 : Pathogénies associées aux 6 classes d'*E. coli* responsables de diarrhées d'après Nataro & Kaper (1998).

Les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) sont une cause majeure de diarrhée infantile dans les pays en voie de développement. Ils sont aussi responsables de la « diarrhée des voyageurs » (ou « turista »). L'Homme est le principal réservoir des ETEC humains. Les ETEC adhèrent aux entérocytes de l'intestin grêle suite à l'action d'adhésines fimbriaires, les facteurs de colonisation (CFA) (Cassels & Wolf, 1995). La diarrhée de type aqueuse est provoquée par une entérotoxine thermostable (ST) et/ou une entérotoxine thermolabile (LT) pénétrant à l'intérieur de la cellule après liaison à leurs récepteurs respectifs (Levine, 1987).

Les *E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC) ont été récemment reconnus comme responsables de diarrhées persistantes. Les EAEC colonisent l'épithélium de l'intestin grêle et du gros intestin en produisant une adhésion dite « auto-aggrégative » en « briques empilées » à l'aide d'adhésines fimbriaires appelées « *aggregative adherence fimbriae* » (AAFs) et formant des biofilms épais provoquant des dommages à la muqueuse intestinale. Les EAEC sécrètent plusieurs toxines dont la *Shigella* enterotoxin 1 (ShET1) et la toxine EAST1 (« *EnteroAggregative heat-Stable Toxin 1* ») homologue à l'entérotoxine thermostable des ETEC (Kaper et al., 2004).

Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) ont été associés à des diarrhées pouvant être aqueuses et contenir du mucus, chez les jeunes enfants, en particulier entre 1 et 5 ans. Ce pathotype est également associé à des infections urinaires. Environ 75 % des souches DAEC produisent une adhésine fimbriaire leur conférant un phénotype d'adhésion « diffuse ». Cette adhésine se lie à une protéine de surface des entérocytes de l'intestin grêle. Les DAEC induisent un effet cytopathique caractérisé par le développement de longues extensions entourant les cellules bactériennes (Cookson & Nataro, 1996).

Les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) sont proches des shigelles du point de vue génétique, biochimique et pathogénique (Brenner et al., 1972). Elles provoquent des diarrhées aqueuses évoluant rapidement en une dysenterie (selles contenant du sang et du mucus). Leur principal réservoir est l'homme. Les EIEC pénètrent les entérocytes du colon, provoquent la lyse de la vésicule d'endocytose et se multiplient, provoquant la mort cellulaire. Elles sont capables de se mouvoir dans le cytoplasme et de pénétrer ensuite dans la cellule adjacente par la polymérisation de l'actine cellulaire à un de leur pôle.

Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) sont responsables de diarrhées infantiles sévères dans les pays en voie de développement, particulièrement chez les enfants de moins de 1 an. L'être humain constitue un réservoir important de ces bactéries. Les EPEC adhèrent aux entérocytes de l'intestin grêle et provoquent les lésions d'attachement/effacement (A/E), caractérisées par l'effacement des microvillosités intestinales et par une adhésion étroite des bactéries sur la membrane cytoplasmique des entérocytes. Plusieurs gènes dont le gène *eae* (« *attaching and effacing E. coli* ») et le gène *bfp* sur le plasmide pEAF (« *EPEC adhesion factor* ») sont impliqués dans la virulence (Bugarel et al., 2011).

Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) provoquent des symptômes allant de diarrhées peu sanglantes à des colites hémorragiques (CH), voire à un Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) chez l'enfant ou à un Purpura Thrombotique Thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte, pouvant conduire parfois à la mort (Riley et al., 1983). Les ruminants sont reconnus pour être le principal réservoir. Un grand nombre de sérotypes d'EHEC est capable de produire les lésions de type A/E au niveau du colon. Néanmoins le point central de leur pouvoir pathogène est la production de toxines Stx1 et/ou Stx2, codées par les gènes *stx*, qui pénètrent dans la circulation sanguine et provoquent des atteintes extra-intestinales potentiellement mortelles (Konowalchuk et al., 1977).

L'ensemble des souches d'*E. coli* possédant au moins un gène *stx* représente le groupe des **Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC)** ou VTEC selon l'ancienne dénomination internationale (pour verotoxin-producing *E. coli*). Il est important de souligner que les STEC ne sont néanmoins pas tous pathogènes pour l'homme (Figure 2).

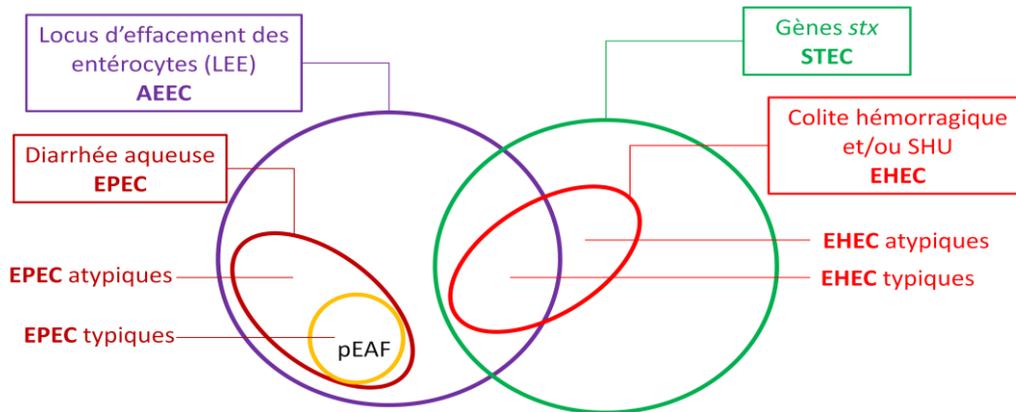


Figure 2 : Diagramme de Venn illustrant le système de classification actuel des AEEC/EPEC/STEC/EHEC à partir des signes cliniques et des facteurs de virulence associés aux souches d'*E. coli* d'après Naylor et al. (2005). Les surfaces des disques et intersections ne sont pas proportionnelles à la prévalence des différents types d'*E. coli*.

Le phénotype d'attachement/effacement est codé par un îlot de pathogénie chromosomique, le LEE. Les toxines Stxs sont codées par des bactériophages. Toutes les souches possédant le LEE, quels que soient les signes cliniques associés, appartiennent au groupe des AEEC. Toutes les souches possédant les gènes codants pour les toxines Stxs, quels que soient les signes cliniques associés, sont des STEC.

Les souches EPEC sont associées à des diarrhées aqueuses chez l'homme et sont définies comme des souches possédant le LEE et ne produisant pas de toxine Stx. Sur la base de la présence du plasmide pEAF, on distingue les souches EPEC typiques des souches dites atypiques.

Les EHEC sont associées chez l'homme à une colite hémorragique et/ou à un syndrome hémolytique et urémique et produisent des toxines Stxs. La grande majorité des EHEC possèdent le LEE et les souches EHEC LEE+Stx+ sont parfois qualifiées d'EHEC typiques. Ainsi, toutes les EHEC sont des STEC mais toutes les souches STEC, même celles qui possèdent le LEE, ne sont pas forcément associées à la maladie chez l'homme (AFSSA, 2010).

2. Pathogénie

La taille du génome des souches pathogènes d'*E. coli* est supérieure de plusieurs centaines de kilobases à celle de souches non pathogènes : environ 5 500 kb pour les souches O157, contre 4 600 kb pour une souche banale de laboratoire. Dans certains cas, ces régions supplémentaires correspondent à l'unité génomique fonctionnelle d'un bactériophage ; elles peuvent également constituer des îlots de pathogénie ou correspondre à des plasmides. Une partie des gènes codant les facteurs de virulence est portée par des éléments mobiles du génome (AFSSA, 2003).

2.1 Les facteurs de virulence des STEC

a) Les shigatoxines

Les souches STEC se caractérisent par la production de cytotoxines capables d'inhiber *in vitro* les cellules Vero (cellules rénales du singe vert d'Afrique) en stoppant de façon irréversible leur multiplication (Konowalchuk et al., 1977). Ces toxines sont regroupées sous le terme de Shiga-toxines (Stx) ou Shiga-like toxines (Slt) étant donné leurs homologies avec la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1 (O'Brien et al., 1982). On considère deux grandes classes de Shiga-toxines : les toxines Stx1, neutralisables par des anticorps anti-Shiga-toxine de *Shigella dysenteriae* 1, et les toxines Stx2 qui ne le sont pas (Strockbine et al., 1986). Depuis la première description des Shiga-toxines, un nombre conséquent de variants génétiques dus à des mutations de la séquence codante des toxines Stx1 et Stx2 a été décrit (Beutin et al., 2007). Les Shiga-toxines sont codées par un opéron d'environ 1230 pb généralement porté par un bactériophage de type λ -like.

Les Shiga-toxines sont des hétéropolymères de 70kDa formés d'une sous-unité A de 33 kDa et de 5 sous-unités B de 7,7 kDa. Lors d'une première étape, la toxine se fixe à la membrane cytoplasmique de la cellule cible : les sous-unités B, assemblées en anneau, se lient à un récepteur glycolipidique, le globotriosyl céramide Gb3 (Lingwood et al., 1987). La toxine est ensuite internalisée par un mécanisme d'endocytose et subit un transport rétrograde à travers l'appareil de Golgi, puis le réticulum endoplasmique. La sous unité A est alors scindée en deux parties A1 et A2 par réduction d'un pont disulfure. La partie A1 ainsi activée exerce son activité N-glycosidase sur l'ARN ribosomique 28S et bloque la sous-unité 60S du ribosome (Lea et al., 1999), conduisant à un arrêt des synthèses protéiques et par conséquent à la mort cellulaire (Figure 3). Les récepteurs Gb3 se trouvent à la surface des cellules épithéliales de la microcirculation sanguine, notamment au niveau rénal et cérébral (AFSSA, 2003).

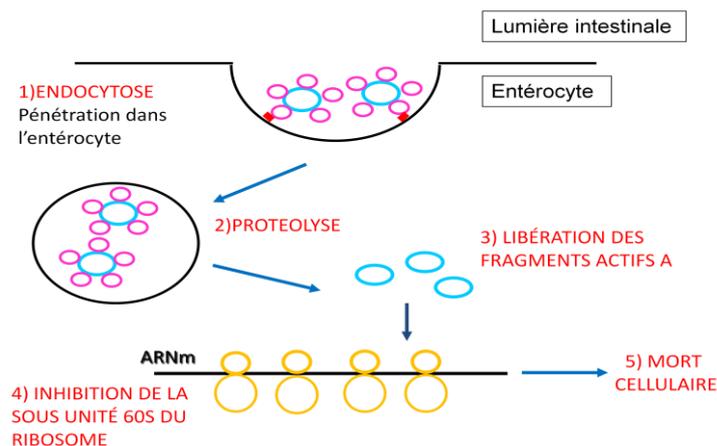


Figure 3 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines d'après Vernozy-Rozand & Montet (2001).

Le récepteur Gb3 ne serait apparemment pas le seul impliqué dans le mécanisme d'action des Shiga-toxines. En effet, une étude utilisant un système de culture d'organe *in vitro* a démontré que l'épithélium intestinal de l'homme pourrait être affecté par la toxine Stx2 en l'absence de récepteur Gb3 (Schüller et *al.*, 2004).

b) Les facteurs d'adhésion

Les facteurs d'adhésion semblent être des éléments majeurs de la pathogénie. Les principaux mécanismes d'adhésion décrits chez les entérobactéries font appel à des fimbriae, des protéines de membrane externe et des lipopolysaccharides (Wagner & Hensel, 2011). Chez les STEC il existe de nombreux facteurs responsables du processus d'adhésion.

La colonisation du tube digestif par certaines souches de STEC s'accompagne du développement de lésions spécifiques des entérocytes dites **lésions d'attachement-effacement (A/E)**, qui se limitent au côlon et au caecum (Donnenberg et *al.*, 1993). Ces lésions d'abord décrites chez les EPEC, se caractérisent par un effacement des microvillosités des cellules de l'épithélium intestinal (Ismaili et *al.*, 1995) et un réarrangement pour former un piédestal sur lequel les bactéries viennent se lier de façon étroite. Le mécanisme de résorption des microvillosités intestinales seraient à l'origine des symptômes diarrhéiques observés lors des infections.

Les gènes responsables des lésions A/E sont portés par le locus chromosomique LEE (Locus of Enterocyte Effacement). Le LEE est notamment caractérisé par un système de sécrétion de type III (Jarvis & Kaper, 1996), par le gène *eae* (*E. coli* attaching and effacing) codant une protéine de membrane externe appelée intimine (Jerse et *al.*, 1991) et impliquée dans l'effacement des

microvillosités et par le gène *tir* codant le corécepteur spécifique de l'intimine, Tir (Translocated Intimin Receptor).

D'autres facteurs d'adhésion existent comme notamment le facteur Saa (STEC autoagglutinating adhesin) ou encore la protéine Iha (Iron-homologue adhesin) mais ne seront pas développés ici.

c) Les facteurs plasmidiques

Les STEC possèdent un plasmide de 90kb, portant différents facteurs de virulence. L'**entérohémolysine E-hlyA** a été mise en évidence chez les STEC en 1988 (Beutin et *al.*, 1988).

Cette toxine s'insère dans la membrane cytoplasmique et forme des pores, engendrant ainsi une lyse osmotique des cellules (Soloaga et *al.*, 1999). Elle permettrait notamment de stimuler le développement des cellules bactériennes grâce au fer libéré suite à la lyse des hématies.

D'autres facteurs plasmidiques comme la sérine protéase EspP, la catalase peroxydase périplasmique KatP, des toxines de type *Clostridium difficile*-like, ainsi que le système de sécrétion de type II (Burland et *al.*, 1998) sont impliqués dans la pathogénie des STEC. Par ailleurs, le gène *astA* codant l'entérotoxine East1 a été identifié chez de nombreuses souches STEC et cette toxine pourrait jouer un rôle dans l'induction de la phase initiale de diarrhée aqueuse.

d) Autres éléments impliqués dans la virulence

La survie des bactéries dans les aliments et dans l'estomac correspond à une étape importante du processus infectieux. La capacité des STEC à survivre à des pH acides a été mise en évidence dans des aliments tels que la mayonnaise, le jus de pomme, les produits carnés fermentés ou des fromages (Doyle, 1991; Glass et *al.*, 1992; Abdul-Raouf et *al.*, 1993; Zhao et *al.*, 1993; Montet et *al.*, 2009). Plusieurs mécanismes de résistance à l'acidité ont été mis en évidence chez les STEC : un système oxydatif inhibé en présence de glucose, un système arginine-dépendant et un système glutamate-dépendant (Lin et *al.*, 1996). Ces systèmes dépendent de gènes spécifiques ainsi que de facteurs de régulation globaux tels que RpoS (Dong & Schellhorn, 2010). Les 2 derniers systèmes permettent la décarboxylation des acides en γ -aminobutyrate et agmatine, expulsés hors de la cellule. Ces réactions consomment un H⁺ et produisent une molécule de CO₂ (Figure 4). Lorsque le pH extérieur est de 2,5, ces décarboxylations permettent l'augmentation du pH intracellulaire et l'inversion du potentiel membranaire, essentiel à la survie d'*E. coli* (Richard & Foster, 2004).

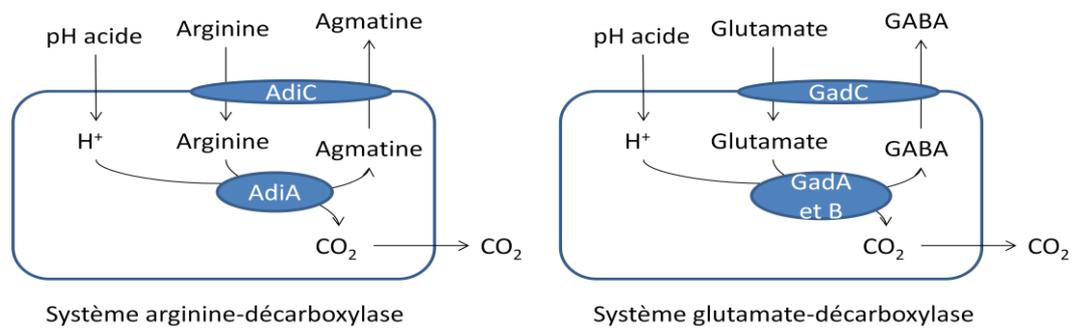


Figure 4 : Systèmes d'acido-résistance dépendant d'acides aminés chez *E. coli* : système arginine décarboxylase et système glutamate décarboxylase.

AdiC : antiport arginine/agmatine ; AdiA : arginine décarboxylase ; GadC : antiport glutamate/GABA ;
GadA et B : glutamate décarboxylases ; GABA : γ -aminobutyrate

Des études ont montré que la résistance aux conditions acides, mais également à la chaleur et à la salinité, dépend entre autres du régulateur général de réponse au stress codé par le gène *rpoS* (Coldewey et al., 2007).

2.2 Pathologies humaines associées aux STEC

Tous les groupes d'âge peuvent être infectés par une souche STEC bien que les enfants de moins de 5 ans et les personnes de plus de 65 ans soient plus sensibles et plus gravement touchés (Espière et al., 2005). La sensibilité des patients aux Shiga-toxines est probablement influencée par plusieurs facteurs tels que, l'état de santé, le nombre de récepteurs aux toxines Stx et les traitements médicaux suivis (agents diminuant la motricité intestinale, antibiotiques...) (Vernozy-Rozand & Montet, 2001). Plusieurs études montrent que la dose infectieuse minimale semble faible (inférieure à 100 bactéries pathogènes par portion alimentaire) (Griffin & Tauxe, 1991; Tilden et al., 1996; Strachan et al., 2001; Teunis et al., 2004) mais elle peut varier en fonction des caractéristiques de la souche, des sources de contamination incriminées (pH...), et de la sensibilité de l'hôte.

Les STEC sont à l'origine de symptômes cliniques variés : diarrhée non sanglante, colite hémorragique, syndrome hémolytique et urémique (SHU), particulièrement chez l'enfant et le sujet âgé, ou purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte (Tarr et al., 2005).

En 1983 Karmali et al. (1983) ont établi pour la première fois la relation entre une infection intestinale à STEC et la survenue d'un SHU. Les signes biologiques sont toujours une anémie hémolytique microangiopathique (altération des petits vaisseaux sanguins ou des capillaires),

une thrombocytopénie (raréfaction du nombre de plaquettes sanguines), et une insuffisance rénale aiguë. L'apparition du SHU se fait en moyenne une semaine après le début des symptômes digestifs pour environ 10 % des personnes ayant déclaré une diarrhée sanglante (Heuvelink, 2000). Le SHU typique, ou SHU post-diarrhée, représente environ 90 % des cas de SHU de l'enfant et représente la première cause d'insuffisance rénale du nourrisson. Une atteinte d'autres organes (pancréas, système nerveux central) peut également être observée. Elle est due à la présence de récepteurs Gb3 à la surface de ces cellules (Loirat et *al.*, 1992). L'atteinte du système nerveux central est d'ailleurs actuellement la principale cause de décès (Decludt et *al.*, 2000).

Comme pour le SHU, l'étiologie du PTT peut être de diverses origines (toxique, auto-immune...), et la relation entre l'infection par *E. coli* O157:H7 et l'apparition de ce syndrome a été démontrée par Kovacs et *al.*, (1990). Le PTT touche essentiellement l'adulte. On considère le PTT comme étant une forme clinique plus large que le SHU, avec fièvre et troubles neurologiques.

2.3 Epidémiologies

a) Description des épidémies

Selon les pays, les infections dues aux EHEC sont recensées soit directement, soit indirectement par la surveillance des cas de SHU. Par exemple, en France, du fait de l'absence de surveillance épidémiologique des infections gastro-intestinales à EHEC, la surveillance des infections dues aux STEC est basée, depuis 1996, sur les données de recensement des SHU chez les enfants âgés de moins de 15 ans et repose sur un réseau hospitalier de néphrologues pédiatres volontaires. Cette surveillance est coordonnée par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS). Les données relatives à l'épidémiologie des affections humaines dépendent du système de surveillance mis en place dans chaque pays et pourraient donc être biaisées.

Bien qu'une population à risque puisse être définie, toute personne peut potentiellement développer une diarrhée, voire un SHU. Par ailleurs, certaines personnes étant en contact fréquent avec un réservoir animal de STEC, du fait de leurs activités professionnelles (i.e. éleveurs...) ou de leurs loisirs (enfants en classe verte, ferme pédagogique...) sont particulièrement exposées.

Cependant, le portage transitoire asymptomatique de STEC chez l'homme a déjà été rapporté occasionnellement (Silvestro et *al.*, 2004). Une étude de 2 ans portant sur des travailleurs de ferme non malades de 3 régions distinctes d'Angleterre a montré que 3,3% des échantillons de sérum des personnes considérées possédaient des anticorps anti-O157, acquis suite à un contact

prolongé avec ces antigènes dans l'environnement de la ferme. Ces personnes sont considérées comme des porteurs sains (Quilliam et *al.*, 2011).

L'incidence annuelle du SHU pédiatrique en France est proche de celle observée dans d'autres pays européens et s'échelonne à moins d'un cas pour 100 000 enfants de moins de 15 ans (King et *al.*, 2009). En France, depuis 1996, des cas sporadiques de SHU avec une recrudescence saisonnière pendant la période estivale ont été enregistrés (juin- septembre) (Haeghebaert et *al.*, 2003). Cette augmentation estivale est aussi observée dans d'autres pays: Angleterre et Pays de Galles (Anon, 2000), Belgique, Pays-Bas et Allemagne (van de Kar et *al.*, 1996), ou encore en Amérique du Nord (Michel et *al.*, 1999).

Plus de 100 sérotypes de souches EHEC ont été mis en évidence chez les patients (Johnson et *al.*, 1996; Paton et *al.*, 1996). Les Etats-Unis, le Canada et le Royaume-Uni sont les pays où la fréquence d'isolement du sérotype O157:H7 est la plus importante. Ce sérotype a toutefois été décrit dans de multiples épidémies survenues dans différents pays européens, dont la France, et également en Argentine, Suède ou encore en Israël (Lopez et *al.*, 1989; Lerman et *al.*, 1992; Espiè et *al.*, 2005; Söderström et *al.*, 2005). Le fait que des souches d'*E. coli* O157:H7 soient particulièrement isolées chez des patients ou dans diverses matrices s'explique notamment par le fait que ce sérotype présente des caractéristiques phénotypiques qui lui sont propres et qui le rendent plus facilement identifiable que les autres STEC. En effet, les souches *E. coli* d'origine humaine fermentent le sorbitol à l'inverse des souches appartenant au sérotype O157:H7 qui ne le fermentent pas. En outre, la plupart des *E. coli* sont β -glucuronidase positives, alors que la grande majorité des STEC O157 ne présentent pas d'activité de cette enzyme (voir Tableau 1). Enfin, Zadik et *al.* (1993) ont montré que les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de tellurite et de céfixime étaient plus élevées pour les STEC O157 que pour les autres *E. coli*. Cependant au cours des années, une augmentation du nombre de cas d'infections dues à des STEC non-O157 a été constatée (Zimmerhackl et *al.*, 2010; Caprioli et *al.*, 1997), notamment grâce à l'amélioration des méthodes d'isolement et de détection des différents sérogroupes.

En France, les principaux sérogroupes STEC « non-O157 » responsables de SHU chez l'enfant entre 1996 et 2009 ont été *E. coli* O26, *E. coli* O55 et *E. coli* O111 (Figure 5) (King et *al.*, 2009).

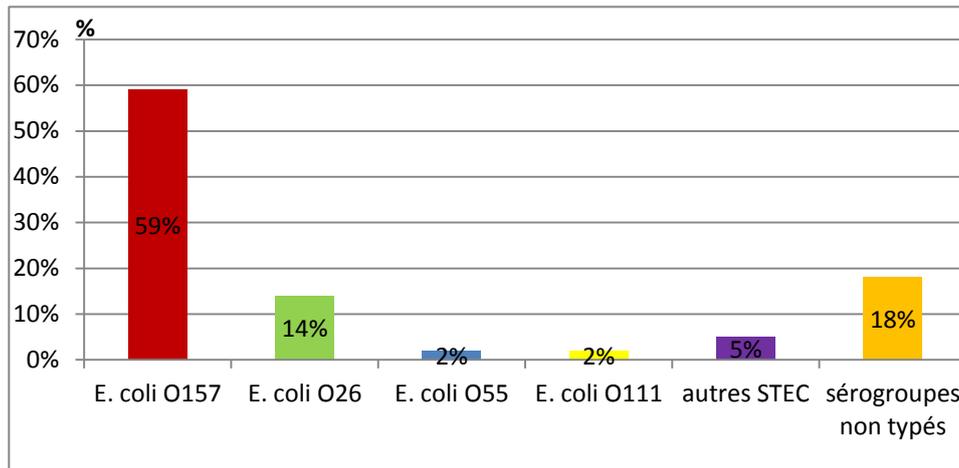


Figure 5 : Histogramme représentant les principaux sérogroupes de STEC responsables de SHU (%) chez l'enfant de moins de 15 ans (données de coproculture), France, 1996-2009.

b) Les principales épidémies

Pendant les années 80, la plupart des infections à EHEC étaient associées à la consommation de denrées d'origine animale. L'épidémiologie des infections à EHEC a évolué durant les 20 dernières années, et l'ingestion de végétaux ainsi que le contact avec les animaux et leur environnement sont de plus en plus impliqués en clinique humaine (voir Tableau 2). Différents paramètres peuvent expliquer une telle évolution. Tout d'abord les enquêtes épidémiologiques sont de plus en plus exhaustives limitant ainsi la proportion d'épidémies de sources inconnues ou non confirmées. Les systèmes d'exploitation agricole et notamment les élevages bovins sont de plus en plus intensifs afin de répondre à la demande alimentaire mondiale ce qui accentue les risques de dissémination et persistance des STEC au sein des élevages et dans la chaîne alimentaire. Enfin, une évolution du régime alimentaire est constatée dans différents pays avec une augmentation de la consommation de produits frais tels que les fruits et légumes.

La première épidémie recensée a eu lieu aux USA en 1982, où 46 personnes ont été malades suite à la consommation de viande hachée de bœuf contaminée par *E. coli* O157:H7 (Riley et al., 1983). La plus importante épidémie mondiale était liée à la présence du sérotype O157:H7 dans des germes de radis blanc ayant été consommés au Japon et ayant conduit à plus de 9 000 malades et 12 décès (Michino et al., 1999). En Ecosse, entre 1994 et 2003, sur 35 épidémies à *E. coli* O157:H7 identifiées, 19 (54%) étaient associées à des sources environnementales de contamination (Strachan et al., 2006). De même aux Etats-Unis, 12% des épidémies survenues entre 1982 et 2002 étaient liées à l'eau ou à un contact avec un animal porteur. Il est à souligner que 21% des épidémies investiguées présentaient une source de contamination inconnue

(Rangel et al., 2005). Le Tableau 2 retrace les principales épidémies dans le monde dues aux STEC depuis 2000 avec une attention particulière pour les épidémies ayant eu lieu en France.

Tableau 2 : Principales épidémies dues aux EHEC dans le monde depuis 2000 avec une attention particulière pour les épidémies ayant eu lieu en France.

Année	Pays	Sérogroupe de EHEC	Nb de malades (SHU et décès)	Aliments suspectés ou confirmés	Référence
2000	Canada	O157:H7	2300 (7 décès)	Eau de boisson	Hrudey et al. (2003)
2000	Espagne	O157:H7	205 (6 SHU)	Saucisse	Bosch (2000)
2002	France	O148:H8	11 (2 SHU)	Viande de mouton	Espié, Grimont, et al. (2006)
2005	France	O157:H7	70 (17 SHU)	Viande de bœuf	Mailles et al. (2006)
2005	France	O26	6 SHU	Camembert	Espié, Mariani-Kurkdian, et al. (2006)
2005	France	O157	2 (1 SHU)	Fromage au lait cru de chèvre	Espié, Vaillant, et al. (2006)
2005	Suède	O157:H7	120 (7 SHU)	Laitue	Söderström et al. (2005)
2006	USA	O157:H7	199 (31 SHU et 3 décès)	Epinards	Wendel et al. (2009)
2009	France	O123	2 (1 SHU)	Hamburger	King (2010)
2010	USA	O145	19	Laitue	CDC (2010)
2011	Allemagne	O104:H4	3816 (845 SHU et 54 décès)	Germes de Fénugrec	Frank et al. (2011)
2011	France	O104:H4	12 (7 SHU)	Germes de Fenugrec	EFSA (2011)
2011	France	O157	(12 SHU)	Viande hachée de bœuf	InVS (2011)

La plupart des ces épidémies sont dues à des souches classiques de STEC, et particulièrement au sérotype O157:H7, portant les gènes *eae* et *stx*.

L'épidémie due aux souches d'*E. coli* O104:H4 se distingue particulièrement des autres. En effet, les souches isolées suite à l'épidémie Française de Juin 2011 sont similaires à celles identifiées et caractérisées dans le cadre de l'épidémie observée en Mai-Juin en Allemagne de cette même année. Cette homologie des isolats combinée au caractère rare de la souche à l'origine de ces épidémies, laisse supposer que ces deux événements sont liés à une source commune. L'enquête épidémiologique a identifié des germes de fenugrec comme étant la source la plus probable de contamination (ANSES, 2011a).

Cette souche épidémique appartient au sérotype O104:H4, et possède le gène *stx2* qui code la toxine STX2. Elle ne possède pas les gènes *eae* (codant l'intimine), *hlyA* (codant l'hémolysine A) et *astA* (codant la toxine EAST1) mais héberge le gène *aggR*, codant un facteur de régulation de l'expression de fimbriae responsables d'une très forte adhérence à la muqueuse intestinale. Cette souche épidémique n'est pas un EHEC sur le plan génétique mais une souche d'EAEC qui a acquis un gène *stx2*. Par ailleurs, cette souche présente un profil de multi-résistance aux antibiotiques (résistance aux molécules suivantes : ampicilline, céfotaxime, ceftazidime, streptomycine, sulfaméthoxazole, triméthoprime, cotrimoxazole, tétracycline et acide nalidixique) (ANSES, 2011a).

3. Cycle épidémiologique

3.1 Réservoir des STEC

Des souches STEC ont été isolées à partir d'animaux domestiques et sauvages comme les bovins, les ovins, les caprins, les porcs, les volailles, les chevaux, les chats, les chiens, les cerfs et les oiseaux (Nataro & Kaper, 1998; Gyles, 2007; Bolton et al., 2011). Toutefois la prévalence des STEC est supérieure chez les ruminants et plus particulièrement chez les ruminants domestiques tels que les bovins (Caprioli et al., 2005; Hussein, 2007). En effet, les bovins ne possèdent pas les récepteurs Gb3 de liaison des Shiga-toxines et ne présentent par conséquent aucun symptôme lorsque les STEC transitent dans leur tube digestif. Les bovins sont dits porteurs sains (Karmali et al., 2010). De nombreuses études de prévalence des STEC dans le bétail ont été menées, mais les résultats ne sont pas toujours comparables notamment à cause de différences dans les sérogroupes recherchés ou dans les techniques de détection utilisées.

Au niveau mondial, les taux de prévalence concernant le portage fécal chez les bovins sont très variables et vont de 0,2% à 27,8% pour le sérotype O157 et de 2,1% à 70,1% pour les STEC non-O157 (Hussein & Bollinger, 2005). Moreira et al. (2003) ont réalisé une étude de prévalence d'une année sur 243 bovins laitiers de 60 fermes différentes au Brésil. Les auteurs ont observés que les STEC étaient isolés dans 95% des fermes testées et 49% des animaux au total. Au sein des fermes, la prévalence variait considérablement entre 0% et 100% de bovins porteurs. Enfin, parmi les souches de STEC isolées, 67% appartenaient aux 2 mêmes sérotypes O91:H- et O157:H-. A l'échelle internationale, de très nombreux sérotypes de STEC ont été détectés dans les fèces de bovins laitiers, dont 35 ont déjà été isolés chez des patients tels que O157:H7, O103:H2, O26:H11, O145:H- ou encore O111:H- (Hussein & Sakuma, 2005).

Concernant uniquement le sérotype O157:H7, les taux de prévalence relevés sont beaucoup plus faibles. Meyer-Broseta et al. (2001) ont réalisé une synthèse portant sur 26 études épidémiologiques effectuées aux Etats-Unis et en Europe. Pour les Etats-Unis, la prévalence des troupeaux qui excrétaient *E. coli* O157:H7 oscillait de 0-2 % jusqu'à 22 %. En Europe, les valeurs relevées étaient plus faibles puisqu'elles se situaient entre 0 et 3 % des troupeaux étudiés.

D'après des études récentes, la contamination des élevages serait principalement due à la présence dans les troupeaux d'un nombre faible d'animaux, les « super-excréteurs », désignant les bovins ayant un taux persistant d'excrétion en *E. coli* O157:H7 en plus grande quantité, comparé à la plupart des animaux porteurs (supérieur à 10^4 UFC/g) (Ferens & Hovde, 2011). En effet, des modèles mathématiques établis pour décrire la transmission des souches de *E. coli* O157:H7 au sein des troupeaux ont mis en évidence la présence d'une proportion d'animaux excréteur ce pathogène de manière plus importante (Matthews et al., 2006). Arthur et al. (2009) ont démontré une corrélation entre la prévalence fécale et la contamination de la peau des animaux. Selon ces auteurs, des pourcentages de 20 % de prévalence fécale ou de 80 % de prévalence sur la peau seraient les seuils de contamination caractéristiques de la présence d'animaux « super-excréteurs » dans les troupeaux. La capacité à excréter ces bactéries en plus grande quantité ou sur une plus longue période serait associée à la colonisation de la partie distale du tube digestif des bovins (Chase-Topping et al., 2008). Un tropisme de certains tissus a été observé chez les ruminants, au niveau de la jonction recto-anale plus fortement contaminée par *E. coli* O157:H7 chez les bovins (Naylor et al., 2003; Low et al., 2005). Chez les petits ruminants cependant, il semble que la colonisation des STEC se fasse de manière diffuse le long du tractus digestif allant du caecum jusqu'au rectum (La Ragione et al., 2005; La Ragione et al., 2006) mais ces résultats restent controversés (La Ragione et al., 2009). A titre de rappel, un schéma du tractus digestif des ruminants est présenté Figure 6.

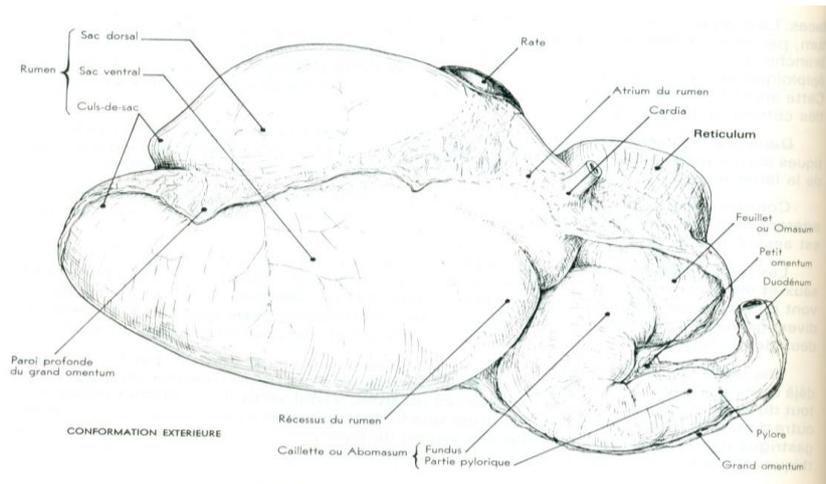


Figure 6 : Schéma du tractus digestif d'un ruminant, issue de Barone (1997).

L'excrétion des STEC et des STEC O157 en particulier, est également liée à la période de l'année et à l'âge des animaux. Ainsi, les STEC sont excrétés avec une fréquence plus importante pendant les mois chauds. Rughjerg et *al.* (2003) ont notamment observé dans 8 troupeaux danois que le pourcentage de vaches laitières excréant des STEC O157 était minimal en Janvier (2%), augmentait progressivement jusqu'en Juin (12%) puis diminuait en Septembre (8%). Ces variations saisonnières de l'excrétion des STEC ont été confirmées par d'autres études (Hancock et *al.*, 2001; Ferens & Hovde, 2011; Monaghan et *al.*, 2011).

Ces auteurs ont aussi observé que l'excrétion fécale des STEC O157 est plus importante chez les veaux que chez les adultes. Lors d'une étude menée en Ecosse sur des veaux âgés au maximum de 5 mois, Pearce et *al.* (2004) ont observé que 94% des animaux excrétaient des souches de *E. coli* O26 et 51% des souches de *E. coli* O103. Les souches appartenant aux sérogroupes O145 et O157 ont été rarement retrouvées et aucune souche de *E. coli* O111 n'a été isolée. Les veaux porteurs de STEC peuvent être atteints de diarrhées. Certaines souches de STEC appartenant à des sérotypes rarement retrouvés en clinique humaine peuvent être isolées chez ces animaux, telles que *E. coli* O8:H8, O20:H19 ou O113:H21. Le sérotype O157:H7 n'a été associé à des diarrhées que de manière exceptionnelle (Mainil & Daube, 2005) au contraire du sérotype O118 fréquemment isolé chez des veaux atteints de diarrhées en Allemagne (Wieler et *al.*, 1998). Bien que les STEC n'aient pas été associées à des maladies chez les bovins adultes, ces bactéries pourraient jouer un rôle dans le syndrome hémorragique du jejunum, en association avec d'autres facteurs plus ou moins bien identifiés, notamment la présence de mycotoxines (Baines, Erb, Turkington, et *al.*, 2011)

Selon Hussein (2007) le portage des STEC par les bovins est transitoire, cependant, l'apport régulier de STEC à travers les fèces des animaux est en partie responsable de la persistance de

ces pathogènes dans les élevages. D'autres flux environnementaux jouent aussi un rôle dans la dissémination et la persistance des STEC au sein des élevages et les principaux sont décrits ci-après.

3.2 Prévalence dans l'environnement de la ferme

a) Dans le sol

Monaghan et *al.* (2011) ont étudié 600 échantillons de sols de fermes irlandaises sur une période de 1 an et ont détecté la présence de gène *stx*, caractéristiques des souches de STEC, dans 27% d'entre eux. La variation saisonnière observée traditionnellement pour le portage fécal a aussi été observée pour ces échantillons de sols. De nombreuses études ont montré que la survie des STEC dans le sol pouvait être de longue durée. Les STEC peuvent survivre plus de 213 jours dans un sol sableux-limoneux inoculé à 10^6 UFC/g et recevant des déjections animales (Islam et *al.*, 2004).

La survie des souches de STEC dans, ou sur, le sol dépend de nombreux paramètres tels que la température, de l'activité de l'eau et de la compétition avec la flore présente. Il a été montré que des souches STEC O26 inoculées artificiellement dans des sols fertilisés naturellement et incubés à 4°C ou 20°C pouvaient persister jusqu'à 365 jours après inoculation bien qu'une température plus élevée soit associée à un déclin plus rapide du nombre de STEC (Fremaux et *al.*, 2008). Ce phénomène a aussi été observé par Jiang et *al.*, (2002), qui ont montré que la survie des souches de STEC est fortement diminuée en présence de la flore de compétition du sol et passe de 231 jours à 193 jours pour une température d'incubation de 21°C. Les vers de terre pourraient aussi participer à la prolifération des souches d'*E. coli* O157 dans le sol et faciliter leur dissémination (Pryor Williams et *al.*, 2006), de même que la présence de certains protozoaires du sol (Barker et *al.*, 1999).

La nature du sol influence également la durée de survie des souches d'*E. coli* O157 : elle est meilleure dans des microcosmes formés de particules de sol et d'herbe (Maule, 2000) et semble plus courte dans un sol sableux (moins d'1 mois) que dans des parcelles de sol argileux ou de terreaux (environ 90 jours) (Gagliardi & Karns, 2002; Fenlon et *al.*, 2000).

b) Dans l'eau

Les abreuvoirs d'eau destinés au bétail sont une source avérée de recontamination des animaux. (Faith et *al.*, 1996; Shere et *al.*, 1998; Kuhnert et *al.*, 2005; Gautam et *al.*, 2011). La salive serait à ce titre un vecteur non négligeable de contamination (Cobbold & Desmarchelier, 2002).

Hancock *et al.* (1998) ont montré que la survie d'*E. coli* O157:H7 dans de l'eau d'abreuvoir pouvait atteindre 4 mois. Dans de l'eau potable ou de l'eau de lac entreposée à 8 ou 25°C, 10³ UFC/ml de *E. coli* O157:H7 seraient détectées jusqu'à 91 et 84 jours respectivement (Wang & Doyle, 1998). Il a été prouvé que la survie des STEC dans des biofilms formés dans les abreuvoirs pouvait atteindre 245 jours et les souches d'*E. coli* O157:H7 montrent encore une activité infectieuse chez les veaux après 6 mois de séjour dans l'eau (déclenchement de diarrhées) (LeJeune, Besser & Hancock, 2001). Enfin, une augmentation de la contamination des abreuvoirs par *E. coli* est observée durant les mois d'été (Hancock *et al.*, 2001).

c) Dans les fèces et les effluents qui en dérivent : fumier et lisier

L'étude menée par Duffy (2003) a montré que des souches d'*E. coli* O157:H7 pouvaient survivre jusqu'à 126 jours dans des fèces de bovins, d'autres auteurs ont trouvé des survies de 16 et 10 semaines pour *E. coli* O26:H11 et O111 (Fukushima *et al.*, 1999). Plus récemment la survie de *E. coli* O157:H7 a été démontrée dans des fèces de bovins durant plus de 97 jours (Scott *et al.*, 2006).

La survie des STEC dans les fèces semble liée à plusieurs paramètres physico-chimiques. En effet, Wang *et al.* (1996) ont observé qu'*E. coli* O157:H7 survit mieux dans des fèces stockées à 5°C qu'à 22°C ou 37°C (70, 56 et 49 jours respectivement). Ces auteurs soulignent l'influence de l'*a_w* (activité de l'eau) sur la survie des bactéries, en effet pour des températures de +22°C ou +37°C, l'*a_w* des fèces en fin de stockage est inférieure à 0,5, alors qu'elle reste voisine de 0,98-0,99 pour un stockage à +5°C.

De nombreuses études ont montré que les STEC survivaient plusieurs semaines dans le lisier et le fumier de bovins (Kudva *et al.*, 1998; Himathongkham *et al.*, 1999; McGee *et al.*, 2002; Nicholson *et al.*, 2005). Le brassage du fumier pendant la période de stockage a pour effet de diminuer la survie de STEC préalablement inoculés (Fremaux, Delignette-Muller, *et al.*, 2007). De plus, Fremaux *et al.* (2010) ont montré que des STEC pouvaient survivre jusqu'à 2 mois dans des fèces et que la dispersion des pathogènes était avérée jusqu'à 20 cm sous la surface des sols de pâturages alpins. La survie d'*E. coli* O157 dans des sols fertilisés par du fumier ou du lisier représente un risque non négligeable de (re)contamination des animaux, des végétaux ou encore de l'homme (Franz *et al.*, 2011).

d) Dans les locaux et le matériel d'élevage

Cobbold & Desmarchelier (2002) ont observé qu'une grande proportion des échantillons environnementaux au sein des exploitations était contaminée par des STEC. De plus, Wilson *et*

al. (1992) ont montré que le niveau de contamination de l'environnement de la ferme serait positivement corrélé à la prévalence de la contamination en STEC du troupeau. Ainsi, plus la proportion des animaux porteurs sains dans le troupeau est importante, plus la contamination environnementale est forte.

Une étude avec des troupeaux inoculés 2 fois avec 10^{10} UFC d'*E. coli* O157:H7 a montré fréquemment des résultats positifs en détection du pathogène pour les éléments environnementaux alors qu'ils sont négatifs pour les fèces des animaux. La litière est l'échantillon le plus fréquemment retrouvé positif, et les auteurs ont observé que l'urine bovine pouvait servir de substrat pour la croissance des souches d'*E. coli* O157:H7 dans ce milieu (Davis et *al.*, 2005). Les STEC transitent essentiellement par les aliments et l'eau de boisson (Kuhnert et *al.*, 2005). Par ailleurs, une étude menée en Suède dans un élevage bovin laitier a montré que chez les veaux porteurs et excréteurs d'*E. coli* O157:H7 au printemps, seuls ceux gardés à l'étable pendant l'été excrètent encore la bactérie alors que ceux mis au pré n'en excrètent plus (Jonsson et *al.*, 2001). Ceci s'explique par une recontamination des animaux par l'intermédiaire de l'environnement de l'élevage (locaux, matériel...)

Il a été démontré que des souches de STEC O157 pouvaient survivre 60 jours dans le fourrage d'herbe (Davis et *al.*, 2005) et qu'elles étaient capables de se multiplier jusqu'à des taux de 10^7 UFC/g dans des ensilages mal conservés (Fenlon & Wilson, 2000). Les eaux d'arrosage des végétaux pourraient également être contaminées par des déjections animales et la présence d'*E. coli* dans des champs arrosés avec de l'eau d'irrigation souillée ou non traitée a été observée à de faibles taux (de 15 à 4×10^3 UFC/g) (Weinberg et *al.*, 2004). Des souches identiques d'*E. coli* O157 ont été retrouvées dans un sol et dans des eaux de lessivage suggérant ainsi que les bactéries pourraient être disséminées non seulement dans les eaux de surface *via* les eaux de ruissellement, mais aussi dans les eaux profondes des nappes phréatiques *via* les eaux de lessivage (Gagliardi & Karns, 2000).

Des souches de STEC appartenant au sérotype O26 ont pu être retrouvées jusqu'à 3 mois après leur inoculation dans des boues (Fremaux, Prigent-Combaret, et *al.*, 2007).

Ces divers travaux montrent que les STEC peuvent être présents dans différentes niches écologiques de l'environnement d'une ferme, créant ainsi des points de contamination multiple des animaux.

3.3 Mode de transmission à l'homme

Les études d'épidémiologie analytique et les enquêtes épidémiques ont permis d'améliorer les connaissances sur les modes de transmission et les sources de contamination des STEC. La

Figure 7 présente les flux potentiels des STEC entre le réservoir animal et l'homme. A l'heure actuelle, les 4 principales voies d'infection à EHEC sont l'ingestion d'aliments, la transmission hydrique (eau de boisson ou de baignade), la transmission interhumaine et le contact avec les animaux de ferme et leur environnement.

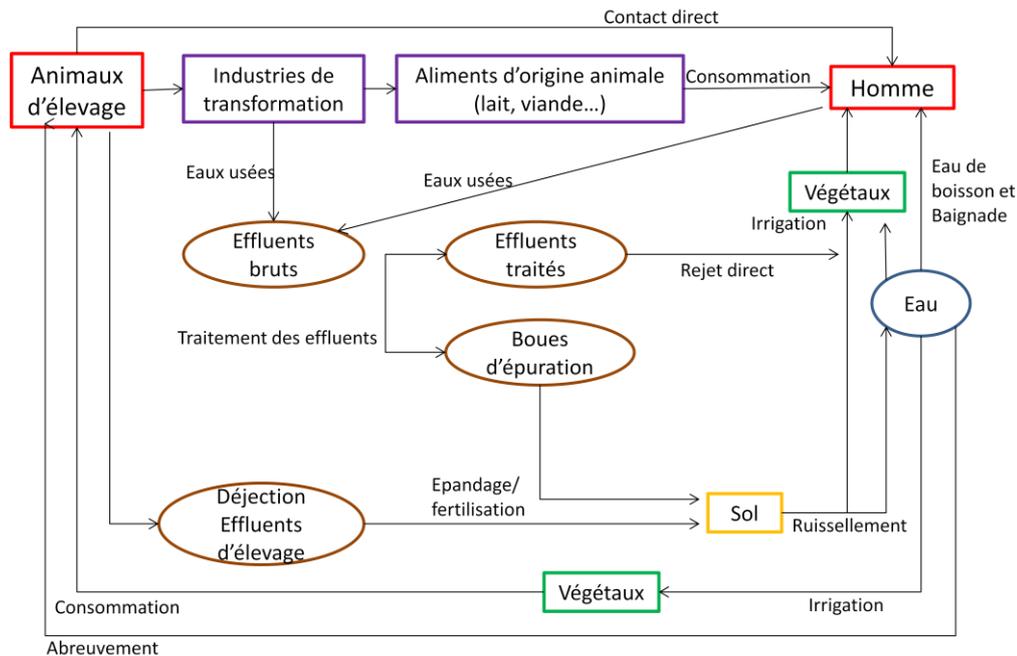


Figure 7 : Flux potentiel des STEC. Les flèches indiquent les flux potentiels de STEC entre les réservoirs que peuvent représenter les animaux d'élevages et l'homme (AFSSA, 2003).

a) Transmission alimentaire

La majorité des infections de l'homme est le résultat d'une transmission alimentaire. Après enquêtes épidémiologiques, un grand nombre des infections à *E. coli* O157:H7 a été relié à la consommation de denrées animales (Vernozy-Rozand & Montet, 2001). La viande de bœuf constitue la source majeure de contamination due à des problèmes d'hygiène lors de l'abattage suivis d'une cuisson insuffisante (Roberts et al., 1995). La viande d'autres animaux de boucherie ou de volailles a également été mise en cause (Doyle, 1991; Griffin & Tauxe, 1991; Paton et al., 1996; AFSSA, 2003). De même, des produits végétaux contaminés et des produits laitiers ont été à l'origine d'épidémies (Söderström et al., 2005; Denny et al., 2008; Guh et al., 2010; CDC, 2010; EFSA, 2011). Pour les végétaux des études ont fait état de la transmission des STEC de sols vers des laitues et du persil à partir respectivement de 77 et 177 jours après semis (Islam et al., 2004). Pour certains aliments, l'hypothèse d'une contamination croisée avec de la viande de bœuf ou *via* l'utilisation d'ustensiles contaminés a été avancée.

Les résultats obtenus dans le cadre du plan de surveillance 2009 mené en France par la

Direction générale de l'Alimentation (DGAl) révèlent une contamination des steaks hachés de bœuf réfrigérés de l'ordre de 0,1%. Le taux de contamination des viandes hachées surgelées avait été évalué à environ 0,3% lors du plan de surveillance 2007. Les données de ce plan de surveillance permettent d'évaluer la prévalence apparente de contamination des fromages au lait cru par les STEC pathogènes à environ 1%, tous sérotypes confondus. La prévalence de contamination des fromages au lait cru par O157:H7 est pour sa part inférieure à 0,3% (DGAl, 2010).

b) Transmission hydrique

Les épidémies d'origine hydrique sont généralement associées à la consommation d'eau de boisson ou à l'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades. Entre 1971 et 2000, des souches d'*E. coli* pathogènes étaient retrouvées dans 6% des épidémies dues à l'ingestion d'eau de boisson contaminée au USA (Craun et al., 2005). En Angleterre, 7 personnes ont été malades suite à l'ingestion accidentelle d'eau de baignade contaminée par *E. coli* O157 (Ihekweazu et al., 2006). Enfin, une épidémie d'infection à *E. coli* O157:H7 a fait plus de 2 300 malades au Canada en Mai 2000 suite à la consommation d'eau de boisson (Hrudey et al., 2003). *E. coli* O157:H7 a été retrouvé dans des eaux de surfaces ou des eaux usées au Canada (Jokinen et al., 2010).

Plusieurs épidémies liées à l'ingestion de végétaux contaminés par des EHEC ont été recensées suite à l'irrigation des cultures par des eaux contaminées, à l'épandage de fumier ou de lisier d'animaux contaminés (Ackers et al., 1998). Certaines études suggèrent même que l'eau d'irrigation puisse contaminer les végétaux par leurs racines (Wachtel et al., 2002).

c) Transmission interhumaine

Le portage sain humain de STEC existe mais semble rare et transitoire (Silvestro et al., 2004). La majorité des cas résulte d'une contamination indirecte mise en évidence chez les personnes en contact avec les malades. Il semble que cette transmission soit d'autant plus importante lorsque l'hygiène générale est mauvaise et que les contacts sont étroits. La transmission oro-fécale est une réelle préoccupation dans les crèches (Sugiyama et al., 2005) ou les centres de soins journaliers (Reida et al., 1994). Ce mode de transmission est aussi responsable de l'extension de l'infection au sein des familles et dans les hôpitaux (Bolduc et al., 2004; Karmali et al., 1999). La durée du portage serait en moyenne de 13 jours lors de colites hémorragiques et de 31 jours lors de SHU (Karch et al., 1995). Des épisodes de transmission interhumaine ont été observés durant la dernière épidémie allemande incriminant des graines germées de Fenugrec contaminées par *E. coli* O104:H4 (Hauri et al., 2011).

d) Transmission par contact avec un animal porteur ou son environnement

La transmission d'*E. coli* O157:H7 à l'homme, par contact direct ou indirect avec des animaux de ferme ou leurs déjections, a été décrite lors de cas sporadiques (Beutin et al., 2000; O'Brien et al., 2001) mais aussi lors d'épidémies (Milne et al., 1999; Crump et al., 2002; Muto et al., 2008). Par ailleurs, le taux de porteurs sains en *E. coli* O157 est plus élevé dans les populations vivant en contact permanent avec les animaux (Evans et al., 2000).

Le sol contaminé par les déjections des animaux de ferme a également été à l'origine d'épidémies à *E. coli* O157:H7, notamment durant des événements en plein air, tels que des festivals (Crampin et al., 1999) ou des campements touristiques sur des sols préalablement pâturés par des ruminants (Ogden et al., 2002). En Ecosse, du sol souillé a été impliqué dans 11% des infections environnementales à *E. coli* O157:H7 (Strachan et al., 2006).

4. Stratégies de limitation de la présence des STEC au sein du réservoir animal

En tant que réservoir de bactéries pathogènes particulièrement virulentes, la mise au point de stratégies de limitation du portage sain des STEC chez les bovins est un objectif prioritaire pour tout les acteurs de la santé publique. La prévalence des STEC semble varier sous l'action de multiples facteurs dont l'impact individuel est difficile à apprécier. Cependant, chacun de ces facteurs peut constituer un levier d'action pour la maîtrise du portage des STEC en élevage.

Le contrôle efficace des STEC passe notamment par la réduction de la fréquence et de l'intensité de l'excrétion fécale de ce pathogène par le bétail en plus de cibler les sources environnementales de cet organisme. En parallèle des bonnes pratiques d'élevage, des actions localisées peuvent être mises en place pour diminuer la prévalence des STEC dans les élevages et ainsi limiter leur entrée dans la chaîne alimentaire. Le chapitre ci dessous présente les principales actions susceptibles de limiter le portage sain chez les STEC.

4.1 Actions globales

Les **bonnes pratiques d'élevage** sont un ensemble de règles appliquées par les professionnels de la filière bovine dans le but de créer une dynamique d'évolution et de progrès pour assurer l'avenir du métier d'éleveur (Confédération Nationale de l'Élevage 2009). La charte des bonnes pratiques insiste sur 7 points essentiels :

- L'identification des animaux (mise à jour du registre d'élevage)

- La qualification sanitaire (respect des vaccinations, surveillance de l'état de santé du troupeau...)
- Les traitements sanitaires (traçabilité des traitements, repérage des animaux...)
- L'alimentation saine et maîtrisée (stockage et distribution sécurisés, accès libre à l'eau propre...)
- L'hygiène de la production laitière (contrôle des machines, isolement des zones de traite...)
- L'hygiène et le bien être des animaux (propreté des locaux, abrit pour l'hiver...)
- L'environnement et l'accès à l'élevage (maîtrise des effluents, gestion des épandages...)

Il est possible d'agir sur ces différents leviers pour diminuer la prévalence des STEC dans les élevages.

Il s'agit alors d'appliquer des règles simples, peu coûteuses à mettre en œuvre, et qui ont potentiellement un effet important sur la réduction des STEC dans les élevages.

a) Au niveau de l'environnement de l'élevage

Limiter les contaminations fécales dans l'environnement de la ferme peut permettre de diminuer la prévalence des STEC. De nombreux éléments de la ferme ont été identifiés comme sources de dissémination de STEC notamment les sols, le fumier et le lisier, l'eau ou encore les locaux.

L'élimination de la présence des STEC dans l'eau passe par l'utilisation d'eau non souillée (eau du réseau ou eau de forage) régulièrement contrôlée (analyse bactériologique fréquente), par le maintien des réserves et citernes couvertes et des abreuvoirs propres. Le non respect de ces consignes est associé à un degré de contamination de l'eau par *E. coli* plus important (LeJeune, Besser, Merrill, et *al.*, 2001). Afin de limiter la contamination *via* les abreuvoirs il serait préférable de mettre en place des accès individuels à l'eau (tétines individuelles). Il serait aussi possible d'envisager une filtration de l'eau d'abreuvoir avant distribution cependant cette méthode n'a aucun effet sur les épisodes de recontamination futurs.

Les principaux aliments composant le régime alimentaire des bovins sont : le foin, la paille, l'ensilage de fourrage, les minéraux et vitamines, les aliments concentrés (farines et coproduits), les additifs et l'eau (Normand et *al.*, 2005). Les aliments comme la paille, le foin, les farines ont des taux de matière sèche très élevés (supérieur à 80 %) ce qui suffit a priori pour limiter la présence de pathogènes. Par conséquent, les aliments à risque au regard de la survie et de la multiplication des STEC sont l'ensilage et certains coproduits humides ainsi que l'eau et l'herbe pâturée.

La survie des STEC dans le sol pendant de longues durées est avérée (voir 3.2 a)) et il est nécessaire d'isoler les zones de stockage des aliments des autres zones pouvant être souillées. Le reste du site est en accès libre aux personnes et aux animaux de l'élevage ainsi qu'aux animaux indésirables (renards, rats...) qui représentent un vecteur potentiel de dissémination des STEC. L'isolement des zones de stockage dans des entrepôts fermés, propres, et en accès contrôlé empêche l'introduction et la dissémination des STEC au réservoir bovin par ingestion.

Contrôler la qualité sanitaire des aliments par un cahier des charges rigoureux ainsi que mettre en place de bonnes pratiques d'ensilage permet de limiter la présence de STEC. La contamination initiale de l'ensilage est liée à la présence des bactéries dans la terre, les fourrages verts ou encore dans les substances d'épandage ayant été répandues auparavant (Weinberg et *al.*, 2004). Bien qu'une période de 2 mois doive être respectée entre le dernier épandage et la date de la récolte, ce laps de temps n'est pas suffisant pour assurer la disparition des pathogènes (AFSSA, 2004). Lorsque les conditions d'anaérobiose sont insuffisantes des bactéries indésirables, notamment les STEC, peuvent se développer. Fenlon & Wilson, (2000) ont observé une augmentation de 10^3 à 10^7 UFC/g d'*E. coli* O157 inoculé dans de l'ensilage mal étanchéifié et stocké à 20°C durant une semaine.

S'il semble difficile de maîtriser la contamination des fourrages verts au moment de la récolte, il est envisageable de maîtriser le développement des STEC par l'intermédiaire des fermentations dans l'ensilage (voir chapitre 3). Des mesures pratiques permettent d'éviter l'incorporation de terre potentiellement contaminée dans les fourrages : suppression des taupinières dans les parcelles, réglage approprié de la hauteur des barres de coupe pendant la récolte, aménagement de la circulation des remorques de fourrage et des engins de tassement pendant le chantier d'ensilage...

b) Entretien des locaux

De mauvaises conditions de logement telles que l'accumulation de fumier ou un sol humide dans les étables de même que le nettoyage des aires de stabulation des animaux par l'utilisation de jet d'eau et non par raclage à sec seraient associés à une excrétion accrue de STEC (Smith et *al.*, 2001; Davis et *al.*, 2005). Du fait de la capacité des STEC à survivre dans l'environnement pendant de longues durées, la persistance dans l'élevage est particulièrement importante et le nettoyage des locaux est une étape incontournable.

Ellis-Iversen et *al.* (2008) ont montré que de telles mesures étaient efficaces pour diminuer la prévalence des STEC dans les élevages. Des essais cliniques contrôlés portant sur une cinquantaine de fermes ont montré que des mesures de nettoyage (entretien de la litière notamment) et d'isolement des jeunes animaux étaient les plus efficaces. Durant les 4 mois et

de l'étude, les fermes suivant ces consignes ont observé une diminution de 48% du nombre d'*E. coli* O157 contre 18% pour les fermes témoins n'ayant pas modifié leurs pratiques.

Bien que les STEC ne soient pas connues comme souches fortement productrices de biofilm, à l'inverse d'autres bactéries pathogènes telles que *Listeria* sp. par exemple (Carpentier & Olivier Cerf, 2011), de nombreux auteurs ont fait état de la présence de STEC dans des biofilms à différentes étapes de la chaîne alimentaire. Notamment, LeJeune, Besser & Hancock (2001) ont recensé des souches de STEC dans les biofilms présents dans des abreuvoirs et Sofos & Geornaras (2010) ont observé des biofilms dans des produits carnés. Les opérations de nettoyage et désinfection effectuées de manière régulière dans les industries alimentaires suffisent dans la plupart des cas à éliminer le pathogène. Cependant, ces opérations ont lieu dans les industries agroalimentaires mais un suivi devrait être mis en place au niveau des élevages, plus particulièrement pour assurer la propreté des abreuvoirs.

c) Séparation des animaux

Les conditions d'hébergement jouent un rôle prépondérant dans la prévalence du portage fécal en STEC des troupeaux bovins. Ainsi plusieurs auteurs ont constaté une augmentation du risque de contamination lorsque les animaux sont groupés au sein d'un même enclos (Smith et al., 2001). Comme aucune méthode ne permet actuellement de détecter les animaux excréteurs de STEC de manière rapide et fiable, il existe des catégories d'animaux considérés comme à risque et devant être isolés des autres. Ce sont les jeunes veaux car ils excrètent *E. coli* en plus grande quantité que les adultes (Rugbjerg et al., 2003) ; les animaux malades (diarrhées...) ainsi que les autres espèces animales (moutons, chevaux, chèvres...). L'isolement de ces animaux potentiellement porteurs permettrait de limiter les contaminations croisées. Les veaux élevés ensemble, sans nouvel arrivant, développent le même statut immunitaire contre les *E. coli* existants dans leur environnement. En effet, l'introduction d'un animal de statut immunitaire différent peut provoquer un déséquilibre de la relation hôte-pathogène et ainsi provoquer une excrétion plus importante et une augmentation du nombre de pathogènes (Ellis-Iversen et al., 2008). De même lorsqu'un nouvel animal rejoint l'élevage, une période d'adaptation est nécessaire avant de l'intégrer au troupeau. L'apport d'animaux nouveaux au sein du troupeau augmenterait le portage fécal global probablement lié à une inter-contamination horizontale (Wilson et al., 1998).

Les animaux super-excréteurs caractérisés par une excrétion fécale bien plus longue et importante que pour les autres animaux, servent de relais de contamination (voir 3.1). Il serait donc nécessaire de les identifier pour les isoler. Cependant, aucune méthode rapide et peu coûteuse n'existe à ce jour. De plus, selon les méthodes de détection employées, le portage peut

être sous estimé (Cernicchiaro et *al.*, 2011). Les auteurs ont aussi évalué l'effet du régime alimentaire et de différents additifs sur des animaux super-excréteurs mais les résultats sont fortement dépendants de la méthode de détection utilisée et ne sont donc pas significatifs (Cernicchiaro et *al.*, 2010).

4.2 Actions ciblées :

En plus des bonnes pratiques d'élevage présentées ci-dessus, des actions préventives peuvent être mises en place pour diminuer la prévalence des STEC dans les élevages et ainsi limiter leur entrée dans la chaîne alimentaire.

a) Le changement de ration alimentaire

Il existe de nombreuses études sur l'influence du régime alimentaire et l'excrétion des STEC dans les fèces de bovins. Pourtant, à ce jour, aucune corrélation assez forte n'a été mise en évidence pour servir de base à de nouvelles méthodes et de nouvelles pratiques nutritionnelles visant à réduire l'excrétion des STEC.

En effet la plupart des études énoncent des résultats contradictoires sur l'effet de la survie et de la colonisation des STEC dans le tube digestif des bovins suivant un régime à base de céréales ou à base de foin (Tableau 3). Les études utilisent en général un faible nombre d'animaux et de fortes variations individuelles sont souvent observées, ce qui conduit à une significativité statistique très faible. Les méthodes de détection employées varient selon les études, or la détection des EHEC suivant des techniques moléculaires ou en utilisant la séparation immunomagnétique a montré que le taux de détection de *E. coli* O157:H7 est 100 fois plus important qu'en utilisant des méthodes classiques de cultures après enrichissement (Callaway et *al.*, 2003).

Effet du régime alimentaire

Le régime alimentaire, notamment le type de céréales, la méthode de conservation des aliments et leurs qualités sont des facteurs influençant la prévalence d'*E. coli* O157 chez les ruminants (Jacob et *al.*, 2009). Il semble qu'un changement de régime alimentaire n'ait aucun effet sur l'excrétion de *E. coli* O157:H7 lorsque les animaux sont présents dans les enclos depuis un mois ou plus (Stanford et *al.*, 2005) ; bien que d'autres auteurs aient montré une augmentation de la durée d'excrétion des STEC due à un changement brutal de régime alimentaire, sans préciser cependant le temps d'adaptation des animaux (Hovde et *al.*, 1999). Une synthèse des nombreux travaux concernant l'effet de changements de régime alimentaire sur l'excrétion de *E. coli*

O157:H7 réalisée par Callaway et *al.*, (2009) a mis en évidence une forte variabilité des résultats obtenus. Russell et *al.* (2000) ont examiné différentes études sur l'effet d'un changement de régime à base de grains vers un régime à base de foin et inversement sur *E. coli*, en termes d'acido-résistance des bactéries et de durée du changement de l'écologie du rumen notamment. Un régime à base de grains induit une fermentation plus importante au niveau du colon pouvant favoriser la survie de *E. coli* ainsi que le déclenchement d'éventuels mécanismes d'acidorésistance chez ce pathogène. Un régime à base de foin ou à base de grains complétés avec d'autres aliments serait donc préférable selon ces auteurs.

Le régime alimentaire peut donc influencer le devenir des STEC dans le tube digestif des ruminants et potentiellement réduire l'entrée de ces pathogènes dans la chaîne alimentaire (Tableau 3).

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des études menées sur l'effet du régime alimentaire sur l'excrétion des STEC chez les bovins. Les conséquences sont observées par rapport au changement de : Régime initial → Régime modifié

Animaux testés	Changement de régime	Conséquences sur <i>E. coli</i> O157 dans les fèces	Références
Bétail adulte	Orge-Maïs → Foin	Augmentation de la durée d'excrétion	Hovde <i>et al.</i> (1999)
	Maïs → Orge		Buchko <i>et al.</i> (2000)
	Ensilage Foin → Grains maïs	Augmentation de l'excrétion	Rugbjerg <i>et al.</i> (2003)
	Ensilages Foin → Mélasse		Rugbjerg <i>et al.</i> (2003)
Veaux (3-4 mois)	Maïs-Soja-Luzerne → Orge		Jacob <i>et al.</i> (2010)
	Lait → Foin		Rugbjerg <i>et al.</i> (2003)
Bétail adulte	Foin → Orge-Maïs	Diminution de la durée d'excrétion	Hovde <i>et al.</i> (1999)
	Orge → Maïs	Diminution de la survie à 10°C	Bach, Stanford, <i>et al.</i> (2005)
Veaux (5-24 mois)	Foin → Maïs	Diminution de l'excrétion	Callaway <i>et al.</i> (2003)
	Concentrés- Ensilages → Orge	Diminution de l'excrétion	Rugbjerg <i>et al.</i> (2003)

Le régime alimentaire des bovins peut notamment avoir des effets opposés selon l'âge des animaux. L'étude menée par Rugbjerg *et al.* (2003) a porté sur 8 troupeaux laitiers danois durant une année (Tableau 3). Les variations d'excrétion d'*E. coli* O157:H7 peuvent s'expliquer par des différences dans la composition de la flore intestinale des animaux. Celle-ci peut être déstabilisée par des stress, notamment lorsque les animaux doivent être transportés ou lors d'un changement brutal de régime alimentaire. L'excrétion des STEC est dépendante des saisons et il est connu que les phénomènes de stress thermiques altèrent la fonction digestive et induisent notamment un risque d'acidose accru (Beatty *et al.*, 2006) pouvant influencer le devenir des bactéries pathogènes telles que les STEC.

Enfin, le changement brutal de la prairie au foin 48h avant l'abattage réduit significativement le nombre de *E. coli* tout au long du tube digestif des ruminants et augmente le nombre d'entérocoques intestinaux capable d'inhiber les *E. coli* (Callaway *et al.* 2003).

Ces études ne permettent cependant pas de faire ressortir de manière claire l'utilisation d'un régime en particulier pour diminuer la fréquence des STEC dans le tube digestif des bovins.

Les drêches sont composées des enveloppes de grains concassées auxquelles adhèrent toutes les substances qui n'ont pas été solubilisées au cours des opérations de brassage. Les protéines de la drêche sont donc peu solubles et sont peu dégradées dans le rumen ce qui augmente le potentiel azoté de la ration. Les drêches de brasserie se trouvent sous 2 formes : séchées ou humides. La complémentation de l'alimentation avec des drêches permet d'augmenter les performances des animaux (gain de poids, rendement de production laitière amélioré...) (Jacob, Parsons, et *al.*, 2008). Des études ont montré une corrélation forte entre une alimentation supplémentée en drêche et une augmentation de la prévalence de *E. coli* O157:H7 chez les animaux testés. Cet effet serait dépendant de la quantité de drêches ingérée (Jacob, Fox, et *al.*, 2008). Ce phénomène dose-dépendant a été observé par Yang, Yang, et *al.* (2010) dans des fèces de bovins mais pas dans le contenu ruminal des animaux. Selon ces auteurs, il semblerait que le type de drêche influence la survie des STEC qui serait favorisée avec des drêches issues de maïs comparé aux drêches issues de blé.

Effet de l'acidité

Il est important de différencier l'effet de la valeur du pH de celui des acides. Pour une même valeur de pH l'effet d'un acide minéral sera différent de celui d'un acide organique. Contrairement à l'acide minéral, une partie de l'acide organique se trouve sous forme dissociée et la forme non dissociée peut diffuser à travers la membrane bactérienne altérant ainsi diverses fonctions cellulaires (Chaucheyras-Durand et *al.*, 2010).

Nourrir le bétail à l'aide de céréales a un effet important sur le microbiote du rumen et sur la santé de l'animal en général (Cray et *al.*, 1998). En comparaison d'une alimentation au pré ou avec des fourrages verts, il a été montré qu'un régime riche en céréales augmentait l'acidité du fluide ruminal (pH et acides gras volatils (AGV)) inhibant ainsi la croissance des STEC même en aérobiose (Bach, Stanford, et *al.*, 2005; Lowe et *al.*, 2010). Cependant une alimentation riche en grains pourrait induire des mécanismes d'acido-résistance chez ces bactéries favorisant leur survie lors du passage dans le tractus intestinal (notamment la caillette à pH 2,5) et leur excrétion. Lorsque les animaux passent brutalement d'un régime à base de céréales à du foin, une élimination quasi-totale (99%) de la population d'*E. coli* acido-résistants est observée confirmant le lien entre acidorésistance et régime à base de grains (Diez-Gonzalez et *al.*, 1998). Si le changement vers un régime à base de céréales est brutal, le milieu ruminal devient fortement acide du fait de l'utilisation rapide par les bactéries lactiques de la grande quantité d'amidon issu des céréales ce qui peut augmenter la mortalité des STEC. Au contraire lorsque le changement est progressif, les bactéries du rumen s'adaptent, par conséquent le pH est moins affecté et l'écologie du rumen est moins altérée (Russell & Rychlik, 2001). Ces conditions d'acidification progressive peuvent induire, chez les STEC ainsi que chez d'autres microorganismes, des mécanismes de résistance à l'acidité. De plus Chaucheyras-Durand et *al.*,

(2010) ont montré que l'acido-résistance des STEC pouvait être induite après un court passage dans le contenu ruminal faiblement acide (pH 6,93, AGV 84,5mM) d'animaux nourris avec du foin. La résistance des STEC au stress acide rencontré dans la caillette (pH 2,5) est notamment induite par des facteurs environnementaux (Boukhors et *al.*, 2002) et la mortalité des STEC observée avec un régime à base de céréales serait due à la présence d'AGV combinés avec un pH plus acide que dans le rumen. *In vivo*, les AGV produits par les fermentations sont rapidement absorbés à travers la paroi du rumen et ne s'accumulent pas, évitant ainsi une baisse de pH trop importante, dangereuse pour la santé de l'animal (Chaucheyras-Durand et *al.*, 2006). Par conséquent, l'effet inhibiteur des AGV observé sur *E. coli* lors d'études *in vitro* doit être nuancé. Malgré cela des études *in vivo* ont démontré que l'acido-résistance des souches d'*E. coli* O157:H7 était dépendante de la concentration en AGV plutôt que de la valeur du pH ruminal (Fu et *al.*, 2003).

Enfin certains auteurs ont montré que le régime alimentaire n'avait pas d'effet significatif sur l'acido-résistance de *E. coli* O157:H7 chez les bovins (Hovde et *al.*, 1999).

Les facteurs abiotiques tels que le pH, ou la teneur en oxygène sont très souvent pris en compte dans l'évaluation de la survie des pathogènes dans le tractus digestif des animaux, cependant la flore intestinale endogène joue un rôle important. Chaucheyras-Durand et *al.* (2006) ont montré que la flore ruminale de l'animal diminuait fortement la survie des *E. coli* O157:H7 par une plus forte production d'AGV, mais ce phénomène n'a pas été mis en évidence pour la flore fécale.

On peut supposer que les STEC ayant survécu aux conditions acides du tractus digestif des bovins, particulièrement ceux nourris avec un régime à base de céréales, auront une meilleure survie dans les processus alimentaires de décontamination ainsi que dans la barrière gastrique humaine et de ce fait présenteront un risque plus élevé pour la santé humaine. Les résultats de l'influence du régime alimentaire sur l'acido-résistance des bactéries sont variables selon les études. Ceci est dû à des différences de méthodologies utilisées comme l'utilisation de chocs acides différents pour évaluer l'acido-résistance des souches (Diez-Gonzalez et *al.*, 1998; Hovde et *al.*, 1999; Chaucheyras-Durand et *al.*, 2010).

Effet d'une période de jeûne

Des auteurs ont démontré que le jeûne augmente le nombre de *E. coli* dans le rumen (Brownlie & Grau, 1967; Buchko et *al.*, 2000). Cray et *al.* (1998) ont montré que des veaux en période de jeûne ayant préalablement ingéré *E. coli* O157:H7 excrètent une population de microorganismes plus importante que des veaux nourris normalement. De même, la croissance de *E. coli* n'est pas inhibée dans du fluide ruminal collecté auprès d'animaux en période de jeûne (Rasmussen et *al.*, 1993). La mise en place d'une période de jeûne ne semble donc pas adaptée pour diminuer l'excrétion fécale des STEC bien que cette technique ait été envisagée avant d'envoyer les

animaux à l'abattoir afin de diminuer leur transit et le degré de salissures des cuirs qui en résulte.

b) Apport d'additifs alimentaires pour le ruminant

Ajout d'agents chimiques dans l'eau:

Il est possible d'agir directement sur un autre apport indispensable du bétail : l'eau. L'utilisation d'une approche à barrières multiples, incluant un traitement adéquat, un réseau de distribution bien entretenu et une protection de la source d'eau, constitue la meilleure approche pour garantir la qualité de l'eau.

Le chlore, la chloramine, les rayons UV, l'ozone et le dioxyde de chlore sont utilisés couramment comme désinfectants de l'eau potable. Le chlore est actuellement le désinfectant le plus répandu dans l'industrie. C'est un oxydant puissant mais il est aussi moins efficace pour inactiver les organismes présents dans les biofilms. Le chlore a un effet bactéricide contre les bactéries capables de réduire les nitrates, comme *E. coli*. Cependant, plusieurs bactéries importantes et bénéfiques dans le rumen et l'intestin des bovins réduisent les nitrates (*Selenomonas*, *Wolinella*) et risquent donc d'être tuées par l'ajout de chlore (Hungate, 1966). Ces espèces sont indispensables pour le fonctionnement normal de l'écosystème microbien. Si l'ajout de chlore est réalisé uniquement durant les dernières 24h avant l'abattage, l'impact des changements de l'écosystème ruminal sera négligeable pour la santé ou la productivité de l'animal (Callaway et al., 2001).

Des études *in vitro* indiquent qu'une addition de chlore à du fluide ruminal réduit significativement les populations d'*E. coli* O157:H7 sans modifier la flore anaérobie (Anderson et al., 2000). Callaway et al. (2002) ont constaté une diminution du nombre de coliformes liée à une diminution du nombre d'*E. coli* O157 le long du tractus digestif bovin lors d'un ajout de chlore dans l'eau d'abreuvoir. Ces auteurs ont cependant observé l'apparition de souches d'*E. coli* O157:H7 chlore-résistantes.

Il existe d'autres désinfectants tels que la chloramine qui réside plus longtemps dans l'eau que le chlore et peut ainsi pénétrer dans un éventuel biofilm présent dans les conduits et réservoirs d'eau. La chloramine est toutefois moins efficace contre une flambée subite de contamination (Snead et al., 1980).

Tout comme les rayons UV, l'ozone est très efficace au point de traitement, mais il faut ajouter d'autres désinfectants (habituellement du chlore ou de la chloramine) pour produire une concentration résiduelle efficace. Le dioxyde de chlore est aussi efficace et, dans certains cas, plus efficace que le chlore. Toutefois, son utilisation n'est pas très répandue du fait de son état

gazeux à température ambiante et des risques d'explosion qui en découlent. Il existe aussi de nombreuses méthodes de filtration qui permettent de limiter la présence de pathogènes mais ces méthodes n'ont aucun impact sur une recontamination de l'eau en aval par les animaux.

Ajout de différents additifs dans les aliments:

Des études ont porté sur l'évaluation de la survie des STEC dans des fèces de bovins dont la nourriture a été supplémentée avec différents éléments.

Le taux de mortalité d'*E. coli* O157:H7 est significativement plus élevé dans des fèces de bovins préalablement nourris avec de l'ensilage de maïs supplémenté par 0,5 % d'acide trans-cinnamique ou de 0,5 % d'acide para-coumarique comparé au lot témoin. Ces acides phénoliques, retrouvés dans les fourrages à hauteur de 2 à 10 g/kg inhibent la survie d'*E. coli* O157:H7 (Berard et al., 2009; Wells et al., 2005). L'ajout d'esculine, molécule appartenant à la famille des coumarines, inhibe la survie d'*E. coli* O157 dans le colon de veaux infectés expérimentalement (Duncan et al., 2004). A l'inverse, l'ajout de 6% d'huile de canola (graine de colza) dans la ration alimentaire d'orge ou de maïs de bovins contaminée avec 10^{10} UFC d'*E. coli* O157:H7 n'induit pas d'effet sur l'excrétion du pathogène (Bach, Selinger, et al., 2005). Une étude portant sur la supplémentation de l'alimentation des bovins en monensin n'a pas mis en évidence d'effet de cet additif sur l'excrétion fécale d'*E. coli* O157:H7 (Swyers et al., 2011).

L'utilisation du prébiotique Celmanax™ à 1% a montré une diminution de 98 % de la colonisation des cellules du jejunum de bovins par *E. coli* O157:H7 *in vitro* comparé aux cellules témoins. De même l'utilisation de 0,1% de Celmanax™ a permis de diminuer de 50 % l'adhésion des pathogènes sur les cellules du colon *in vitro* (Baines, Erb, Lowe, et al., 2011).

Ajout de probiotiques

De nombreuses études ont été réalisées sur l'effet de divers probiotiques vis-à-vis de l'excrétion de STEC par les bovins (McAllister et al., 2011).

In vitro

L'ajout de 5, 10, 15 ou 20 mg/ml de *Saccharomyces cerevisiae* subsp *bouardii* dans du jus de rumen inoculé avec 10^4 UFC/ml d'*E. coli* O157:H7 montre une disparition complète du pathogène en 48h *in vitro* selon un effet dose-réponse (Bach et al., 2003). Chaucheyras-Durand et al. (2010) ont montré l'effet inhibiteur d'un ajout quotidien de 4×10^9 UFC de *Saccharomyces cerevisiae* ou de 5×10^9 UFC de *Lactobacillus acidophilus* sur la croissance et la survie de souches de STEC inoculées directement dans le contenu ruminal également supplémenté par ces mêmes probiotiques.

In vivo (voir Tableau 4)

Les bactéries probiotiques administrées aux animaux appartiennent à 2 catégories : les bactéries productrices d'acide lactique et celles qui l'utilisent. L'action des bactéries productrices d'acide lactique est indirecte puisqu'elles favorisent le développement des bactéries endogènes du rumen utilisatrices de lactate, ce qui a été associée à un effet bénéfique chez l'animal (diminution du risque d'acidose, bonne fermentation ruminale...). Il est aussi possible d'ajouter directement les bactéries utilisatrices d'acide lactique telles que *Propionibacterium* (McAllister et al., 2011). *Lactobacillus acidophilus* est associé à une diminution de la fréquence des STEC dans de nombreuses études. Son efficacité augmente avec la dose administrée (Younts-Dahl et al., 2005). L'utilisation de cocktail de bactéries de différentes espèces semble avoir un effet barrière plus important (Lema et al., 2001). Des souches commensales d'*E. coli*, ont été aussi beaucoup étudiées pour leur potentiel inhibiteur des STEC, notamment *via* la production de bactériocine (ie colicine) (Brashears, Jaroni, et al., 2003).

Dans l'ensemble l'emploi de probiotiques est associé à une diminution de la survie d'*E. coli* O157:H7 dans le tractus digestif bovin, cependant il semble que l'emploi de probiotiques doive être adapté à l'âge des animaux du fait de la modification de la flore intestinale en fonction de l'âge. De plus, une interaction avec leur régime alimentaire n'est pas à exclure et devrait être envisagée dans l'évaluation de l'efficacité des probiotiques.

Tableau 4 : Récapitulatif des études menées en inoculant des probiotiques aux animaux et en suivant l'excrétion d'*E. coli* dans les fèces. La concentration de STEC inoculée n'est pas précisée pour les études portant sur une excrétion naturelle des pathogènes.

Microorganismes utilisés	Durée du traitement	Concentration (UFC/animal)	Age de l'animal	Effet	Référence
<i>Escherichia coli</i> compétitives /exclusives	Une seule fois en 30 jours	10 ¹⁰ STEC + 10 ¹⁰ <i>E. coli</i> probiotiques	Veaux de 8 à 10 semaines	Diminution de l'excrétion des <i>E. coli</i> O157:H7 et O111 Pas de différence dans l'excrétion de <i>E. coli</i> O26:H11.	Tkalcic et al. (2003)
<i>Escherichia coli</i> compétitives /exclusives	Une seule fois en 8 jours	10 ⁸ STEC + 10 ¹⁰ <i>E. coli</i> probiotiques	Veaux de moins de 1 semaine	Diminution du nombre de <i>E. coli</i> O26:H11 et O111 dans les fèces. Pas de différences pour <i>E. coli</i> O157:H7.	Zhao et al. (2003)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NP 51	Quotidien de Mai à Septembre sur 2 ans	10 ⁹ NP51	Adulte	Diminution de l'excrétion de <i>E. coli</i> O157:H7	Peterson, Klopfenstein, Erickson, et al. (2007)
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. cellobiosus</i> , <i>Leuconostoc spp</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>	Une seule fois	/	Adulte	Diminution du nombre d' <i>E. coli</i> dans le fluide ruminal	Brashears, Jaroni, et al. (2003)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NPC 747	Quotidien sur 14 jours	/	Adulte	Diminution de l'excrétion d' <i>E. coli</i> O157:H7	Brashears, Galyean, et al. (2003)

<i>Lactobacillus acidophilus</i> NP 51 ou NP 45 + <i>Propionibacterium freudenreichii</i> (P)	Quotidien	10 ⁹ NP51 + 10 ⁶ NP45 + 10 ⁹ P OU 10 ⁹ NP51 + 10 ⁶ P	Adulte	Diminution de l'excrétion de <i>E. coli</i> O157.	Elam et al. (2003)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NP 51 ou NP 45 + <i>Propionibacterium freudenreichii</i> (P)	Quotidien sur 28 jours	10 ⁹ P + 10 ⁹ NP51 OU 10 ⁸ NP45 + 10 ⁹ NP51 OU 10 ⁹ NP51 +10 ⁷ NP45	Adulte	Diminution de l'excrétion de <i>E. coli</i> O157 surtout avec NP51 seule Pas d'effet de NP51+NP45.	Younts-Dahl et al. (2005)
<i>L. acidophilus</i> NP 51 ou NP 45 + <i>Propionibacterium freudenreichii</i> (P)	Quotidien sur 14 jours	10 ⁹ P + 10 ⁹ NP51 OU 10 ⁶ NP45 + 10 ⁹ NP51 OU 10 ⁶ NP51 +10 ⁶ NP45	Adulte	Diminution de l'excrétion de <i>E. coli</i> O157 uniquement avec NP51 Pas d'effet de NP51+NP45.	Younts-Dahl et al. (2004)
<i>L. acidophilus</i> <i>Streptococcus faecium</i> <i>L. casei</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. plantarum</i>	Quotidien sur 7 semaines	10 ¹⁰ <i>E. coli</i> O157:H7/ mouton + 6*10 ⁶ bactéries /kg de nourriture	Moutons adultes	Le cocktail des 5 bactéries ou de <i>L.</i> <i>acidophilus</i> et <i>S.faecium</i> diminue l'excrétion de <i>E. coli</i> O157:H7. Les bactéries seules n'ont pas d'effet.	Lema et al. (2001)
<i>Escherichia coli</i>	Une seule fois en 28 jours	10 ¹⁰ <i>E. coli</i> probiotiques + 10 ¹⁰ <i>E. coli</i> O157:H7	Veaux	<i>E. coli</i> O157:H7 n'est plus retrouvé dans le rumen des veaux traités ni dans leurs fèces sauf pour un animal sur 9.	Zhao et al. (1998)

		10 ¹¹ <i>E. coli</i> O157:H7/anim al +10 ⁷		Le nombre de <i>E. coli</i> O157:H7 est plus faible chez les veaux traités	
<i>Escherichia coli</i> productrices de colicine E7	24 jours 21 jours	probiotique/g de nourriture OU 10 ⁸ probiotique/g de nourriture	Veaux	44% des tissus de veaux traités étaient colonisés par <i>E. coli</i> O157:H7 contre 64% pour les veaux témoins	Schamberger et al. (2004)
<i>Streptococcus</i> <i>bovis</i> LCB6 <i>Lactobacillus</i> <i>gallinarum</i> LCB12	Une seule fois durant 28 jours	10 ¹⁰ <i>E. coli</i> O157:H7 + 10 ¹¹ probiotique/ animal	Veaux	L'excrétion de <i>E.</i> <i>coli</i> O157:H7 est totalement inhibée entre le 14 et 17 ^{ème} jour et ne redémarre pas	Ohya et al. (2000)

La flore digestive de l'hôte peut aussi influencer l'efficacité des probiotiques. Notamment la présence de protozoaires peut avoir un effet de prédation sur ces pathogènes ou au contraire un effet protecteur (Stanford, Bach, et al., 2010). Une étude portant sur la production de toxines Stx2 a montré que la présence de la bactérie *Bacteroides thetaiotaomicron* (bactérie commensale du tube digestif humain) diminuait de 70% la production de la toxine par *E. coli* O157:H7 (de Sablet et al., 2009).

Wood et al. (2006) ont établi des modèles de simulation du tractus digestif bovin afin d'explorer l'efficacité de diverses méthodes pour réduire la population de *E. coli* O157. Parmi les méthodes prises en compte l'utilisation de probiotiques semble la plus prometteuse. L'emploi d'antibiotiques est aussi efficace d'après ce modèle mais pose des problèmes de dissémination de gènes de résistance. Toujours d'après ces auteurs, les modèles établis ne permettent pas de visualiser un effet net du changement de régime alimentaire sur l'excrétion de *E. coli* O157. L'utilisation de probiotiques chez les animaux peut aussi avoir des effets en aval, sur le réservoir environnemental. La majeure partie des probiotiques survit au passage dans le tractus intestinal et peut donc être excrétée en même temps que les pathogènes. Le phénomène de compétition observé chez l'animal peut aussi avoir lieu dans d'autres environnements tels que les fèces bovins, le sol ou encore le fumier ou le lisier (Harmon et al., 1999).

La mise en place de méthode d'HACCP a permis de diminuer les niveaux de contamination de *E. coli* O157 dans la viande notamment (Buncic & Avery, 1997). Cependant, il a été démontré que de telles méthodes seules ne suffisaient pas (Chapman et al., 1993). Il est possible de supposer que ce constat s'applique au reste du cycle épidémiologique des STEC : dans le tractus digestif des bovins, dans les aliments, dans les sols...

Ajout d'agents microbiologiques et chimiques dans l'ensilage pendant la période de stockage

L'ensilage est une technologie de conservation de fourrages afin de servir de nourriture au bétail durant les périodes de l'année où le pâturage n'est pas envisageable. Dans ce cas de figure, l'aliment devient le support des agents microbiologiques en permettant leur multiplication dans le but de limiter la survie et la croissance des bactéries pathogènes. Cette inhibition se fait par le biais de compétition pour l'accès aux nutriments, de production de substances inhibitrices : des acides (acide lactique), des peptides antimicrobiens... Les différents agents employés doivent avoir un effet protecteur contre le développement des STEC sans altérer, voire en améliorant, les propriétés nutritionnelles de l'ensilage. Ces méthodes ne seront pas développées dans cette partie mais ultérieurement au Chapitre 3.

c) Utilisation de phage

Les bactéries peuvent être dégradées par un large nombre de virus appelés bactériophages. Ceux-ci constituent des agents assainissants potentiels permettant une élimination sélective des pathogènes présents dans le tractus intestinal des bovins.

L'activité lytique de différents phages envers des STEC d'origine bovine ou humaine est démontrée (Niu et al., 2009). Cependant, les auteurs ont observé des souches d'*E. coli* O157:H7 résistantes à l'action de certains phages lytiques et l'emploi d'un cocktail de phages serait alors une stratégie intéressante. Par ailleurs, les bactériophages perdant généralement leur activité lytique à pH acide, l'utilisation de phages encapsulés pourrait être une méthode d'administration efficace (Stanford, McAllister, et al., 2010). Beaucoup de résultats découlent d'études *in vitro* et des recherches plus poussées sont nécessaires pour valider l'utilisation de phages comme stratégie de prévention du portage sain (Rivas et al., 2010). Enfin le devenir des phages dans l'environnement et au contact de nombreux autres microorganismes n'est pas totalement maîtrisé à l'heure actuelle et requiert encore de nombreuses études. La présence de phages est avérée dans l'environnement, notamment dans les eaux usées ou les fèces, et le risque de transduction naturelle d'une particule phagique à une bactérie de *E. coli* initialement non pathogène ne peut être écarté (Imamovic et al., 2010). Des études plus poussées sont nécessaires afin d'évaluer et de gérer ce risque.

Des produits vétérinaires à base de bactériophages ont été développés et commercialisés aux Etats Unis pour lutter contre les infections à *Salmonella* et *Clostridium*. L'emploi de phages est aussi autorisé aux USA pour contrôler des pathogènes comme *Listeria* ou *E. coli* dans les aliments. La thérapie par les phages n'a pas sa place aujourd'hui dans les législations française et européenne qui régissent les médicaments que ce soit dans le cadre de l'alimentation animale ou humaine. En 2009, l'avis de l'EFSA a confirmé l'intérêt de ces thérapies mais recommande des recherches plus poussées dans le domaine (EFSA, 2009).

d) Vaccination des troupeaux

L'utilisation de la vaccination pour prévenir la colonisation des pathogènes a été particulièrement étudiée contre le sérotype O157:H7. Différentes sortes de vaccins existent, certains ciblent des protéines liées à la captation et l'utilisation du fer par les STEC. Ces vaccins semblent efficaces et n'affectent pas les performances de l'animal (Thomson et al., 2009). La dose ainsi que la fréquence d'administration ont un effet important sur l'efficacité des vaccins (Moxley et al., 2009; Smith et al., 2009; Wileman et al., 2011).

Certains vaccins utilisent des anticorps dirigés contre des facteurs de colonisation des STEC comme le fragment C-terminal de l'intimine ou la protéine Esp. Ces vaccins permettent une diminution de l'excrétion fécale des *E. coli* O157:H7 (Khare et al., 2010; Vilte et al., 2011). Des anticorps dirigés contre le LPS O157 ont été aussi testés avec succès sur des bovins (Peterson, Klopfenstein et al., 2007). Cependant le fonctionnement de tels vaccins dépend de la conservation des motifs du LPS et une éventuelle mutation de cette structure chez certaines souches pourrait entraîner une réduction de l'efficacité vaccinale. Enfin, l'utilisation de shigatoxines atténuées semble efficace contre la colonisation intestinale d'*E. coli* O157:H7 chez des souris (Zhang et al., 2011). Une revue portant sur les différents types de vaccins a en général confirmé leur efficacité bien qu'une forte hétérogénéité parmi les résultats ait été observée (Snedeker et al., 2011).

Lorsque la majorité des animaux d'un troupeau reçoit un vaccin contre *Escherichia coli* O157:H7 cela crée un effet protecteur vis à vis des autres animaux non immunisés mais vivants dans le même enclos. Ce phénomène est appelé « herd immunity » (Peterson et al., 2007). Les efforts de recherche de vaccins se sont portés essentiellement sur des souches de *E. coli* O157 ou O157:H7 du fait de leur fréquence d'isolement chez les bovins, et les autres sérogroupes de STEC n'ont pas été investigués.

Deux vaccins ont été développés dans le commerce. L'un, produit par [Epitopix](#), a obtenu l'approbation préliminaire du ministère américain de l'agriculture (USDA) en mars 2009, ce qui

signifie qu'il peut être vendu alors que la recherche se poursuit dans ce domaine. Un second vaccin a été développé par la société canadienne [Bioniche Life Sciences](#). Il a été approuvé au Canada en 2008.

Points clés

- Les STEC sont caractérisés par la présence de gènes *stx* ainsi que d'autres facteurs de virulence.
- Certaines souches de STEC sont responsables de diarrhées sanglantes pouvant évoluer en Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU). Ces bactéries sont à l'origine d'épidémies parfois de grande ampleur.
- Les ruminants sont le principal réservoir des STEC et l'environnement de la ferme favorise leur multiplication et dissémination au sein des élevages. La survie des STEC peut notamment être très longue dans le sol, l'eau, les fèces.
- Les principaux modes de contamination de l'homme sont la transmission alimentaire, hydrique, interhumaine, ou par contact avec un animal porteur ou son environnement.
- Afin de limiter leur présence au sein des élevages des actions globales (Bonnes Pratiques d'Élevage) ainsi que des actions ciblées peuvent être envisagées.
- Parmi celles-ci, le changement de régime alimentaire a été très étudié mais engendre des résultats contradictoires. Une modification des aliments pour animaux (probiotiques, ajout de différentes molécules...), l'utilisation de phages ou encore la vaccination des troupeaux semblent être des méthodes prometteuses bien que nécessitant encore des améliorations.

Chapitre 2. Les bactéries lactiques

Le but de ce chapitre est de rassembler les principales informations disponibles actuellement sur le groupe très vaste que constituent les bactéries lactiques, notamment au niveau de leur taxonomie et de leur métabolisme. Ce chapitre présente également les diverses utilisations actuelles des bactéries lactiques.

1. Principales caractéristiques physiologiques

Les bactéries lactiques sont définies comme étant des « bactéries à Gram positif, non mobiles, ne produisant pas de spore, se présentant sous forme de coques ou de bacilles et capables de fermenter les sucres en acide lactique » (Stiles & Holzapfel, 1997). Elles sont généralement anaérobies ou encore aérotoles, ne possèdent ni catalase (certaines souches possèdent une pseudo-catalase), ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase. Les bactéries lactiques sont généralement mésophiles mais certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes. Elles se développent majoritairement à pH 4,0-4,5 et certaines sont encore actives à des valeurs de pH extrêmes comme 9,6 ou 3,2. Elles ont des tolérances très variables vis-à-vis du NaCl et possèdent de faibles activités protéolytiques et lipolytiques (Caplice & Fitzgerald, 1999). Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio et al., 1994). Les bactéries lactiques sont ubiquistes et sont donc retrouvées dans de très nombreuses niches écologiques telles que les végétaux, le tractus digestif humain ou animal, les aliments fermentés ou non...

1.1. Taxonomie, classification et phylogénie

L'histoire de la bactériologie systématique peut être divisée en 4 phases (Buckley & Roberts, 2007):

- « Premières descriptions » entre 1872 et 1900. La description d'une espèce était essentiellement liée à la microbiologie médicale. La plupart des bactéries pathogènes connues de nos jours ont été décrites pendant cette période. Le schéma utilisé pour l'identification et la classification se basait sur le pouvoir pathogène, les réactions chimiques, les besoins pour la croissance ainsi que la morphologie. Ces critères sont

toujours utilisés actuellement. Cependant, ce schéma a été dénoncé comme étant « hasardeux et non scientifique ».

- Entre 1900 et 1960 : A cette époque, la physiologie et l'écologie bactérienne ont commencé à être explorées et décrites. Les bactéries étaient donc classées tout d'abord en fonction de leur morphologie puis les données de physiologie étaient utilisées pour discriminer les microorganismes les plus proches. Ce mode de classification a été utilisé jusqu'à la fin des années 50 et a notamment servi de base au « *Bergey's manual of determinative bacteriology* » (Buchanan & Gibbons, 1975), texte toujours considéré comme la principale référence en taxonomie bactérienne.

Lee et *al.* (1956) ont montré que le contenu en bases puriques et pyrimidiques était constant chez une espèce bactérienne donnée. Une différence de plus de 5% du G+C% entre deux bactéries indique leur appartenance à différentes espèces.

- De 1960 à 1980 : De nombreuses techniques se développent telles que l'hybridation ADN/ADN. La combinaison de méthodes moléculaires, chemotaxonomiques, physiologiques a permis d'approcher la taxonomie bactérienne sous un autre angle.

Les méthodes d'hybridation ADN/ADN sont basées sur le fait que deux molécules d'ADN dénaturées peuvent se réassocier à condition de présenter une homologie. On estime que 2 souches appartiennent à la même espèce lorsque le pourcentage d'hybridation est > 70%. Entre 0% et 65%, les souches n'appartiennent pas à la même espèce mais peuvent appartenir au même genre.

- Depuis 1980: D'autres techniques telles que le séquençage de l'ARN16S, de gènes codant des protéines, de protéines ribosomales ou d'études plus poussées du génome entier ou de motifs spécifiques du génome, ont été incorporées à la description d'une espèce.

L'ARNr 16S, appartenant à la sous unité 30S du ribosome, est présent chez toutes les bactéries. Il comporte des séquences conservées communes à des unités de taxons élevés et des séquences variables spécifiques d'espèces. Il est admis qu'en dessous de 97% d'identité, deux bactéries n'appartiennent pas à la même espèce. Si le pourcentage d'homologie est supérieur à 97%, le placement de 2 souches au sein d'une même espèce repose sur les résultats de l'hybridation ADN/ADN. Le séquençage reste cependant une méthode assez coûteuse, pas forcément adaptée à l'identification de routine de microorganismes.

L'identification des espèces peut aussi se faire par la caractérisation de la région intergénique 16S-23S de l'ADNr. La grande sous-unité 50S du ribosome est constituée

des ARNr 23S et 5S. Les gènes ribosomiques sont très conservés et sont séparés par des régions intergéniques. Il existe un polymorphisme de longueur et de séquence au sein de ces régions d'une espèce à l'autre. La PCR permet d'étudier et de mettre en évidence le polymorphisme de cette région intergénique 16S-23S. Des profils spécifiques peuvent ainsi être obtenus pour la plupart des bactéries lactiques : une seule bande pour les genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, deux bandes pour *Lactobacillus* et *Enterococcus*, trois bandes pour *Carnobacterium* et *Weissella* (Ben Belgacem et al., 2009; Kabadjova et al., 2002).

Des techniques de typage ont été mises au point dans le cadre d'études épidémiologiques mais peuvent être également utilisées pour comparer et identifier différentes bactéries. Ces techniques comprennent notamment le séquençage de gènes de ménage (MLST), l'analyse du polymorphisme de longueur de fragment de restriction de l'ADN (RFLP) appliquée à la région intergénique 16S-23S, l'analyse des profils de restriction des d'ARNr 16S (ADRA), ou encore le pulsotypage de l'ADN génomique (PFGE). La technique d'hybridation ADN/ADN avec le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S restent cependant les méthodes de référence pour l'identification des bactéries (Busse et al., 1996).

Les bactéries lactiques constituent un groupe de bactéries partageant certaines caractéristiques morphologiques, métaboliques, et physiologiques (Tableau 5). Cependant les méthodes phénotypiques ne sont pas suffisantes pour permettre leur identification et leur classification.

Tableau 5 : Principales caractéristiques biologiques et métaboliques des bactéries lactiques
d'après Axelsson (1998)

	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i>
Morphologie	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Tétrades	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Croissance à 10 °C	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	-	-	+
Croissance à 45 °C	-	+/-	-	+	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-
Croissance à pH 4,4	Nd	+/-	-	+	+/-	+/-	+/-	+	-	-	-	+/-
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à 6,6% NaCl	Nd	+/-	+	+	-	-	+/-	+	-	-	+	+/-
Croissance à 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Production de CO ₂	-	+/-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Production d'acide lactique	L	D, L, DL	L	L	L	L	D	L, DL	L	L	L	+/-

B : bacilles, C : coques ; nd : non déterminé ; +/- : variables selon les espèces

Les bactéries lactiques appartiennent au phylum des Firmicutes, à la classe des *Bacilli*, et à l'ordre des *Lactobacillales* (Garrity & Holt, 2001). Phylogénétiquement, elles sont rattachées à la classe des Clostridies, caractérisées par moins de 50 mol% de contenu G+C dans leur ADN.

L'histoire de la taxonomie des bactéries lactiques a commencé à la fin du 19^{ème} siècle avec la description des genres *Leuconostoc* (VanTieghem, 1878), *Streptococcus* (Rosenbach, 1884) *Lactobacillus* (Beijerinck, 1901) et *Pediococcus* (Claussen, 1903). Les coliformes ont été exclus du groupes des bactéries lactiques (Beijerinck, 1901), et Sherman (1937) a établi un schéma de classification des Streptocoques en définissant de nouvelles espèces. La classification la plus utilisée aujourd'hui a été établie par Holzapfel et al. (2001). D'après ces auteurs, les bactéries lactiques englobent les genres suivants: *Alloiococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*.

Traditionnellement le genre *Bifidobacterium* a été associé aux bactéries lactiques. Par la suite, il a été séparé en raison du contenu G+C > 50 mol% et affecté au phylum des *Actinobacteria*. Néanmoins, les bifidobactéries sont également considérées comme des bactéries lactiques, en

raison de leurs propriétés physiologiques et biochimiques semblables et du fait qu'elles partagent certaines niches écologiques communes aux bactéries lactiques tel que le tractus gastro-intestinal (Klein et *al.*, 1998).

Les relations phylogénétiques de ces principales bactéries lactiques, basées sur la comparaison des séquences d'ARNr 16S, montrent que *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Lactosphaera* sont étroitement apparentés les uns aux autres. *Lactococcus* et *Streptococcus* apparaissent comme relativement apparentés, alors que *Lactobacillus* est phylogénétiquement distinct (Figure 8).

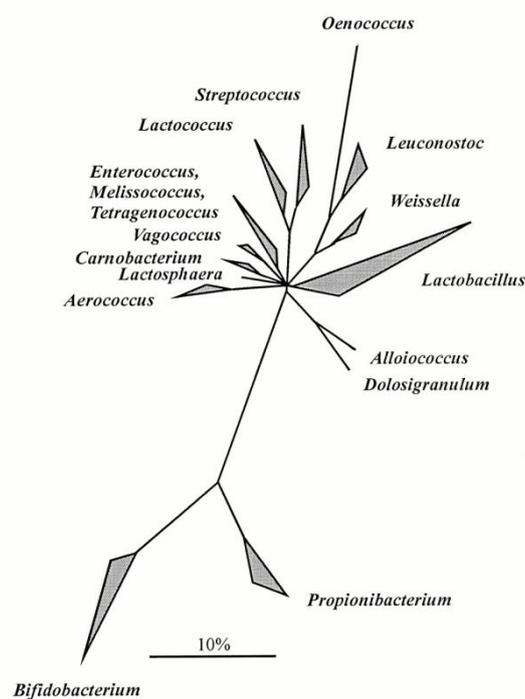


Figure 8 : Arbre consensus, basé sur la comparaison de séquence d'ARNr 16S, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques ayant un faible contenu mol% de G+C dans l'ADN ainsi que les bactéries Gram positives non reliées des genres *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* (Holzapfel et *al.*, 2001).

Une étude plus précise des clades *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Streptococcus* par la comparaison des alignements concaténés de protéines ribosomales (Figure 9) montre que la branche streptococci-lactococci est à la base de l'arbre des *Lactobacillales*. Malgré sa morphologie (coques), l'espèce *Pediococcus pentosaceus* est à classer parmi les lactobacilles. Par ailleurs, ce groupe *Pediococcus* est proche du groupe *Leuconostoc* dans le clade des *Lactobacillus*.

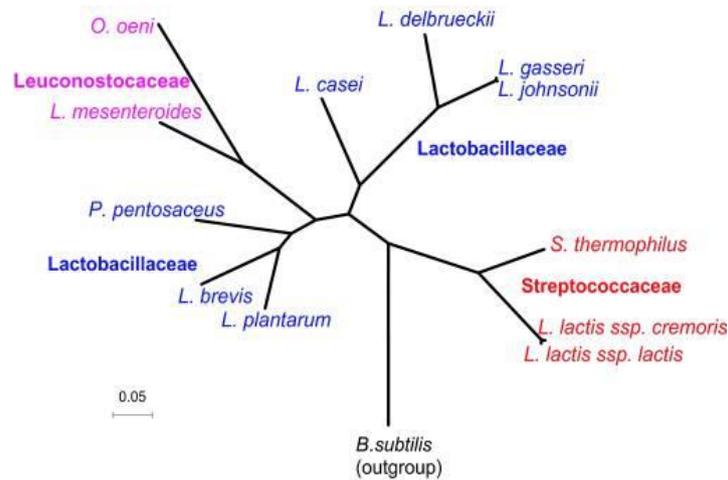


Figure 9 : Arbre phylogénétique des *Lactobacillales* construit sur la base des alignements concaténés de protéines ribosomales. Toutes les branches ont des valeurs de bootstrap >75%. Les couleurs sont attribuées aux espèces selon la taxonomie actuelle : *Lactobacillaceae*, bleu; *Leuconostocaceae*, violet; *Streptococcaceae*, rouge (Makarova et al., 2006).

L'exemple de la classification de *Pediococcus* illustre bien le fait que la définition des taxons sur des bases phénotypiques (morphologie, type fermentaire...) ne correspond pas toujours à des relations phylogénétiques. La classification des espèces doit donc être considérée avec prudence, en fonction des critères utilisés. Il est à signaler que le nombre d'espèces lactiques décrites ne cesse d'augmenter. Récemment, deux nouvelles espèces *Lactobacillus nasuensis* sp. nov. et *Lactococcus fujiensis* sp. nov. ont été isolées respectivement d'ensilage de sorgho et de feuilles de chou chinois et caractérisées phénotypiquement et taxonomiquement (Cai et al., 2011; Cai, Yang, et al., 2011).

Les bactéries lactiques représentent ainsi un groupe taxonomique, physiologique et phylogénique très divers. L'identification d'une bactérie à un genre ou une espèce donnée reste un travail délicat et pouvant faire l'objet de modifications ultérieures.

1.2 Brève présentation des principaux genres utilisés dans ce travail

Les différents genres ayant servi au présent travail sont décrits très brièvement ci-après d'après l'état actuel de nos connaissances.

a) *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* comprend actuellement 41 espèces. Il est possible de distinguer plusieurs groupes plus ou moins phylogénétiquement liés (Plot, 2008). Le groupe « faecalis » regroupant les espèces isolées des matières fécales humaines. Les groupes « cecorum » et « gallinarum » concernant les espèces isolées des glandes uropygiennes des oiseaux. Les groupes « dispar », « avium », et « faecium » d'origines diverses.

L'innocuité des Entérocoques reste discutée car ces bactéries sont retrouvées dans 0,28 % des cas d'infections nosocomiales (Thiolet et *al.*, 2007) et l'utilisation d'entérocoques en tant que probiotiques en nutrition humaine reste controversée du fait de la présence de gènes de résistance aux antibiotiques chez certaines souches (Adams, 1999).

b) *Lactobacillus* (dont *Pediococcus*)

Le genre *Lactobacillus* a été défini pour la première fois par Beijerinck (1901). Il compte actuellement 175 espèces et 27 sous-espèces (Euzéby, 2011). Les lactobacilles sont souvent associés au tractus gastro-intestinal des mammifères ainsi qu'aux végétaux. Beaucoup d'espèces sont utilisées en tant que probiotiques pour la santé animale ou humaine. En 1970, le genre *Lactobacillus* a été divisé en 3 groupes en fonction du type fermentaire des bactéries : homofermentaire, hétérofermentaire facultatif ou hétérofermentaire obligatoire (Rogosa, 1970). Bien que non reliés à une réalité phylogénétique, ces 3 groupes fermentaires sont toujours utilisés aujourd'hui.

c) *Lactococcus*

La première espèce de *Lactococcus* décrite fut *Bacterium lactis* par Lister (1873). Elle fut ensuite renommée *Lactococcus lactis* par Schleifer et *al.* (1985). Le genre *Lactococcus* comprend 7 espèces et 4 sous espèces (Euzéby, 2011). Les lactocoques sont des bactéries lactiques généralement isolées des produits végétaux ou laitiers.

d) *Leuconostoc*

Le genre *Leuconostoc* comprend actuellement 22 espèces et 3 sous espèces (Euzéby, 2011). La première espèce décrite était *Leuconostoc mesenteroides* par Tsenkovskii (1878). Cette espèce a été subdivisée en 3 groupes par Garvie (1894) : *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*. *Leuconostoc mesenteroides* est la bactérie épiphyte la plus abondante à la surface

des fruits et des végétaux, et est également retrouvée dans divers produits laitiers. *Leuconostoc* produit notamment du diacétyle à partir du citrate (Drider & Prévost, 2009).

e) *Propionibacterium*

Le genre *Propionibacterium* ne peut pas, à proprement parler, être regroupé dans les bactéries lactiques *sensu stricto*. En effet, ces bactéries appartiennent à la classe des *Actinobacteria* et non des *Bacilli* comme les autres bactéries lactiques. *Propionibacterium* appartient à la famille des *Propionibacteriaceae* et le genre comprend actuellement 14 espèces et 2 sous espèces (Euzéby, 2011). Dans ce travail, les bactéries *Propionibacterium* ont été considérées comme des bactéries lactiques dans la mesure où elles sont capables de produire de l'acide lactique par métabolisme hétérofermentaire à partir du glucose. Elles produisent également de l'acide propionique et de l'acide acétique. Les bactéries du genre *Propionibacterium* sont essentiellement isolées de végétaux, produits laitiers ou encore du corps humain. La plupart des souches sont non pathogènes mais certaines souches de *Propionibacterium acnes* le sont.

f) *Vagococcus*

Le genre *Vagococcus* est constitué de coques à Gram positif, catalase négative, possédant l'antigène du groupe N de Lancefield et présentant une ciliature péritriche. Ces bactéries ont d'abord été désignées sous les noms de "streptocoques lactiques mobiles" ou de "streptocoques mobiles du groupe N" ou de "lactocoques mobiles" ou de "souches apparentées à *Lactococcus lactis*" (Schleifer et al. 1985). L'étude de la séquence de l'ARNr 16S a permis à (Collins et al., 1989) de placer ces coques mobiles dans un nouveau genre, le genre *Vagococcus*, phylogénétiquement proche du genre *Enterococcus*. Initialement, le genre *Vagococcus* comprenait une seule espèce, *Vagococcus fluvialis*. Actuellement, 8 espèces sont incluses dans ce genre sur la base d'études phylogénétiques et/ou des hybridations ADN-ADN (Euzéby, 2011).

1.3. Génomes

Les bactéries lactiques présentent des génomes de taille modeste, comprises entre 1,8 Mb pour *Oenococcus oeni* et 3,3 Mb pour *Lactobacillus plantarum*. Beaucoup de génomes de bactéries lactiques ont des capacités de biosynthèse réduites dues à des événements de dégradation du génome reflétant leur adaptation à un milieu riche, comme le lait ou le tractus intestinal (Pfeiler & Klaenhammer, 2007). Les génomes de bactéries lactiques présentent aussi de nombreux

pseudogènes. En effet, chez *Streptococcus thermophilus* CNRZ006 ou encore *Lactobacillus bulgaricus* ATCC11842, 10% à 12% de gènes sont non fonctionnels du fait de décalage dans le cadre de lecture, de mutations non sens ou encore de délétions (Siezen et al., 2005). Ces pseudogènes résultent de l'inactivation de gènes codant pour des fonctions devenues inutiles et devraient être à terme délétés pour maintenir une forte densité de gènes fonctionnels. Chez les bactéries, la taille du génome est directement liée à la complexité métabolique des génomes puisqu'une grande majorité des séquences est codante. Le pourcentage du génome des bactéries lactiques occupé par les gènes est compris entre 73% et 90% (Leblond-Bourget & Guédon, 2009).

Les génomes des bactéries lactiques, portent des éléments capables d'être transférés d'une bactérie à une autre en se maintenant ensuite dans le génome de sa descendance. Beaucoup de ces éléments portent des gènes avantageux ou indispensables à la survie de la cellule dans certaines conditions. La nature des éléments et des gènes portés par ceux-ci peut considérablement varier entre les souches d'une même espèce. Ces éléments non essentiels comprennent notamment des plasmides (Mills et al., 2006), des éléments intégratifs tels que les prophages ou des éléments transposables comme les séquences d'insertions (IS) ou transposons (Tn) (Bourgoin et al., 1999; Antonsson et al., 2003).

2. Métabolisme

Le terme « bactéries lactiques » regroupe des microorganismes appartenant à différents genres ayant la capacité de fermenter les sucres en acide lactique. De ce fait, le groupe des bactéries lactiques est très vaste. Les sucres peuvent être des monosaccharides tels que les hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), des hexitols ou des pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des dissaccharides (lactose, saccharose, cellobiose, maltose, tréhalose). La capacité à métaboliser les sucres est fonction des souches considérées. Certaines facultés sont liées à des plasmides, telles que la fermentescibilité du lactose chez *Lactococcus lactis*, d'autres sont au contraire associées à des fonctions chromosomiques (Loubiere & Cocaign-Bousquet, 2009).

Il existe une hiérarchie au niveau de l'utilisation des sucres dans la cellule lorsque plusieurs sucres sont disponibles simultanément. La répression catabolique est un mécanisme de régulation qui permet à la bactérie d'orienter préférentiellement son métabolisme envers tel ou tel sucre afin de limiter au maximum les dépenses d'énergie nécessaires au fonctionnement des autres voies métaboliques. Le glucose étant l'un des composés carbonés les plus efficaces pour la répression catabolique, ce phénomène est appelé « effet glucose » (Mahr et al., 2000). Les

mécanismes de répression catabolique peuvent se porter sur des enzymes de transport elles-mêmes ou sur des enzymes clés du sucre compétiteur généralement situées dans les premières étapes du métabolisme et permettent ainsi une adaptation rapide à l'environnement.

2.1 Les voies fermentaires

Suivant les genres ou les espèces, les bactéries lactiques utilisent l'une des 3 voies suivantes du métabolisme des sucres : la voie homofermentaire (bleu-vert), la voie hétérofermentaire (jaune-vert) ou la voie bifide (Figure 10) (Thompson & Gentry-Weeks, 1994).

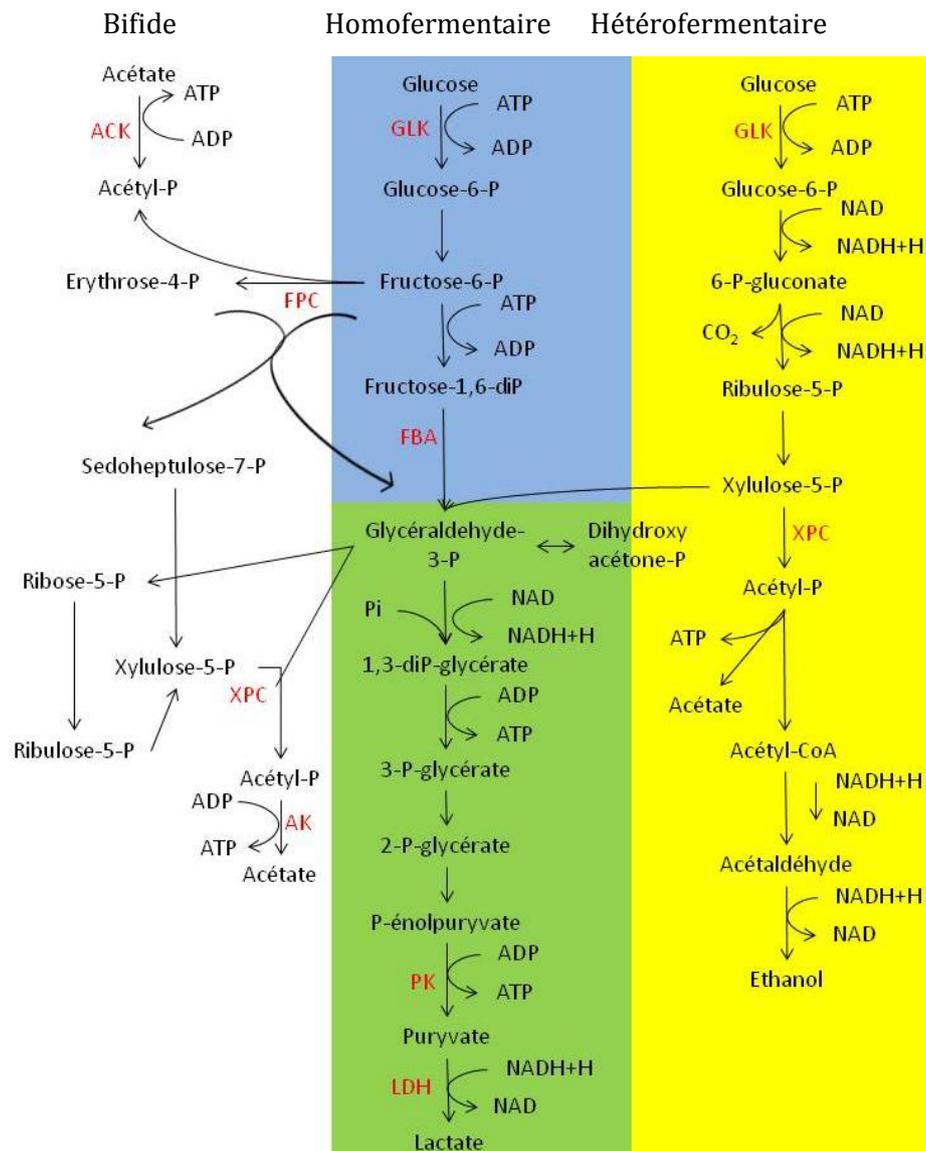


Figure 10 : Voies homofermentaire, hétérofermentaire ou bifide de la dégradation du glucose.

Les principales enzymes sont indiquées en rouge. GLK : glucokinase, FBA : FBP aldoolase, FPC : fructose-6-phosphate phosphocétolase, XPC : xylulose-5-phosphate phosphocétolase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate déshydrogénase, ACK : acétate kinase.

La voie homofermentaire emprunte la glycolyse dans sa totalité (du glc-6-P jusqu'au pyruvate) et est généralement associée aux bactéries des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, et *Lactobacillus*. La glycolyse conduit, en conditions optimales de croissance, à la production de 2 molécules de lactate et 2 molécules d'ATP par molécule de glucose. Ce métabolisme est qualifié d'homolactique lorsqu'au moins 90% du glucose consommé est converti en lactate. En conditions de croissance non optimales (limitation de carbone ou certains sucres), le métabolisme des bactéries homofermentaires peut se diversifier vers un métabolisme appelé mixte, avec production, en plus du lactate, de formiate, de CO₂, d'acétate et d'éthanol (Cocaign-

Bousquet *et al.*, 1996) (Figure 11). Cette fermentation est essentiellement réalisée par les entérobactéries (*Enterococcus* sp.).

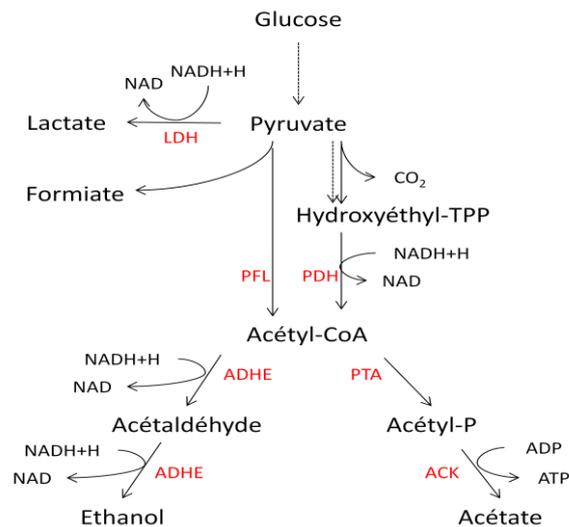


Figure 11 : Schéma de fermentation des acides mixtes (d'après Coccagn-Bousquet *et al.*, 1996). Les principales enzymes sont indiquées en rouge. LDH : lactate déshydrogénase, PFL : pyruvate formiate lyase, PDH : pyruvate déshydrogénase, PTA : phosphotransacétylase, ACK ; acétate kinase, ADHE : alcool déshydrogénase.

Certaines bactéries des genres *Leuconostoc* et *Lactobacillus* empruntent une voie hétérofermentaire qui conduit à la production d'une molécule de lactate, d'éthanol, de CO₂ et d'ATP par mole de glucose (Driehuis & Oude Elferink, 2000). Enfin, le métabolisme des bactéries du genre *Bifidobacterium* suit une voie particulière appelée voie fermentaire bifide ou voie du fructose-6-phosphate phosphocétolase (FPC). Le bilan net de la voie bifide est d'une mole de lactate, 1,5 moles d'acétate et 2,5 moles d'ATP par mole d'hexose, ce qui est légèrement supérieur au rendement de la glycolyse en terme énergétique. L'ensemble des données métaboliques et génomiques connues pour les bifidobactéries a été recensé par Klijn *et al.* (2005). La fermentation alcoolique " stricte " est rare chez les bactéries mais plus courante et plus étudiée chez d'autres microorganismes comme les levures (*Saccharomyces* notamment) dont les applications industrielles sont économiquement très importantes : vin, bière, pain, etc.

Toutes les voies métaboliques précédemment citées aboutissent au pyruvate, intermédiaire clé du métabolisme des bactéries lactiques. Chez les lactocoques et les lactobacilles homofermentaires, le pyruvate est converti majoritairement en lactate via la LDH (lactate déshydrogénase). Selon les espèces et les souches, du D-lactate, du L-lactate ou un mélange D/L est produit. En effet, le lactate est un élément chiral c'est-à-dire qu'il possède 2 isomères, le L(+)

lactate et le D(-) lactate. L'état physiologique des bactéries ainsi que les conditions environnementales (pH...) peuvent influencer le ratio L/D (Garvie, 1969).

Chez les bactéries hétérofermentaires et selon les conditions environnementales, le pyruvate peut aussi former d'autres composés, comme l'acétate, l'éthanol ou encore des composés responsables des arômes des produits laitiers (diacétyl, acétoïne, 2,3-butanediol, α -acétolactate) (Loubiere & Cocaign-Bousquet, 2009).

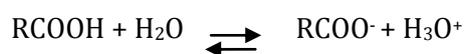
Les bactéries lactiques sont exigeantes d'un point de vue nutritionnel. Elles sont notamment incapables de synthétiser un certain nombre d'acides aminés, source d'énergie, pour lesquels elles sont donc auxotrophes. Ces besoins en acides aminés sont cependant très variables d'une espèce à une autre et même d'une souche à une autre. D'une manière générale *Streptococcus thermophilus* est l'espèce la moins exigeante (6 acides aminés au maximum dont la leucine, la valine et la cystéine) (Letort & Juillard, 2001) alors que les lactobacilles sont auxotrophes pour un très grand nombre d'acides aminés (Foucaud et al., 2001). Le catabolisme des acides aminés peut aboutir à la formation de molécules aromatiques. Les souches possédant l'enzyme glutamate déshydrogénase sont capables de cataboliser les acides aminés *in vitro* (Tanous et al., 2006) pour donner des hydroxyacides, des aldéhydes, des acides ou des alcools (Yvon, 2006).

2.2 Production de substances à activité antimicrobienne

Les bactéries lactiques sont connues pour leur pouvoir antimicrobien envers de nombreuses autres bactéries, lié à leur capacité à produire différents acides et métabolites tels que les acides lactique et acétique, le peroxyde d'hydrogène, des peptides antimicrobiens, du diacétyl et du dioxyde de carbone ainsi que des exopolysaccharides (Fuller & Gibson, 1997).

a) Les acides organiques

Les propriétés acidifiantes des bactéries lactiques sont un phénomène déterminant dans l'inhibition des flores annexes (Schillinger & Lucke, 1990). Les acides organiques comme l'acide lactique, acétique, propionique, butyrique... sont des acides faibles dont seule une partie est dissociée dans l'eau selon l'équation 1 :



Équation 1 : Equation bilan des acides organiques dans l'eau.

Le pKa est la valeur de pH à laquelle la moitié de l'acide se trouve sous forme dissociée. La fraction acide non dissociée est lipophile. Elle diffuse passivement à travers la membrane de la bactérie cible, causant une acidification du cytoplasme cellulaire (Kashket, 1987). Ce qui a pour effet de détruire le gradient électrochimique de proton et d'altérer la perméabilité de la membrane, engendrant ainsi une perturbation des systèmes de transport de substrats (Alakomi et al., 2000). L'action des acides organiques sur les bactéries cibles peut à terme, induire la mort cellulaire (Hirshfield et al., 2003; Roe et al., 2002).

L'acide lactique est le métabolite majeur produit par les bactéries lactiques. Au cours de la fermentation, ses formes dissociée et non dissociée sont en équilibre et l'amplitude de la dissociation dépend du pH. A bas pH, l'acide lactique présent majoritairement dans sa forme non dissociée est toxique pour de nombreuses bactéries, levures et moisissures. L'acide lactique est le plus efficace pour limiter la croissance *in vitro* des bactéries pathogènes comme *E. coli* (Buchanan & Edelson, 1999). En outre, les stéréo-isomères d'acide lactique diffèrent aussi dans leur activité antimicrobienne : l'acide L(+) lactique est plus inhibiteur que l'isomère D(-) (Benthin & Villadsen, 1995).

L'acide acétique peut de même interagir avec les membranes cellulaires et causer une acidification intracellulaire et une dénaturation protéique (Huang et al., 1986). Son activité antimicrobienne est plus efficace que celle de l'acide lactique étant donné sa plus grande valeur de pKa (acide lactique 3.9 et acide acétique 4.75) et donc sa plus grande quantité sous forme non dissociée par rapport à l'acide lactique à un pH donné (Earnshaw, 1992). L'acide acétique agit de manière synergique avec l'acide lactique. Il a été montré que *E. coli* ne réagissait pas de la même manière en présence d'acide acétique ou d'acide lactique. Cela s'explique probablement par le fait que l'acide lactique acidifie le cytoplasme *via* l'accumulation de protons alors que l'acide acétique induit en plus une accumulation d'anions, augmentant ainsi le stress de la cellule cible (King et al., 2010).

Makras & De Vuyst (2006) ont montré que le phénomène d'inhibition de croissance observé chez différentes souches de *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Listeria* et *Salmonella* était principalement dû à l'action des acides organiques produits par les deux genres de bactéries lactiques testées : *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, bien que ces bactéries soient aussi capables de produire d'autres substances antimicrobiennes.

b) Les bactériocines

Les **bactériocines** sont des produits de la synthèse ribosomique bactérienne libérés dans le milieu extracellulaire sous forme native, ou modifiée. Elles possèdent une activité bactéricide à large spectre (Jack et *al.*, 1995). Cette définition exclut la substance à activité antimicrobienne produite par *Lactobacillus reuteri*, la reutéline (3-hydroxypropionaldéhyde), de la famille des bactériocines car cette molécule est non protéique et elle est capable d'inhiber également les virus, les champignons, et les protozoaires (Caplice & Fitzgerald, 1999). La capacité à produire des substances antimicrobiennes de type bactériocine est un phénomène commun à de nombreuses bactéries lactiques.

Un grand nombre de bactériocines ont été caractérisées chez les bactéries lactiques ; elles sont classées dans trois groupes distincts suivant leurs différences structurales (Cleveland et *al.*, 2001). La classe I (lantibiotique) comprend des petits peptides modifiés de façon post-transcriptionnelle qui sont caractérisés par la présence d'acides aminés thioesters modifiés et d'acides aminés insaturés. La nisine fait partie des lantibiotiques. La classe II est composée de peptides de poids moléculaire inférieur à 10kDa, non modifiés et thermostables. Cette classe comprend une grande variété de structures ce qui a nécessité la création de sous classe IIa, IIb et IIc (Klaenhammer, 1993). Une autre classification a été proposée par (van Belkum & Stiles, 2000) et divise la classe II en 6 sous classes de IIa à II f. La classe III comprend, quant à elle, des bactériocines thermolabiles de haut poids moléculaire (>30kDa).

Cotter et *al.* (2005) ont récemment proposé une nouvelle classification regroupant les bactériocines en deux grandes classes sur la base de leur structure mais aussi de leur mode d'action (Figure 12). La première classe correspond aux bactériocines dites lantibiotiques, comme la nisine, caractérisées par leur teneur en acides aminés non habituels (i.e. lanthionine). Les bactériocines de classe I possèdent un double mode d'action. Elles peuvent se lier au lipide II, principal transporteur des sous-unités peptidoglycanes du cytoplasme vers la membrane cellulaire, empêchant ainsi sa synthèse correcte et induisant la mort cellulaire. Elles peuvent utiliser le lipide II comme molécule de reconnaissance pour initier un processus d'insertion dans la membrane et de formation de pores induisant de même une mort cellulaire rapide. La deuxième classe comprend les bactériocines qui ne contiennent pas des acides aminés non habituels. Généralement les peptides de classe II ont une structure amphiphile en hélice leur permettant de s'insérer dans la membrane de la cellule cible, induisant une dépolarisation de la membrane puis la mort cellulaire. Les bactériocines appartenant communément à la classe III sont groupées dans cette nouvelle classification dans une catégorie séparée et sont nommées « bactériolysines ». Ces larges protéines bactériolytiques comme la lysostaphine ont un effet direct sur la membrane cellulaire des bactéries à Gram positif, induisant la mort et la lyse de la cellule.

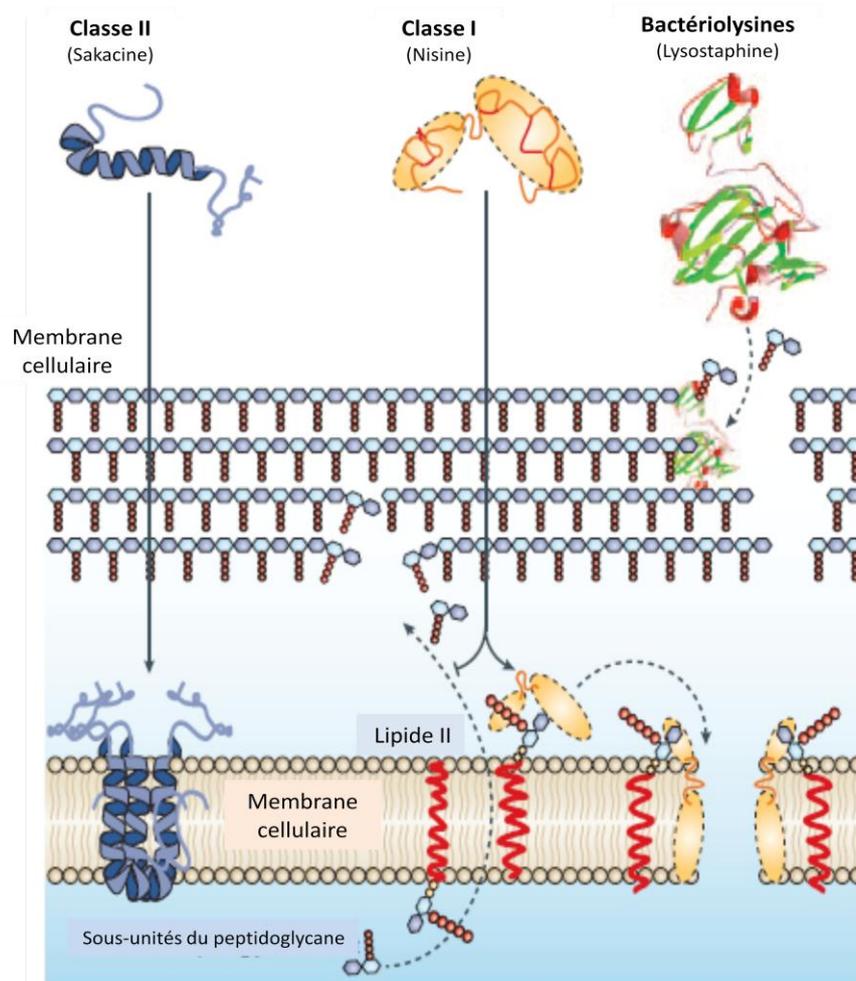


Figure 12 : Mode d'action des bactériocines produites par les bactéries lactiques (Cotter et al., 2005).

L'intérêt des bactériocines pour la bio-préservation alimentaire réside dans de nombreuses propriétés. Les bactériocines sont des substances généralement reconnues comme non dangereuses, car non toxiques pour les cellules eucaryotes. Elles sont inactivées par les protéases digestives et de ce fait ont peu d'effet sur la flore intestinale humaine ou animale. Elles sont tolérantes aux variations de pH et de température. Elles possèdent un large spectre antimicrobien contre de nombreuses bactéries alimentaires pathogènes ou d'altération. Enfin, elles montrent un mode d'action bactéricide en agissant sur la membrane cytoplasmique, limitant ainsi l'apparition de résistance croisée avec les antibiotiques (Galvez et al., 2007).

Les bactériocines peuvent être utilisées de différentes manières. Soit directement, purifiées ou semi-purifiées en tant qu'additif antimicrobien ou par l'intermédiaire de cultures « starter », comme produit de la fermentation bactérienne dans des aliments. La seule bactériocine dont l'utilisation est actuellement autorisée en tant qu'additif alimentaire est la nisine (E234). La nisine est produite par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et son intérêt s'explique par son large

spectre antimicrobien actif à la fois contre les bactéries Gram négatives et Gram positives. Elle fait partie de la liste positive des additifs alimentaires autorisés en Europe avec le numéro E234. Elle est aussi autorisée aux USA où elle possède le statut GRAS (Generally Recognized As Safe). La nisine peut se lier à différents composés tels que les phospholipides ou les acides gras volatils. Elle peut ainsi s'adsorber sur des surfaces solides pour ensuite détruire les cellules bactériennes qui viendront à son contact (Sobrino-Lopez & Martin-Belloso, 2008). L'emploi intensif de bactériocines en alimentation est freiné par l'apparition de phénomènes de résistance (Kuipers *et al.*, 2000). L'utilisation contrôlée de plusieurs bactériocines pourrait permettre d'en prolonger l'utilisation (Naghmouchi *et al.*, 2011).

c) Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est produit par les bactéries lactiques en présence d'oxygène comme résultat de l'action des flavoprotéines oxydases ou de la NADH peroxydase. L'effet antimicrobien du peroxyde d'hydrogène résulterait de l'oxydation des groupes sulfhydriques causant une dénaturation d'un certain nombre d'enzymes. Il limite ainsi la croissance de bactéries pathogènes (Yüksekdağ *et al.*, 2004). L' H_2O_2 résulterait aussi de la peroxydation des lipides membranaires chez la bactérie cible, augmentant ainsi la perméabilité de la membrane (Kong & Davison, 1981). L' H_2O_2 peut être aussi un précurseur de la production de radicaux libres bactéricides comme le superoxyde (O_2^-) et l'hydroxyle (OH^\cdot). Ces radicaux peuvent endommager l'ADN (Byczkowski & Gessner, 1988). La quantité d' H_2O_2 produite par les bactéries lactiques est variable et dépend de la souche ainsi que de la disponibilité en O_2 dans le milieu (Helander *et al.*, 1997).

d) Les autres substances antimicrobiennes

Le **diacétyle** est produit suite au métabolisme de l'acide citrique. Les bactéries à Gram-négatif sont plus sensibles au diacétyle que celles à Gram positif (Jay, 1982). Son spectre d'action est large et se situe à des concentrations de 300 à 1000ppm. Cependant, il produit un arôme « beurre » marqué dès 2 à 4 ppm. De ce fait, il est rarement utilisé en préservation alimentaire (Helander *et al.*, 1997).

Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du **dioxyde de carbone** (CO_2) comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Toutefois, le dioxyde de

carbone peut aussi, à faible concentration, stimuler la croissance de certaines bactéries indésirables (Lindgren & Dobrogosz, 1990).

Le terme **exopolysaccharides** (EPS) se réfère à tout polysaccharide produit par la cellule bactérienne et relâché dans le milieu. Les EPS ont un rôle de protection de la cellule contre des stress environnementaux tels que les variations de pH, de température, des événements de stress osmotiques et oxydatifs ou encore la limitation de nutriments dans le milieu (Kumar & Anand, 1998; Frank, 2001). Aslim et al. (2006) ont observé que la quantité d'EPS produite par des lactobacilles lors de la croissance en milieu MRS était comprise entre 21 et 211 mg/l alors que les streptocoques en produisent entre 16 et 114 mg/l en milieu M17. Il existe une forte corrélation entre la production d'EPS et l'acidorésistance ainsi que la tolérance aux acides biliaires (Yuksekdag & Aslim, 2010).

Les EPS peuvent aussi avoir des effets antimicrobiens envers de nombreuses bactéries. Kim et al. (2009) ont montré qu'un EPS produit par *Lactobacillus acidophilus* diminuait fortement la production de biofilm chez des bactéries Gram négatives comme *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* ou Gram positives telles que *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus*.

Les EPS des bactéries lactiques sont connus pour avoir des propriétés bénéfiques sur la santé humaine incluant l'abaissement du cholestérol, des propriétés anti-ulcère (dextrane-sulfane), anti-tumorale, immunomodulante ou anti-inflammatoire (Lapointe, 2009). De plus, les polysaccharides peuvent agir comme des fibres alimentaires pouvant favoriser la croissance et la survie des bactéries probiotiques dans le tractus gastro-intestinal (German et al., 1999).

3. Utilisation des bactéries lactiques.

3.1 Utilisation directe en tant que probiotiques

Les bactéries lactiques sont utilisées traditionnellement comme agent de bio-préservation ou comme probiotiques. Un probiotique est défini comme « un microorganisme vivant qui, administré en quantités adéquates confère un bénéfice santé pour l'hôte » (World Health Organization, 2001).

Pour être considérée comme probiotique, une souche bactérienne doit posséder plusieurs caractéristiques. Elle doit notamment être capable de survivre à des pH très faibles ainsi qu'à l'effet « détergent » des acides biliaires car le pH de l'estomac est compris entre 1,5 et 3 et la concentration de bile dans l'intestin peut atteindre jusqu'à 5 g/l (Chou & Weimer, 1999). Les

propriétés d'adhésion à la muqueuse intestinale sont essentielles à la souche probiotique afin de coloniser la muqueuse intestinale. Le phénomène d'auto-aggrégation observé chez ces souches crée une véritable barrière physique à la colonisation de l'intestin par d'autres microorganismes pathogènes (Guarner & Schaafsma, 1998).

Cependant une question se pose face à l'utilisation de plus en plus intensive de bactéries probiotiques : Quelles sont les possibilités de transfert de gènes entre des bactéries lactiques et le reste du microbiote intestinal ? Le risque concerne d'une part, l'acquisition de gènes d'antibiorésistance et de gènes de virulence par ces organismes initialement non pathogènes ; et d'autre part, l'acquisition des caractéristiques propres aux probiotiques par des microorganismes déjà pathogènes (résistance aux sels biliaires, à l'acidité...). En effet, l'existence de transferts horizontaux de gènes entre bactéries lactiques a été démontrée (Bolotin et al., 2004). Cette question a été soulevée par van Reenen & Dicks (2011) qui ont conclu que ces risques étaient plutôt limités au vu de la fréquence de réussite des transferts horizontaux inter et intra genres.

a) Probiotiques destinés à l'homme.

Le tractus digestif humain est un environnement très complexe pouvant être colonisé par de très nombreuses bactéries. Plus précisément, l'estomac et le duodénum contiennent entre 10^2 et 10^3 UFC/ml. Il s'agit essentiellement de lactobacilles, streptocoques et levures. Le jejunum et l'iléum (10^3 - 10^8 UFC/ml) contiennent surtout des lactobacilles, entérobactéries, streptocoques, *Bacteroides* spp., bifidobactéries et des fusobactéries. Enfin, le colon (10^{10} - 10^{12} UFC/g) contient en plus des bactéries précédemment citées des clostridies, *Veillonella* spp., *Proteus* spp., staphylocoques, *Pseudomonas* spp. et des protozoaires (Holzapfel et al., 1998).

Les bactéries probiotiques appartiennent généralement aux genres *Lactobacillus*, *Enterococcus* ou *Bifidobacterium*. Les effets bénéfiques associés aux bactéries probiotiques incluent des activités antimicrobiennes, la prévention des diarrhées, l'augmentation du métabolisme du lactose, des propriétés antimutagènes et anti-carcinogènes, la réduction du cholestérol et la stimulation du système immunitaire (Shah, 2007). De nombreuses revues ont traité de l'intérêt des bactéries lactiques probiotiques (Chen & Walker, 2011; Azcárate-Peril et al., 2011; Reid et al., 2010) cependant, les effets bénéfiques ont été plus souvent démontrés dans des modèles animaux que par des tests cliniques sur l'homme. De plus, l'effet d'un probiotique dépend fortement de la dose ingérée ainsi que de la souche utilisée.

Les trois principaux effets bénéfiques des probiotiques sont recensés Figure 13 (Travers et *al.*, 2011): (1) Les probiotiques peuvent modifier leur environnement physico-chimique (nutriments, mucus, disponibilité des récepteurs membranaires des cellules épithéliales, pH, jonction cellulaire et péristaltisme).

(2) Les probiotiques peuvent produire des molécules biologiquement actives telles que des bactériocines, des antibiotiques ou du peroxyde d'hydrogène ayant des propriétés antimicrobiennes. (3) Les probiotiques peuvent induire une modulation du système immunitaire grâce à leur interaction avec des cellules dendritiques activant la différenciation des cellules T naïves en cellules Th1, Th2 ou lymphocyte ce qui permet l'induction de différentes cytokines et/ou une réponse immunitaire humorale *via* les cellules productrices d'IgA.

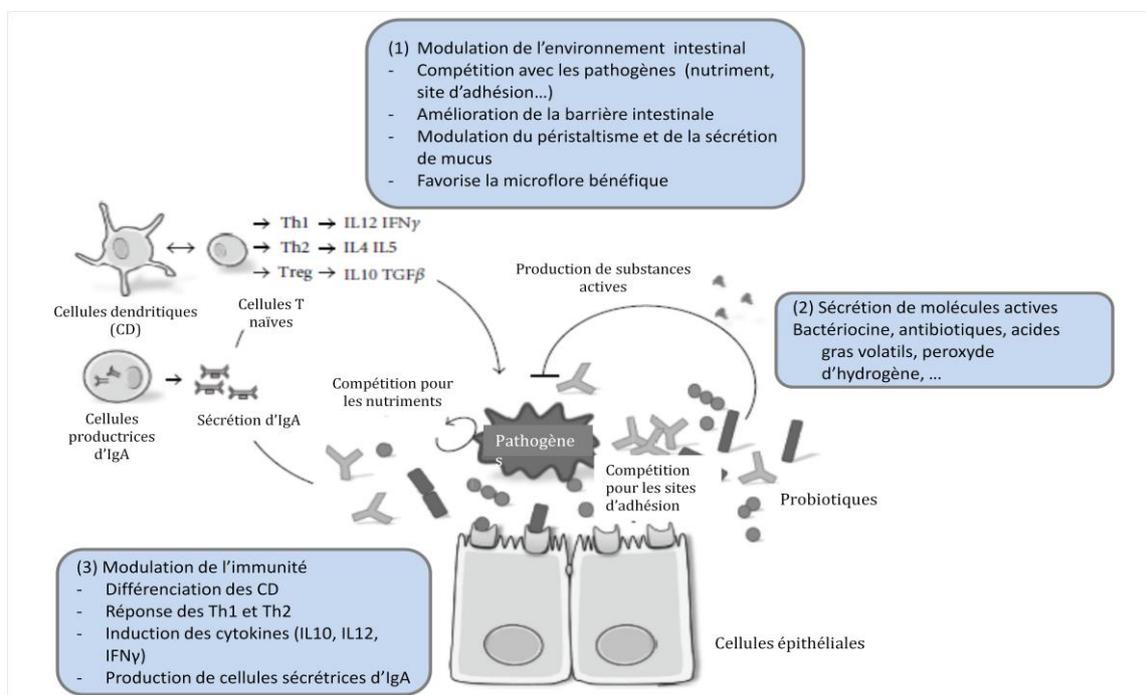


Figure 13 : Représentation schématique des différents moyens par lesquels un probiotique peut contrôler un microorganisme pathogène.

Le fer est un élément limitant de la croissance de nombreuses bactéries et les probiotiques peuvent entrer en compétition avec des bactéries pathogènes pour son utilisation. Notamment, *Lactobacillus* a la capacité d'une part, de sécréter des sidérophores chélatant et transportant le fer ; et d'autre part, de lier l'hydroxyde ferrique à sa surface, le rendant ainsi indisponible pour les pathogènes (Travers et *al.*, 2011). La capacité des bactéries lactiques à inhiber l'adhésion de bactéries entéropathogènes telles que *Escherichia coli* sur des cellules intestinales humaines *in vitro*, a été démontrée depuis de nombreuses années (Chauvière et *al.*, 1992; Coconnier et *al.*, 1993). Concernant les STEC, il n'existe pas de probiotiques dont l'effet protecteur ait été

démontré chez l'homme, mais les études les plus avancées font état d'activités inhibitrices de l'infection par des *E. coli* pathogènes chez des souris (Tsai et al., 2010; Yang et al., 2009).

De nombreux effets bénéfiques des probiotiques pour la santé humaine restent cependant sujets à discussion puisque leurs mécanismes d'action ne peuvent être actuellement clairement expliqués (Cogan et al., 2007).

b) Probiotiques destinés à la santé animale

Les probiotiques bactéries ou levures vivantes, autorisés en Europe dans l'alimentation animale sont classés comme additifs zootechniques. A ce titre, ils sont soumis depuis 1993 à une réglementation très stricte : Règlement (CE) n°1831/2003 relatif aux additifs destinés à l'alimentation des animaux. Les microorganismes considérés comme additifs et autorisés de manière permanente dans l'alimentation des animaux dans l'UE sont peu nombreux. Il s'agit de *Saccharomyces cerevisiae*, *Enterococcus faecium* et *Lactobacillus acidophilus*, d'après le Règlement (CE) n°1520/2007.

Des cultures de *Lactobacillus* et de *Streptococcus* ou des produits de la fermentation peuvent être employés dans l'alimentation des animaux au Canada. Les levures de la classe des *Saccharomyces* peuvent aussi être utilisées. Des produits de fermentation sont autorisés lorsqu'ils proviennent d'*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus faecium*, *Streptomyces* et *Penicillium*.

L'administration directe de probiotiques à des animaux et plus précisément aux ruminants est une pratique qui existe depuis plus de 30 ans. Initialement, l'administration de probiotiques avait pour but l'accélération de l'établissement de la microflore intestinale. Les espèces les plus utilisées étaient alors *Aspergillus oryzae* et *Saccharomyces cerevisiae* (Martin & Nisbet, 1992). Des mélanges de probiotiques de plus en plus complexes ont ensuite été utilisés dans le but d'améliorer la digestion des fibres et de prévenir l'acidose du rumen chez des ruminants adultes avec plus ou moins de succès (Swyers et al., 2008). Puis des agents microbiens de deuxième génération ont été employés pour rehausser le rendement laitier, la croissance et la valorisation des aliments chez les bovins. Des études ont porté sur divers probiotiques utilisés en alimentation animale. Il s'agit de bactéries lactiques dont *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* ou *Lactobacillus acidophilus*; de bactéries issues du rumen (*Megasphaera elsdenii*, *Prevotella bryantii* ou *Selenomonas ruminantium*) ou encore d'autres bactéries comme *Propionibacterium freundenreichii*, *Propionibacterium jensenii*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Bifidobacterium* spp., *Bacillus* spp. ou *Escherichia coli*, ainsi que des levures et champignons : *Saccharomyces cerevisiae* ou *Aspergillus oryzae* (McAllister et

al., 2011). Un mode d'action de ces probiotiques chez les ruminants a été proposé par les auteurs (Figure 14) : ces agents microbiens peuvent modifier la fermentation ruminale, l'absorption des nutriments, les fonctions immunitaires intestinales et sélectivement exclure des microorganismes du tube digestif. Certains probiotiques peuvent survivre au passage dans le tractus intestinal et être excrétés dans les fèces.

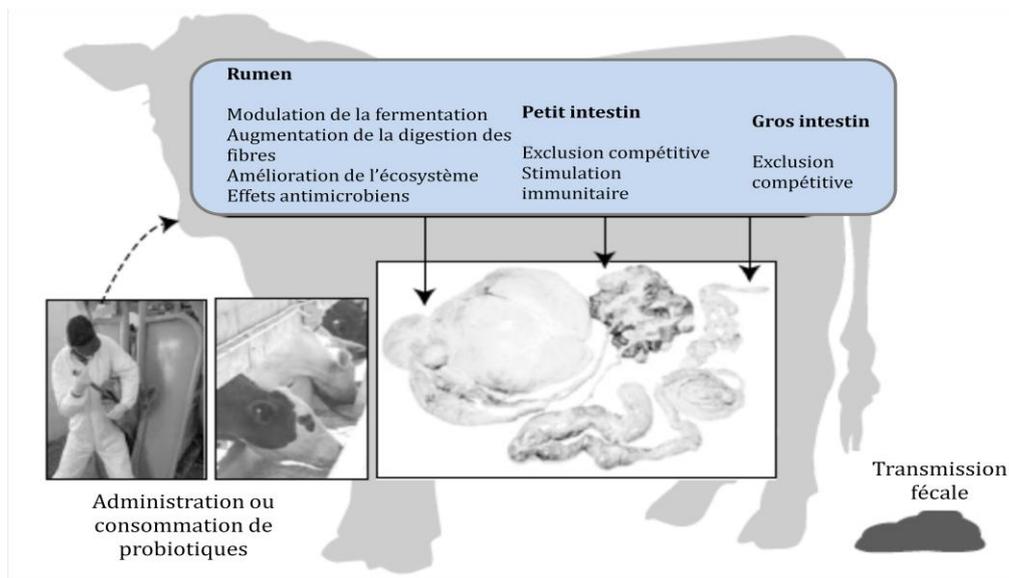


Figure 14 : Mode d'action des bactéries probiotiques chez les ruminants (McAllister et al., 2011).

Plus récemment, on s'est aussi intéressé au développement d'agents microbiens susceptibles de combattre les agents pathogènes à l'origine de certaines zoonoses comme *Listeria*, *E. coli* O157:H7 et *Salmonella* spp. (Stephens et al., 2007; Lauková & Czikková, 1998).

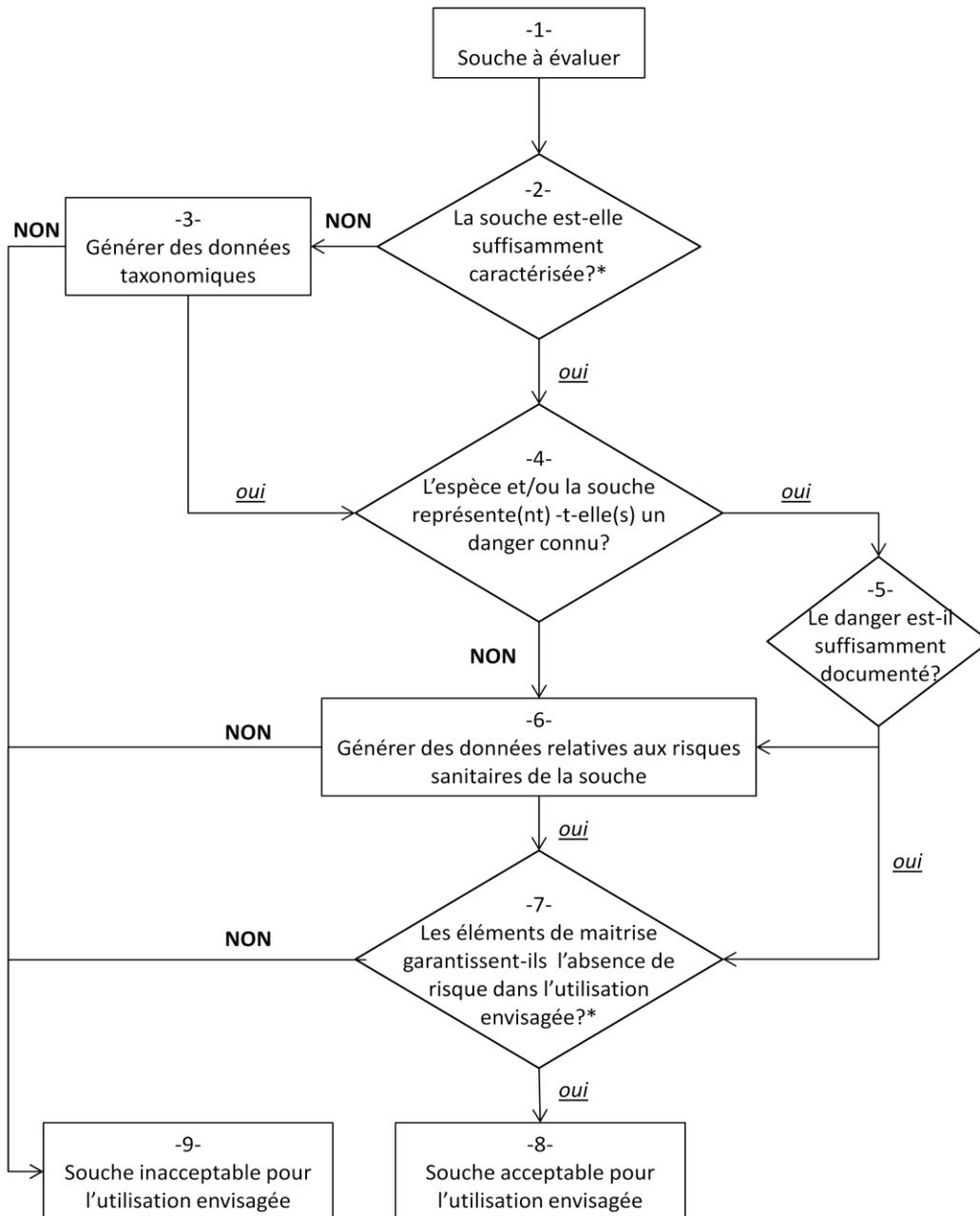
3.2 Ajout des bactéries lactiques dans les produits d'alimentation humaine ou animale

La **fermentation** est une des plus vieilles technologies de conservation des aliments. Elle dérive de procédés millénaires et les premières évocations de produits fermentés datent de 6000 av JC. Les acteurs essentiels de la fermentation sont les bactéries, les levures et les moisissures. La fermentation permet l'amélioration de la durée de vie et de la qualité sanitaire des aliments par inhibition des microorganismes contaminants. Elle permet aussi d'améliorer les propriétés nutritionnelles (meilleure digestibilité du lactose du lait par exemple) et organoleptiques (flaveur, arôme, texture, apparence...) de l'aliment initial. Les bactéries lactiques sont très largement utilisées en tant qu'agents de fermentation (starters) dans différents produits

alimentaires (Leroy & De Vuyst, 2004; Cogan et al., 2007) et sont présentes à des niveaux élevés au sein des aliments fermentés (de l'ordre de 10^8 UFC/g dans les fromages, les yaourts, les salamis, les olives, les saucisses...).

Les bactéries lactiques sont aussi de plus en plus utilisées dans des stratégies de **bio-protection** des aliments (Caplice & Fitzgerald, 1999). La bio-protection se distingue de la fermentation par le fait que l'amélioration du produit fini n'est pas spécifiquement recherchée, la protection de l'aliment contre des microorganismes d'altération ou pathogènes est le critère principal. En bio-préservation, des effets synergiques ont pu être observés entre bactériocines ou entre bactériocines et d'autres composés antimicrobiens (Yoon et al., 2011; Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010; García et al., 2010).

L'AFSSA a émis un avis concernant la présentation des données permettant l'évaluation des microorganismes utilisés dans le secteur agro-alimentaire. Cet avis concerne des souches nouvelles ou modifiées ou des applications différentes de souches déjà utilisées (AFSSA, 2002). Un arbre décisionnel a été établi (Figure 15) pour déterminer l'acceptabilité d'une souche microbienne pour une utilisation en agro-alimentaire. Les données nécessaires à la décision doivent être collectées dans la littérature et complétées si besoin par des données expérimentales (test de virulence, test de tolérance...). L'AFSSA peut ensuite délivrer une autorisation de commercialisation et d'utilisation de la souche lactique pour laquelle le dossier aura été déposé. Au niveau européen, l'appellation QPS, pour « Qualified Presumption of Safety » peut être accordée à un groupe taxonomique, en fonction de 4 points principaux : la fiabilité de l'identification, l'étendue de nos connaissances sur ce groupe, la possible pathogénie de ces membres ainsi que l'utilisation finale envisagée. Dans le cas où aucun problème de sécurité sanitaire n'est soulevé, où que ces problèmes peuvent être clairement définis et écartés, le groupe taxonomique obtient le statut QPS (EFSA, 2007). En Europe, l'utilisation des bactériocines s'apparente à l'utilisation des additifs conservateurs parmi les additifs alimentaires, régie par la directive 95 /2. La nisine (dans le monde) et la pédiocine PA-1 (hormis l'Europe) sont actuellement les seules bactériocines commercialement exploitées. Selon les pays, les concentrations autorisées varient : la nisine peut être ajoutée sans limite légale dans le fromage aux Royaume-Unis, alors qu'elle peut atteindre une concentration maximale de 12,5mg/g de fromage en Espagne (Sobrinho-Lopez & Martin-Belloso, 2008).



* Dans l'état actuel des connaissances

Figure 15 : Arbre décisionnel utilisée pour l'évaluation de l'innocuité d'une souche microbienne utilisée dans le secteur agro-alimentaire (AFSSA, 2002).

a) Dans les produits laitiers

Après la traite, le lait contient entre 10^3 et 5×10^3 microorganismes par millilitre. La flore originelle du lait est essentiellement composée de Lactobacilles et de Streptocoques commensaux du pis et des canaux galactophores. Le lait peut ensuite être contaminé par divers germes provenant de l'environnement immédiat de la traite ainsi que de défauts d'hygiène.

Les processus fermentaires résultants de l'action des bactéries lactiques présentes initialement ou ajoutées au sein des produits laitiers, peuvent être orientés dans un intérêt technologique ou sanitaire.

Intérêt technologique : les bactéries lactiques dans le fromage

Dans l'industrie laitière deux types de ferments lactiques sont utilisés : les ferments mésophiles dont la température optimale de croissance est proche de 30°C et les ferments thermophiles dont la température optimale est de 43°C. Les ferments mésophiles, utilisés principalement dans l'élaboration des produits laitiers frais (fromage frais, beurre et crème fraîche épaisse), sont composés de 2 genres bactériens possédant des propriétés technologiques complémentaires : propriétés d'acidification, principalement par *Lactococcus* et des propriétés d'aromatisation dues essentiellement à *Leuconostoc*. Ces deux genres bactériens se différencient par la voie de fermentation des sucres. La production de CO₂ provenant de l'hétérofermentation du lactose et de l'utilisation du citrate est à l'origine de la formation des cavités dans le caillé. Le diacétyl provenant de l'utilisation du citrate constitue le composé aromatique principal recherché dans les produits laitiers frais. D'autres composés tels que l'acétate et l'éthanol résultant du métabolisme hétérofermentaire des bactéries lactiques contribuent à la saveur de ces produits (Drider & Prévost, 2009). Les ferments thermophiles les plus utilisés sont *Streptococcus thermophilus*, ainsi que de nombreux lactobacilles. Ils sont utilisés lorsque les technologies de fermentation se déroulent à des températures comprises entre 30°C et 50°C. Les bactéries lactiques peuvent être divisées en 2 groupes selon leurs propriétés fonctionnelles d'intérêt pour la fabrication des fromages. Le premier groupe concerne les bactéries impliquées dans la fabrication même du produit (acidification, protéolyse...), le second groupe concerne les bactéries permettant de donner de la valeur ajoutée au produit. Il s'agit essentiellement de propriétés métaboliques secondaires, de propriétés probiotiques, de propriétés bactériostatiques ou inhibitrices contre des pathogènes alimentaires et enfin des propriétés de coopération ou d'activation entre microorganismes (Jamet, 2009). Les propriétés de préservation observées dans le fromage sont dues notamment à l'effet combiné de l'acidification, de la déshydratation et de l'ajout de sel.

Intérêt sanitaire

Il a été démontré que des bactéries lactiques isolées de fromages au lait cru possèdent des propriétés antimicrobiennes envers des bactéries pathogènes telles que *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (Ortolani et al., 2010). L'ajout d'un cocktail de bactéries lactiques dans des fromages traditionnels Ethiopiens artificiellement contaminés par 10³ UFC/ml de *E. coli* O157:H7 a montré une diminution du nombre de pathogènes lorsque la contamination a lieu

initialement dans le lait et l'élimination totale du pathogène en cas de contamination post-fermentaire (Tsegaye & Ashenafi, 2005). Des essais de compétition dans du lait fermenté entre *E. coli* O157:H7 et différents starters ont démontré le pouvoir inhibiteur de la part des bactéries lactiques testées. Dans l'ordre décroissant, les bactéries thermophiles, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, et *Streptococcus thermophilus* ont montré une limitation de la survie du pathogène dans les fromages (Dineen et al., 1998).

Dans un objectif de bioprotection, les bactériocines peuvent aussi être employées directement dans les produits laitiers. La reutérine produite par *Lactobacillus reuteri* a été employée avec succès dans le lait et le fromage pour éliminer *Listeria monocytogenes* et *E. coli* O157:H7 (el-Ziney & Debevere, 1998). L'effet d'une pédiocine produite par des souches transformées de *Lactococcus lactis* sur *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *E. coli* O157:H7 a été démontré dans du fromage (Rodriguez et al., 2005). Cependant l'emploi des bactériocines a certaines limites comme leur adsorption sur différentes molécules (lipides, protéines globulaires du lait...), une distribution non homogène dans la matrice, l'inhibition de cultures starters non résistantes, ou encore l'altération de la flaveur de l'aliment initial due à la bactériocine elle-même ou à l'action de la souche productrice (Sobrino-Lopez & Martin-Belloso, 2008).

L'utilisation de bactériocines ou l'action directe des bactéries lactiques peut être combinée à des traitements physiques telle que l'utilisation de hautes pressions qui endommagent les membranes bactériennes, les rendant plus perméables (Masschalck et al., 2001). Il a été démontré que l'exercice d'une pression de 300MPa sur des fromages préalablement inoculés avec des bactéries lactiques productrices de bactériocines inactivait totalement 10^5 UFC/ml de *E. coli* O15:H7 (Rodriguez et al., 2005).

b) Dans les produits issus de la viande

La composition de la microflore des produits carnés dépend des manipulations post-abattage et de l'environnement des ateliers de transformation. En effet, lors de ces manipulations, les microorganismes entrent en contact avec la viande, stérile à l'origine et la contaminent. Les germes les plus importants quantitativement sont ceux présents dans l'air ambiant ainsi que sur le cuir et les poils des animaux. La microflore contaminante peut être composée de bactéries contribuant à la qualité du produit fini ou au contraire de bactéries pathogènes et/ou d'altération.

Dans les produits fermentés, il existe une flore lactique endogène d'intérêt technologique pour la fabrication de produits dit fermiers ainsi qu'une flore lactiqueensemencée volontairement et utilisée essentiellement lors de la fabrication industrielle de ces mêmes aliments. Dans les deux cas, la dénomination de ferments leur est appliquée.

Les bactéries lactiques homofermentaires sont très recherchées sur le plan technologique pour assurer la fermentation, abaisser le pH et sécuriser les produits fermentés, contrairement aux bactéries lactiques hétérofermentaires strictes ou facultatives qui peuvent être à l'origine d'altération du produit. Par exemple la flore hétérofermentaire est considérée comme indésirable dans les produits de salaison car elle produit des gaz créant des goûts acides et des défauts technologiques. Les principales espèces lactiques retrouvées dans les produits carnés sont : *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, et *Lb. farciminis*. Occasionnellement des genres tels que *Carnobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. ou encore *Lactococcus* spp. peuvent être observés. D'autres bactéries d'origine exogène peuvent être ajoutées dans l'objectif d'augmenter la sécurité ou de modifier la texture, le goût et la qualité organoleptique des produits. En Europe, les principales bactéries lactiques utilisées pour les processus de fermentation carnée sont *Lb. sakei*, *Lb. curvatus* et *Lb. plantarum*, alors que le genre *Pediococcus* est particulièrement utilisé aux USA (Hugas, 1998).

De même que dans les produits laitiers, les processus fermentaires au sein des produits carnés peuvent être orientés dans des objectifs technologique ou sanitaire.

Intérêt technologique : les bactéries lactiques dans le saucisson sec

Suivant les habitudes culturelles, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Pediococcus acidilactici* et *Pediococcus pentosaceus* sont utilisés comme ferments en salaison dans différents pays (Chevallier, 2009).

Certains staphylococoques (*S. carnosus*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. xylosus*) permettent la réduction des nitrates en nitrites par action de la nitrate réductase et provoquent ainsi la coloration des saucissons (Toldrá, 2002). Ils possèdent également des enzymes protéolytiques et lipolytiques qui décomposent respectivement les protéines en acides aminés et les lipides en acides gras libres contribuant à l'amélioration de la saveur du saucisson (Montel et al., 1996). Par la production d'acide lactique, les lactobacilles permettent la coagulation des protéines de la viande et inhibent le développement de certains germes indésirables (Leistner, 1995). Les quantités d'acide lactique sont de l'ordre de 90 µmol/g de matière sèche au début du procédé de fabrication et peuvent atteindre jusqu'à 260 µmol/g de matière sèche après 40 jours de maturation (Chevallier, 2009).

Intérêt sanitaire

Dans les produits carnés conservés sous vide ou sous atmosphère modifiée avec une forte concentration de CO₂, la population lactique devient rapidement prédominante et par un phénomène de compétition de flore, préserve la viande des fermentations pathogènes. De nombreuses études ont fait état de l'activité inhibitrice de bactéries lactiques dans des produits carnés envers des pathogènes comme *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 ou des bactéries indésirables comme *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc carnosum* et *Brochothrix thermosphacta* (Aksu et al., 2008; Bredholt et al., 1999; Vermeiren et al., 2004).

Certaines bactéries lactiques bactériocinogènes sont psychrotropes et présentent donc un grand intérêt pour la bioprotection des produits carnés. Les bactériocines concernées : la sakacine, la curvacine, la bavaricine, la leucocine et la carnobacteriocine, ne possèdent pas un spectre d'action antimicrobien aussi important que celui de la nisine mais elles présentent un intérêt en bioprotection car la plupart sont actives contre *Listeria* (Hugas, 1998). La combinaison de bactériocines avec d'autres traitements physiques ou chimiques a été particulièrement étudiée pour lutter contre *Listeria monocytogenes* (Hereu et al., 2011; Jofré et al., 2007) et *Escherichia coli* O157:H7 (Cutter & Siragusa, 1995). Comparé à son utilisation dans les produits laitiers, la nisine n'est pas véritablement intéressante pour la bioprotection des produits carnés, que ce soit par ajout direct ou par l'intermédiaire de bactéries productrices. En effet, la nisine est faiblement soluble, soumise à une distribution hétérogène et peu stable dans cet environnement. De plus, les doses nécessaires pour être efficaces ne sont pas rentables économiquement et dépassent la dose maximale autorisée (100g/jour/60kg poids corporel).

c) Dans les végétaux

Presque tous les légumes peuvent être fermentés dans une saumure (ajout de sel) où les sucres et autres nutriments seront transformés principalement en acide lactique. Les bactéries lactiques permettent ainsi la production et la conservation d'aliments à base de légumes et fruits fermentés. Les végétaux fermentés ayant la plus grande importance économique en occident sont les olives, le chou et les concombres mais il en existe une multitude d'autres de par le monde (Caplice & Fitzgerald, 1999).

La flore microbienne des végétaux varie selon l'environnement (climat, types de sols, engrais...). Les structures des communautés microbiennes des végétaux sont similaires pour une même espèce végétale mais varient d'une espèce à l'autre (Ennahar, 2009). Dans l'ensemble, la population bactérienne des végétaux est dominée par les bactéries aérobies, et les levures et les bactéries lactiques ne représentent pas plus de 0,1 à 1% de la flore totale (Yang et al., 2001).

Elles s'y trouvent dans un état de dormance et doivent être revivifiées pour reprendre leur croissance. La flore lactique végétale est généralement composée de *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* ainsi que *Lactobacillus*, mais la plupart des informations disponibles concernant les bactéries lactiques des différents végétaux est en réalité déduite des études de fermentation de ces mêmes végétaux. C'est le cas du chou ou de la laitue notamment (Yang et al., 2010).

L'orientation des processus fermentaires des végétaux dans un but technologique ou sanitaire est une fois encore possible *via* l'utilisation des bactéries lactiques.

Intérêt technologique : les bactéries lactiques dans le chou fermenté

La production Française de choucroute est d'environ 45 000 tonnes par an et en Corée la production annuelle de chou fermenté (essentiellement le Kimchi) se monte à environ 1 million de tonnes.

Avant le démarrage de la fermentation, le chou est salé à des concentrations de 2,25 à 2,5% (NaCl en poids) afin d'extraire l'eau et les nutriments servant au développement des bactéries lactiques fermentaires, d'inhiber la flore microbienne halosensible, d'inhiber les enzymes protéolytiques qui altèrent la texture du chou et de relever le goût du produit final. Seule une partie de la flore initiale peut donc se développer aux concentrations de sels évoquées. La fermentation commence par le développement de *Leuconostoc mesenteroides* principalement, elle se poursuit ensuite avec des lactobacilles (Steinkraus, 1983). Les produits principaux de cette fermentation sont les acides lactiques, acétique et l'éthanol ainsi que divers composés volatils tels que le cis-hex-3-ène-1-ol et l'allyl isothiocyanate, principaux composés aromatiques du chou (Ennahar, 2009).

Intérêt sanitaire

Comme pour les autres produits alimentaires précédemment cités, les bactéries lactiques peuvent être ajoutées dans les végétaux afin d'orienter les processus fermentaires pour inhiber le développement de contaminants. Les bactéries lactiques ont notamment montré un potentiel inhibiteur envers différents agents phytopathogènes ou d'altération comme *Xanthomonas*, *Erwinia* ou *Botrytis* (Trias et al., 2008). De même, les bactéries lactiques *Lactobacillus plantarum* et *Leuconostoc mesenteroides* ont été utilisées avec succès dans la choucroute (Beganović et al., 2011).

Points clés

- Les bactéries lactiques sont des bactéries ubiquistes et exigeantes du point de vue nutritionnel. Leur génome est très spécialisé.
- La classification des bactéries lactiques est complexe et ne peut se baser uniquement sur des critères phénotypiques. Le nombre d'espèces lactiques connues est en constante augmentation.
- Le métabolisme des bactéries lactiques peut être homofermentaire avec production d'acide lactique ou hétérofermentaire facultatif ou obligatoire avec notamment production d'autres acides organiques (acide acétique, succinique...).
- Les bactéries lactiques produisent des substances à activités antimicrobiennes envers de nombreuses autres bactéries, notamment des acides organiques, des bactériocines ou encore du peroxyde d'hydrogène.
- Elles sont souvent employées en tant que probiotiques dans l'alimentation humaine ou animale. On les retrouve également dans les aliments (produits laitiers, carnés ou végétaux) dans 2 contextes : dans un objectif de fermentation en tant que flore technologique ou dans un objectif de bioprotection (intérêt sanitaire).

Chapitre 3: L'ensilage

Le but de ce chapitre est de présenter les informations disponibles à ce jour sur la fabrication de l'ensilage et les communautés microbiennes pouvant y être retrouvées. Ce chapitre aborde également les stratégies à mettre en œuvre pour limiter la dégradation de l'ensilage et l'impact économique et sanitaire qui en découle pour les animaux et les humains.

1. Généralités

Le secteur de l'élevage est l'un des segments les plus dynamiques de l'économie agricole, en particulier dans les pays en voie de développement. La demande en produits carnés et laitiers augmente continuellement et des questions se posent quant à la façon dont cette demande pourra être satisfaite, et par qui. La libre disposition tout au long de l'année d'une base fourragère permanente est une priorité physiologique pour les ruminants et une priorité économique pour les agriculteurs. Partout dans le monde, les productions de céréales sont saisonnières et un excédent de production est disponible pendant la saison de la récolte alors qu'un déficit est observé pendant l'hiver.

L'ensilage est une méthode de préservation des cultures basée sur la fermentation lactique en conditions anaérobies (Gollop et *al.*, 2005). Divers matériaux végétaux peuvent être utilisés pour l'ensilage : herbe, trèfle, luzerne, orge, maïs, blé, sorgho (Ashbell & Weinberg, 2006) ainsi que divers matériaux humides provenant de l'industrie alimentaire et dénommés "sous-produits" tels que des déchets de conserverie de légumes, la pulpe de betterave, les drêches de brasserie ... (AFSSA, 2004). L'objectif principal de l'ensilage est de rendre des fourrages disponibles tout au long de l'année pour leur utilisation comme source principale d'aliments à haute valeur nutritionnelle pour les ruminants, améliorant ainsi la durabilité économique et environnementale des systèmes d'élevage.

Les cultures les plus importantes pour l'ensilage sont le maïs plante entière, la luzerne et diverses graminées (Weinberg & Ashbell, 2003). L'ensilage de maïs est le plus largement utilisé pour l'alimentation des vaches laitières en raison de sa haute valeur nutritionnelle. En France, l'ensilage de maïs est consommé par environ 80% des troupeaux de vaches laitières tout au long de l'année (AFSSA, 2004) et il est largement utilisé aux États-Unis (Jokela & Russelle, 2003). Au Danemark, la production de maïs pour l'ensilage a augmenté de plus de 70 % entre 1990 et

2008, et elle est égale, voire supérieure à la production d'herbe pour l'ensilage (Storm et al., 2010). Dans le monde, l'ensilage de maïs représente entre 50 % et 75 % de l'alimentation d'une vache laitière (Driehuis et al., 2008) consommant environ 26 kg de matière sèche par jour (Drackley et al., 2006). Une enquête économique portant sur la production mondiale d'ensilage a été réalisée par Wilkinson & Toivonen (2003). La quantité de matière sèche (MS) ensilée annuellement dans le monde est estimée à 200 millions de tonnes (Wilkins et al., 1999). En France, les zones consacrées aux cultures de maïs pour l'ensilage ont augmenté de 1 154,8 milliers d'hectares en 1980 à 1 407,2 milliers d'hectares en 2008 avec un pic de 1 844,5 milliers d'hectares en 1990 (Agreste, 2008). Au cours des 10 dernières années, l'ensilage de maïs représentait d'environ 120 tonnes de matière sèche par hectare (Agreste, 2010).

Le processus d'ensilage comporte de nombreuses étapes qui doivent être réalisées dans les temps et contrôlées avec soin, afin de s'assurer de sa conservation avec un minimum de pertes économiques et de risques sanitaires. Les hommes et les animaux peuvent voir leur santé affectée par des maladies issues directement de l'ensilage ou *via* le portage asymptomatique de pathogènes par les animaux consommant cet ensilage. En effet, tout au long de la filière de production d'un aliment, qui va « de la fourche à la fourchette », des contaminations microbiennes peuvent avoir lieu à différentes étapes avant d'atteindre l'homme. Les interventions en début de chaîne alimentaire et en particulier au niveau des aliments pour animaux offrent un moyen intéressant de réduire de nombreux risques sanitaires.

2. Fabrication de l'ensilage et rôle des différents groupes microbiens.

La période optimale pour la récolte varie en fonction des cultures considérées afin d'obtenir les valeurs nutritives les plus intéressantes pour les troupeaux. Le maïs fourrager doit être récolté lorsque la plante atteint 30% à 35% de matière sèche (Ashbell & Weinberg, 2006). Le fourrage vert Ray-grass est considéré de bonne qualité car il est particulièrement digestible ce qui permet son utilisation pour de nombreuses races de ruminants. Les plantes comme la luzerne ou le trèfle sont récoltées en début de floraison. Idéalement, la luzerne doit être récoltée au stade de bouton car la teneur en sucre de la plante est à son maximum, mais une récolte plus tardive est possible durant la période de floraison (Undersander, 2010).

La flore bactérienne de l'herbe est initialement dominée par des bactéries Gram-négatives hétérotrophes et aérobies appartenant aux genres *Aeromonas*, *Cellulomonas*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* et *Xanthomonas* (Kroulik et al., 1955; Gouet & Chevallier, 1966). Le faible nombre de bactéries lactiques épiphytes détectées pourrait s'expliquer par le fait que

celles-ci sont dans un état physiologique viable mais non cultivable (VBNC) du fait de conditions environnementales hostiles. En effet, en aérobiose les bactéries lactiques peuvent produire des dérivés toxiques de l'oxygène comme par exemple le radical O_2^- . Des substances issues de plantes comme la superoxide-dismutase ou le manganèse peuvent détoxifier ces espèces radicalaires. Ces substances végétales deviennent accessibles aux bactéries lactiques VBNC par hachage des plantes en brins de petite taille avant la mise en silo (Archibald & Fridovich, 1981; Daeschel et al., 1987).

Le processus d'ensilage se déroule en plusieurs étapes. Les cultures récoltées à leur stade optimal de maturité, sont découpées, chargées et compactées dans des silos qui sont ensuite scellés pour empêcher l'introduction d'air et conserver l'ensilage pendant plusieurs mois. Il sera ensuite désilé afin de servir de nourriture aux animaux. Ces différentes étapes sont reliées à des événements physico-chimiques et microbiologiques regroupés en 4 phases : une phase aérobie, une phase de fermentation, une phase de stockage et une phase de désilage (Ashbell & Weinberg, 2006).

2.1 La phase aérobie

La première étape du processus d'ensilage se nomme la respiration résiduelle. Cette étape aérobie est due à l'activité enzymatique des cellules végétales intactes. Ces cellules consomment l'oxygène piégé dans l'ensilage et utilisent les sucres solubles comme le glucose ou le fructose en produisant des effluents et de la chaleur (Muck, 1988). Cette consommation de sucres se fait au détriment de la future fermentation lactique anaérobie, principal moteur de la conservation de l'ensilage. Durant cette première période, la microflore aérobie se développe jusqu'à épuisement de l'oxygène ou jusqu'à ce que l'acidification du milieu soit assez importante pour limiter le métabolisme microbien. L'activité microbienne initiale est principalement due à une flore aérobie épiphyte comprenant des entérobactéries, des levures et moisissures. *Erwinia herbicola* et *Rahnella aquitilis* sont des espèces fréquemment retrouvées sur les cultures, mais après ensilage, elles sont rapidement supplantées par d'autres espèces, notamment *Hafnia alvei*, *Escherichia coli*, et *Serratia fonticola* (Heron et al., 1993). La capacité des entérobactéries à réduire les nitrates (NO_3^-) est considérée comme un point positif dans la préservation de l'ensilage car le nitrite (NO_2^-) et l'oxyde nitreux (N_2O) ainsi formés sont inhibiteurs de plusieurs microorganismes d'altération (Spoelstra, 1985).

Pendant cette phase aérobie, de l'acide acétique est produit en faible quantité et le pH du milieu reste élevé (pH 6-6,5). Les bactéries anaérobies et aérotoles pouvant être actives durant cette période comme les streptocoques et *Leuconostoc* se caractérisent par une fermentation

hétérolactique qui contribue à diminuer lentement le pH de l'ensilage. Le rendement de cette acidification reste cependant plus faible que celui de bactéries lactiques homofermentaires telles que de nombreuses espèces de *Lactobacillus* (Holzer et al., 2003).

2.2 La phase fermentaire

L'acidification progressive de l'ensilage permet le développement de bactéries lactiques acido-tolérantes telles que *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus buchneri* (Holzer et al., 2003), qui convertissent les sucres solubles en acide lactique principalement. Le métabolisme fermentaire de ces bactéries induit une diminution rapide du pH, stoppe le développement des autres microorganismes et permet ainsi la préservation de l'ensilage. Il s'agit donc de la phase de fermentation qui commence lorsque la masse ensilée est devenue anaérobie. Cette phase dure habituellement de plusieurs jours à plusieurs semaines.

Durant cette période, les différents groupes de microorganismes anaérobies ou aérobies facultatifs retrouvés naturellement dans les plantes (bactéries lactiques, entérobactéries, levures...) entrent alors en compétition pour l'utilisation des nutriments disponibles. Dans des ensilages correctement menés, les bactéries lactiques dominent rapidement la fermentation permettant la conservation de l'ensilage grâce à l'obtention rapide d'un pH bas. Les bactéries lactiques typiquement associées à l'ensilage appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Enterococcus* (McDonald et al., 1991). Parmi les bactéries lactiques, certaines sont connues pour être homofermentaires obligatoires et peuvent produire plus de 90% d'acide lactique à partir des sucres solubles. Elles sont cependant incapables de fermenter les pentoses. Les bactéries lactiques hétérofermentaires facultatives peuvent produire de l'acide acétique, de l'éthanol, de l'hydrogène et du dioxyde de carbone en plus de l'acide lactique. Les espèces hétérofermentaires obligatoires fermentent à la fois les hexoses et les pentoses en produisant les mêmes produits de fermentation (Driehuis & Oude Elferink, 2000). Les bactéries lactiques sont caractérisées par leur grande tolérance à l'acidité et selon les cultures fourragères, elles sont capables de diminuer le pH de l'ensilage en dessous de quatre. Pendant l'étape de fermentation, l'ensilage de maïs est censé atteindre des valeurs finales en oxygène de 0 % à 2 %, en dioxyde de carbone de 15 à 90% et un pH autour de 3,8 (Weinberg & Ashbell, 2003). Le Tableau 6 montre la concentration finale de produits de fermentation dans un ensilage de maïs en fonction de la teneur en matière sèche au moment de l'ensilage.

Tableau 6 : Valeurs physico-chimiques dans l'ensilage de maïs en fonction de la teneur en matière sèche (MS) initiale, issus de INRA (2010).

MS (%)	pH	% N total		Produits de Fermentation (g/kg de MS)				
		N-NH ₃	N-sol	Acide Lactique	Acide Acétique	Acide Propionique	Acide Butyrique	Alcools
25	3,75	7	60	63	19	T	T	49
30	3,73	8	55	76	14	T	T	3
35	3,75	7	52	60	14	T	T	3
40	3,85	7	52	47	11	T	T	4

N-NH₃ : Azote ammoniacal ; N-sol : Azote soluble ; T : traces

2.3 La phase de stockage

Pendant la période de stockage, les silos sont scellés et l'air ne peut pénétrer à l'intérieur. Cette étape dure habituellement plusieurs mois et aussi longtemps que le pH est suffisamment bas et que l'anaérobiose est préservée, peu de changements se produisent. Le nombre de bactéries lactiques et d'autres microorganismes viables diminue au fil du temps, excepté pour certaines espèces spécialisées telles que *Lactobacillus buchneri* qui continuent à être actives à des densités de population faibles (Driehuis et al., 1999). Par ailleurs, il a été démontré que les lactobacilles homofermentaires tels que *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus curvatus* ont tendance à être prédominants dans les ensilages bien conservés, mais ils finissent toujours par être remplacés par des variétés hétérofermentaires telles que *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus buchneri* à la fin de la période de stockage. Il a été suggéré que ces changements étaient dus à la grande tolérance de ces espèces hétérofermentaires à un de leurs produits de fermentation : l'acétate (Beck, 1972). Certains micro-organismes acido-tolérants peuvent survivre à cette période de stockage comme par exemple des levures dans un état presque inactif (Storm et al., 2010) ou les bactéries butyriques sous forme de spores (Vissers et al., 2006).

2.4 Le désilage

La quatrième phase est la phase de désilage pour servir à l'alimentation des animaux. A ce moment, les silos sont ouverts et l'air pénètre dans l'ensilage en fonction de la densité et la porosité de la matière végétale ainsi que de l'avancement du front d'attaque. L'air provoque le redémarrage du développement des microorganismes aérobies initialement présents ainsi qu'une augmentation du pH (Driehuis & Oude Elferink, 2000). En effet, les levures et les

moisissures sont acido-tolérantes et sont connues pour consommer les acides présents dans l'ensilage lorsque l'aérobiose est rétablie (Higginbotham et *al.*, 1998).

La Figure 16 résume l'évolution théorique des principales valeurs physico-chimiques et des populations microbiennes au cours du processus d'ensilage.

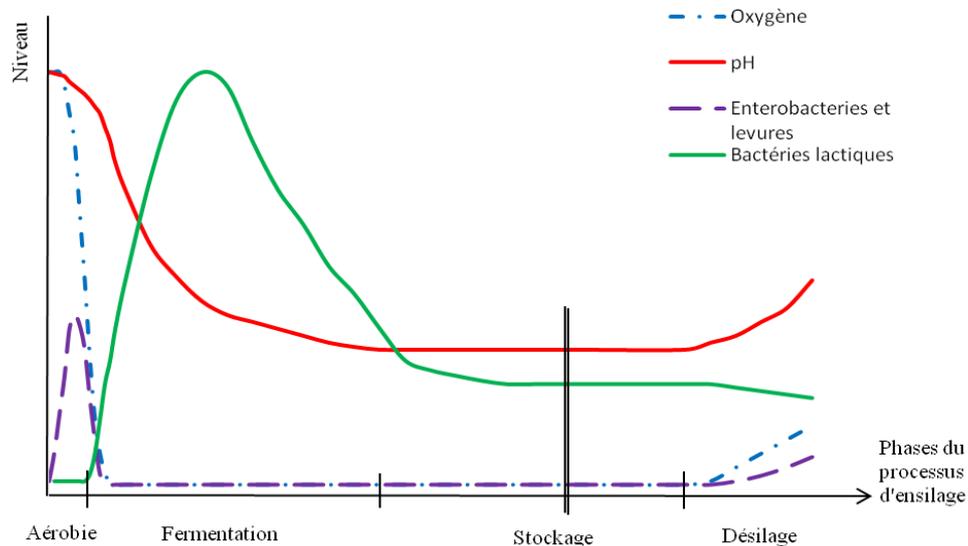


Figure 16 : Evolution théorique des teneurs en oxygène, des valeurs de pH et des populations microbiennes aux différentes étapes du processus d'ensilage, d'après Pitt & Sniffen (1985).

3. Qualité nutritionnelle de l'ensilage

La composition chimique et la valeur énergétique des ensilages sont peu modifiées par rapport à celle des plantes récoltées. Dans les ensilages, les pertes de produits solubles dans les effluents augmentent proportionnellement la concentration des constituants chimiques dans la matière sèche, mais la digestibilité de la matière organique (dMO) est peu modifiée par rapport à celle du fourrage vert (AFSSA, 2004). La digestibilité d'un constituant correspond à la proportion de ce constituant disparaissant dans le tube digestif. Elle est estimée à partir d'un calcul de bilan total entre la quantité ingérée et la quantité excrétée de ce constituant. La valeur azotée des fourrages est exprimée en quantité de protéines digestibles dans l'intestin grêle (PDI). Selon le système INRA, on distingue les protéines alimentaires non dégradées dans le rumen (PDIA) et les protéines ayant été synthétisées par la population microbienne du rumen (PDIM).

En général, l'ingestibilité des ensilages est inférieure à celle des plantes récoltées correspondantes. L'ingestibilité d'un fourrage correspond à la quantité de matière sèche ingérée lorsqu'il est distribué à volonté comme seul aliment. Cette baisse d'ingestion varie en fonction de la teneur en matière sèche, de la taille du hachage des brins et de la qualité de conservation. En

effet, lorsque la teneur en matière sèche du fourrage récolté est faible, la quantité d'acide lactique et d'acides gras volatils produite par les fermentations peut être importante (> 150 - 200 g/kg MS) et avoir un effet négatif sur l'ingestion (INRA 2010).

Les caractères organoleptiques constituent les facteurs déterminants de l'appétence. Un défaut de conservation peut entraîner une baisse voire un refus d'ingestion par l'animal, donc une chute de production et l'apparition éventuelle de troubles de la santé. Une altération des caractères organoleptiques est généralement le reflet d'une déviation fermentaire indésirable. Pour évaluer l'appétence, il est possible de se baser sur trois facteurs : l'odeur, la consistance et la couleur de l'ensilage. Les études analytiques et l'utilisation par les animaux d'un nombre important d'ensilages ont permis de définir des barèmes d'appréciation de leur qualité. Il existe de nombreuses grilles d'appréciation de la qualité des ensilages qui aboutissent à des appréciations assez fiables. Les grilles proposées par l'INRA se fondent sur les paramètres physico-chimiques présentés dans le Tableau 6.

4. Les microorganismes indésirables

L'ensilage peut être vecteur de nombreux microorganismes indésirables pouvant nuire à la conservation de l'ensilage, affecter les performances des animaux ainsi que la santé animale et humaine. Les microorganismes responsables de dégradations dans l'ensilage sont considérés comme des microorganismes d'altération. Ils induisent des pertes essentiellement économiques. Ceux impliqués dans les maladies animales et humaines sont considérés comme des microorganismes pathogènes.

4.1 Les bactéries

a) Les bactéries butyriques

Les bactéries butyriques sont des bactéries telluriques capables de convertir l'acide lactique en acide butyrique, hydrogène et dioxyde de carbone à un pH relativement faible. Une croissance importante des bactéries butyriques peut donc induire une augmentation du pH de l'ensilage ainsi que la croissance d'autres microorganismes d'altération moins tolérants à l'acidité. Les bactéries butyriques sont surtout représentées par des bactéries des genres *Clostridium* et *Bacillus*. Ces bactéries ont la capacité de former des spores. Les bactéries butyriques retrouvées dans les ensilages proviennent en général de l'incorporation accidentelle de sol dans le matériel

végétal au cours du remplissage du silo. L'herbe et l'ensilage de maïs sont les principales sources de spores de bactéries butyriques dans les élevages (Visser, Driehuis, et al., 2007). Ces spores survivent à leur passage dans le tractus gastro-intestinal de vaches laitières (Te Giffel et al., 2002). *Bacillus cereus* peut être retrouvé dans les ensilages et représente un risque sanitaire (Visser, Te Giffel, et al., 2007). En effet, il s'agit du plus important microorganisme d'altération du lait pasteurisé et des produits laitiers. De plus, ces bactéries peuvent entraîner des intoxications alimentaires (Abee et al., 2011).

Les espèces de *Clostridium* les plus fréquemment associées à la détérioration de l'ensilage sont *C. tyrobutyricum* et *C. butyricum* (Driehuis & Oude Elferink, 2000). La présence de *Clostridium* dans le lait peut entraîner des saveurs indésirables ainsi qu'une formation excessive de gaz dans les produits laitiers. *C. botulinum* est connu pour être extrêmement pathogène pour les animaux et les humains. Ce microorganisme produit une neurotoxine botulique (BoNT) causant une maladie neurologique sévère conduisant fréquemment à la mort (ANSES, 2011b). La prolifération de *C. botulinum* ainsi que la production de toxines dans l'ensilage et le tractus gastro-intestinal de bovins ont déjà été signalées. La contamination de l'environnement de la ferme, du lait cru, et la transmission ultérieure du pathogène à travers la chaîne de production des produits laitiers, est par conséquent, possible (Miia Lindström et al., 2010). Aux États-Unis, une étude sur dix ans, réalisée par Johnson et al. (2010), a recensé huit épisodes de botulisme chez des chevaux. L'origine de la contamination a été identifiée comme étant le foin et l'ensilage dans six des huit foyers d'infection. *C. botulinum* montre une tolérance à l'acidité limitée et en général, il y a un risque pour les animaux lorsque ceux-ci ingèrent des ensilages peu acides (pH > 5,5) stockés en anaérobiose, ou de l'ensilage contenant accidentellement des carcasses d'animaux (rongeurs par exemple), pouvant permettre la croissance de la bactérie et la production de toxines (Johnson et al., 2010; Myllykoski et al., 2009). Des données portant sur la prévalence de cet agent pathogène chez les bovins et dans les produits laitiers ont été examinées et publiées par Lindström et al. (2010).

b) *Listeria* sp.

Listeria est une bactérie aérobie ou anaérobie facultative retrouvée dans divers environnements, y compris l'eau, l'herbe, l'ensilage, les matières organiques en décomposition, le sol et les matières fécales (Hassan et al., 2001). Bien que *L. innocua* ou *L. ivanovii* aient été identifiées comme cause de maladies animales (Alexander et al., 1992; Walker et al., 1994), *L. monocytogenes* est la principale espèce responsable de la listériose chez une grande variété d'animaux y compris chez les humains (AFSSA, 2009). Les manifestations cliniques de la listériose sont diverses, comme l'encéphalite, l'avortement ou la septicémie et peuvent conduire

à la mort (Low & Donachie, 1997). Il a été montré que la présence de *L. monocytogenes* dans l'ensilage et/ou les matières fécales augmentait le risque de contamination du lait et donc la transmission à l'homme (Fox et al., 2009; Schoder et al., 2011). Par ailleurs, l'ensilage est considéré comme la principale source de contamination pour les ruminants (Wiedmann, 2003). Selon les emplacements au champ considérés, entre 0 % et 70 % des récoltes pourraient être contaminées (Corrot et al., 1998) et des niveaux de contamination supérieurs à 10^7 UFC/g ont été observés (AFSSA, 2004). *L. monocytogenes* a été retrouvée en Irlande dans 6 % des échantillons d'ensilage testés et il a été démontré qu'une valeur de pH supérieure à 4,5 augmentait le risque de présence de *Listeria* sp. (Vilar et al., 2007). Dans une étude brésilienne, la présence de *Listeria* sp. a été observée dans 65,6 % des échantillons d'ensilage d'herbe à l'ouverture des silos et, parmi ceux-ci, 10% étaient contaminés par *Listeria monocytogenes* (Schocken-Iturrino et al., 2005). En plus de la valeur de pH, la croissance et la survie du pathogène dans l'ensilage dépendent du degré d'anaérobiose. *Listeria* sp. peut être retrouvée à quelques centimètres de la surface de l'ensilage alors que plus en profondeur l'anaérobiose et la fermentation rendent l'environnement plus acide et plus inhibiteur (Fenlon, 1985).

c) Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC)

Les *Escherichia coli* sont des bactéries Gram-négatives aéro-anaérobies. Certaines souches de *E. coli* telles que les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxine (STEC) ont été reconnues comme des pathogènes d'origine alimentaire responsables de maladies humaines (voir chapitre 1). Les ruminants sont connus pour être le principal réservoir des STEC (Chapman et al., 1993; Wang et al., 1996) car ils sont des porteurs asymptomatiques. Les aliments pour animaux, tels que les ensilages, ont été suspectés d'être vecteur de propagation de ce pathogène chez les animaux d'élevage (Davis et al., 2003). Les auteurs ont montré que *E. coli* O157 est retrouvée relativement fréquemment dans les mangeoires (1,8%) (Hancock et al., 2001) et pourrait également se reproduire dans une grande variété d'aliments pour bétail (Lynn et al., 1998). La contamination de l'ensilage par des STEC pourrait se produire *via* les fèces des animaux, au travers de la fertilisation des champs avec de l'eau d'irrigation contaminée ou du fumier. Cependant aucune donnée n'est actuellement disponible sur la prévalence des STEC dans les ensilages. Il a été montré que *E. coli* O157:H7 ne survit pas dans de nombreux types d'ensilages lorsque le processus de fermentation est correctement mené (Avery et al., 2005; Bach et al., 2002; Byrne et al., 2002). Néanmoins une des caractéristiques physiologiques importante des STEC est leur capacité à résister à des pH faibles et à survivre dans des environnements fermentés (Lin et al., 1996). La mauvaise gestion des fermentations dans l'ensilage a ainsi été identifiée comme étant un facteur de survie de *E. coli* O157 (Fenlon et al., 2000; Fenlon & Wilson,

2000). Des souches d'*E. coli* ont pu être détectées en grand nombre dans des ensilages en décomposition, notamment dans les zones périphériques sujettes à une détérioration aérobie (Chen et al., 2005). Lors de la mise en silo, une anaérobiose insuffisante peut retarder l'établissement de la fermentation lactique et entraîner une diminution du pH plus lente, augmentant ainsi la survie des *E. coli* pathogènes (AFSSA, 2004; Chen et al., 2005). De même, à l'ouverture des silos, l'air qui pénètre dans l'ensilage induit une augmentation importante du pH autorisant la survie des STEC (Pedroso et al., 2010; Duniere et al., 2011).

d) Autres bactéries pathogènes ou d'altération

D'autres espèces microbiennes fréquemment retrouvées dans les ensilages, sont considérées comme pathogènes pour les animaux et les humains et doivent être recherchées dans l'environnement de la ferme afin de limiter les risques de contaminations. La tuberculose bovine est une maladie contagieuse débilitante causée par la bactérie *Mycobacterium bovis*. *M. bovis* n'est pas le principal agent responsable de la tuberculose humaine, qui est en fait due à *M. tuberculosis*, mais les humains sont sensibles à l'agent de la tuberculose bovine. Parmi les animaux domestiques, le bétail est le principal réservoir de *M. bovis*. Bien que la faune sauvage et les animaux domestiques n'entrent pas fréquemment en contact, la transmission de cet agent pathogène entre ces catégories d'animaux a été observée (Palmer, 2007). Des programmes d'éradication de la tuberculose bovine existent depuis 1917 aux États-Unis et se sont révélés très efficaces pour contrôler la maladie. Cependant, une résurgence des infections de tuberculose bovine a été observée depuis 1998, s'expliquant notamment par la présence du pathogène dans le réservoir de la faune sauvage (Okafor et al., 2011). Les pratiques d'élevage et de gestion agricole peuvent contribuer à l'accroissement du risque de contamination des troupeaux. Plus précisément, Reilly & Courtenay (2007) ont montré une augmentation du nombre de cas de tuberculose bovine dans les exploitations utilisant de l'ensilage de maïs, d'herbe ainsi que de la mélasse pour nourrir le bétail.

Grant et al. (1995) ont évalué la présence de *Yersinia enterocolitica* dans des ensilages sur une période de 20 mois : sur un total de 46 échantillons d'ensilage, 6,5 % étaient positifs et la présence de ce pathogène a été associée à un pH élevé de ces échantillons. Une infection à *Yersinia enterocolitica* provoque une yersiniose, maladie zoonotique affectant les êtres humains ainsi que d'un large éventail d'animaux comme les bovins, les cerfs, les porcs et les oiseaux (Centers for Disease Control and prevention, 2005). Les symptômes les plus courants sont de la fièvre, des douleurs abdominales et des diarrhées, souvent sanglantes.

La présence occasionnelle de *Campylobacter* sp., important pathogène alimentaire, dans des ensilages a également été rapportée (Nam et al., 2005). L'agence fédérale belge pour la sécurité

de la chaîne alimentaire a établi une liste de microorganismes pathogènes devant être recherchés chez les animaux avant l'abattage (AFSCA, 2009). Parmi eux, *Salmonella*, responsable de diarrhées sévères, est fréquemment retrouvée chez les bovins (Plym & Wierup, 2006). Cependant, aucune donnée n'est actuellement disponible pour évaluer la prévalence de ces pathogènes dans les ensilages.

e) Les bactéries productrices d'amines biogènes

Les amines biogènes sont issues de la décarboxylation des acides aminés par des enzymes de plusieurs espèces de bactéries lactiques comme *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* ou *Pediococcus* (Krížek, 1993), ainsi que d'autres espèces de nombreux genres bactériens potentiellement présents dans les ensilages comme *Clostridia*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas* (Silla Santos, 1996). Les amines biogènes principalement retrouvées dans l'ensilage sont la putrescine, la cadavérine et la tyramine et sont issues de la décarboxylation de l'arginine, la lysine et la tyrosine respectivement. D'autres amines biogènes telles que la tryptamine, l'histamine, la spermidine et la spermine peuvent être détectées à des niveaux inférieurs dans les ensilages. Elles sont produites par la décarboxylation du tryptophane, de l'histidine et de l'arginine. Les effets négatifs des amines biogènes sur la santé animale sont connus. Les symptômes peuvent aller de l'apparition d'un état de cétose (synthèse de corps cétoniques par le foie), à des dommages épithéliaux, des problèmes de circulation sanguine, une inhibition de la motilité du rumen et à une réduction de la dégradation de l'azote dans le rumen (Phuntsok et al., 1998). En plus d'une diminution de l'appétence de l'ensilage, les effets négatifs des amines biogènes conduisent à la réduction de la prise alimentaire ainsi qu'à une diminution de la production de lait (Clancy & Baumgardt, 1975; Clancy et al., 1977; Lingaas & Tveit, 1992). Toutefois, VanOs et al. (1997) ont observé que des moutons adaptés à un ensilage contenant un fort taux d'amines biogènes, ne montrent pas d'accumulation de celles-ci dans le rumen du fait de l'augmentation de la capacité des microorganismes du rumen à dégrader ces amines. La formation d'amines biogènes dans l'ensilage est influencée par plusieurs facteurs comme la température, la rapidité de la baisse du pH au cours de la phase initiale de la fermentation et la teneur en oxygène. Steidlová & Kalac (2002) ont déterminé les valeurs d'amines biogènes dans 51 échantillons d'ensilage de maïs. La composition en amines biogènes était de 145 mg / kg de tyramine, 136 mg / kg de putrescine, 96,2 mg / kg de cadavérine, 37,9 mg / kg de spermidine, 3 mg / kg d'histamine, de 2,8 mg / kg de spermine et 2,5 mg / kg de tryptamine. Cependant, les auteurs ont observé de grandes variations en fonction de l'année considérée.

4.2 Les eucaryotes

a) Les levures

Les levures sont des champignons micéliens anaérobies facultatifs. Il s'agit du plus important groupe de microorganismes impliqués dans la dégradation aérobie de l'ensilage, que ce soit pendant la phase aérobie ou pendant la phase de désilage (Driehuis & Oude Elferink, 2000). Un modèle mathématique de dégradation aérobie initiée par les levures dans les ensilages d'herbe et de maïs a notamment été élaboré et validé par Courtin & Spoelstra, (1990). L'activité amylasique des levures épiphytes retrouvées dans les ensilages permet à ces microorganismes de transformer les sucres solubles en alcools et en CO₂. Les levures sont acido-tolérantes et la réoxygénation de l'ensilage pendant la phase de désilage relance les voies de fermentation des acides organiques (acide succinique, les acides citrique ou lactique) induisant une hausse de pH. L'éthanol est connu pour être toxique pour le foie et les alcools en général peuvent altérer la qualité de l'ensilage et conduire à une diminution de la prise alimentaire des animaux (AFSSA, 2004). Initialement, la population de levure est très variée au sein de l'ensilage mais une évolution des populations a été observée au cours de la période de stockage menant à la prédominance de certains genres (Jonsson & Pahlow, 1984). Le genre *Candida* est le plus fréquemment retrouvé à l'intérieur ou à la périphérie des silos de maïs ou de graminées, mais d'autres genres tels que *Saccharomyces* ou *Hansenula* peuvent aussi être isolés au cours du stockage (Middlehoven & VanBaalen, 1988). Parmi les espèces de levures isolées d'ensilages de maïs, de luzerne ou encore de trèfle, les espèces assimilant le lactate telles que *Candida mesenterica*, *Candida apicola* et *Pichia fermentans* sont les plus fréquentes (Rossi & Dellaglio, 2007).

b) Les champignons et moisissures

Les champignons sont des microorganismes aérobies stricts. Bien qu'un ensilage correctement mené puisse être considéré comme une masse anaérobie de matière végétale, une soixantaine d'espèces de champignons a été isolée d'ensilages, en fonction des cultures utilisées, de la saison et de la température (AFSSA, 2004). La croissance fongique est généralement optimale à pH 5 et dans une gamme de température allant de 20°C à 35°C (Pommerville, 2011), ce qui correspond aux conditions observées dans l'ensilage. Les champignons pourraient être retrouvés dans les zones d'oxygénation telles que la périphérie du silo ou à proximité du front de désilage. Des changements de coloration de l'ensilage sont caractéristiques d'un développement fongique. Une étude brésilienne portant sur 195 échantillons d'ensilage de maïs a montré que *Fusarium* sp.

sont les moisissures les plus fréquemment retrouvées, suivies par *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichosporon* sp., et *Cladosporium* sp. (Orsi et al., 2000).

Les champignons produisent des métabolites secondaires et, notamment, des mycotoxines qui restent dans l'ensilage même après que le champignon producteur ait disparu. *Penicillium* (70 %), *Fusarium* (47 %) et *Aspergillus* (34 %) sont les champignons producteurs de mycotoxines les plus fréquemment isolés des ensilages de maïs (Roigé et al., 2009). *Fusarium* sp. est capable de produire plus de 20 mycotoxines, notamment du dioxynivalénol (DON), de la zéaralénone (ZEN) ou encore de la fumonisine (FB) (Niderkorn et al., 2007).

Au sein des ensilages, certaines espèces de champignons peuvent conduire à des détériorations ou des risques pour la santé des animaux. Parmi eux, *Byssoschlamys nivea* sécrète de la patuline, responsable de troubles de la fermentation ruminale. *Geotrichum candidum* et *Monascus purpureus* sont responsables de refus de prise alimentaire. Enfin, *Claviceps purpurea* produit des alcaloïdes impliqués dans des troubles digestifs, nerveux et de la reproduction (AFSSA, 2004). Les mycotoxines peuvent avoir des effets cancérigènes, mutagènes, neurotoxiques, hépatotoxiques, néphrotoxiques, œstrogènes, immunosuppresseurs, antimicrobiens (Scudamore & Livesey, 1998). Une exposition chronique à de faibles niveaux de mycotoxines induit généralement des symptômes non spécifiques tels qu'un affaiblissement du système immunitaire, une augmentation des infections ou des déséquilibres métaboliques et hormonaux (Morgavi & Riley, 2007). Les mycotoxines s'accumulent chez l'animal et leur passage dans des produits laitiers et la viande est un risque sanitaire potentiel pour les humains (Fink-Gremmels, 2008). Comparé à d'autres animaux, les ruminants sont moins sensibles aux mycotoxines en raison de la capacité de biotransformation de certains microorganismes du rumen. Par exemple, l'ochratoxine A produite par *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium verrucosum* est dégradée en α -ochratoxine, composé moins toxique lors du passage dans le rumen (EFSA, 2006). La fréquence et l'importance des mycotoxines dans les cultures fourragères et les ensilages ont été étudiées par Scudamore & Livesey (1998).

5. Stratégies de conservation de l'ensilage et limitation de l'impact économique et sanitaire

La dégradation de l'ensilage engendre de véritables problèmes économiques. L'ingestion par les animaux d'aliments mal conservés crée d'une part des troubles physiologiques, notamment un ralentissement de la prise de poids ou de la production laitière de l'animal, et d'autre part, une augmentation des coûts pour les agriculteurs qui doivent alors compléter l'alimentation de leurs animaux avec d'autres composés. Une évaluation correcte de l'impact économique de ce

problème est difficile à réaliser car de nombreux aspects sont à prendre en compte, notamment le coût des soins vétérinaires et médicaux, les pertes de matières premières et la baisse du rendement de la production.

La dégradation de l'ensilage entraîne des risques sanitaires, puisque celui-ci peut représenter un vecteur de transmission des agents pathogènes pour les animaux et les humains. Bien que les humains, les animaux et leurs pathogènes coexistent depuis des millénaires, des risques sanitaires ont émergé ces dernières années du fait de changements structurels rapides dans le secteur de l'élevage, d'un regroupement géographique des installations d'élevage intensif près des centres urbains et de mouvements d'animaux, de personnes et de pathogènes plus intenses entre les différents élevages. L'utilisation de plus en plus étendue de l'ensilage dans le monde, requiert une attention particulière afin d'assurer leur bonne qualité. Les principaux problèmes apparaissant au cours du processus d'ensilage sont dus à des défauts de qualité et de maturité de la matière végétale ensilée. La mise en place rapide de l'anaérobiose est nécessaire pour obtenir une forte acidification de l'ensilage et ainsi contrôler la contamination potentielle par des microorganismes pathogènes ou d'altération. En plus des Bonnes Pratiques d'Ensilage, des stratégies novatrices dans le processus de l'ensilage sont à envisager afin de limiter les risques économiques et sanitaires associés.

5.1. Les Bonnes Pratiques d'Ensilage (BPE)

a) Avant la mise en silo

Les BPE sont des actions intuitives et préventives tels que la limitation de l'infestation des cultures au champ par des moisissures ou encore le respect d'une période d'attente entre l'épandage de fumier ou de lisier et la récolte. En effet, un délai d'au moins quatre semaines doit être respecté entre l'épandage et la récolte afin de limiter la présence de bactéries butyriques dans l'ensilage (Adler & Lew, 1995; Johansson et al., 2005). Cette mesure préventive pourrait également être appliquée afin de limiter la présence d'autres agents pathogènes tels que *Listeria*, *Clostridium* ou *E. coli* (Rammer et al., 1994; Girardin et al., 2005; Rammer & Lingvall, 1997).

La moissonneuse doit être ajustée à une hauteur suffisante pour éviter d'incorporer du sol ou des saletés à la matière première destinée à être ensilée. Le sol diminue la qualité nutritionnelle des plantes ensilées, augmente leur pouvoir tampon ainsi que le risque d'incorporation de microorganismes telluriques. En outre, les parties inférieures des plantes sont généralement de plus faible qualité nutritive (AFSSA, 2004). La longueur des brins influence la conservation et la digestibilité de l'ensilage. Plus les particules sont petites, plus le compactage de l'ensilage est

facile et l'anaérobiose s'établit rapidement. Cependant, des particules trop courtes sont responsables de la production excessive d'effluents (Demarquilly et al., 1998). Elles impliquent également une perte des propriétés de rumination de l'ensilage nécessaires à la bonne digestibilité ce qui peut entraîner une acidose chez l'animal (Zebeli et al., 2009). La longueur de coupe optimale pour les graminées se situe entre 4 et 6 cm. Il est recommandé que l'ensilage de maïs destiné aux vaches laitières contienne moins de 1% de grosses particules (> 2 cm), de 8 à 12% de particules moyennes de 1 à 2 cm et moins de 50% de particules de très courte (< 6 mm) (LeGall & Chénais, 2005).

Le fait de récolter les cultures possédant des teneurs en matière sèche adéquates assure une fermentation correcte de l'ensilage et permet d'éviter une production d'effluents trop importante, induisant des pertes de glucides et d'additifs dans l'ensilage, ainsi qu'une forte pollution environnementale. Le Tableau 7 montre l'impact des conditions de croissance du maïs sur la qualité nutritionnelle de l'ensilage.

Tableau 7 : Valeurs nutritionnelles de l'ensilage de maïs en fonction des conditions de végétation, issus de INRA (2010).

Conditions de croissance	MS (%)	dMO (%)	N-tot (g/kg de MS)	CB (g/kg de MS)	NDF (g/kg de MS)	ADF (g/kg de MS)
Très bonnes	35	74	82	165	416	183
Mauvaises	24	68	105	226	495	248

*dMO : digestibilité de la Matière Organique de la MS *in vitro* ; N-tot : Azote total ; CB : Cellulose Brute ; NDF : Neutral Detergent Fiber ; ADF : Acid Detergent Fiber.

Des teneurs en azote total de plus de 100 g/kg de MS ou de fortes teneurs en azote ammoniacal (N-NH₃) sont des signes d'une protéolyse importante. Les teneurs en cellulose brute (CB) et fibres (NDF et ADF) influencent les fermentations ruminales et peuvent avoir un impact sur les performances des bovins et notamment sur leur gain de poids corporel. Les conditions de croissance et le choix de la période de récolte ont donc un impact important sur la qualité finale de l'ensilage.

Par ailleurs, si la teneur en MS est trop faible et le pouvoir tampon des plantes élevé, les microorganismes aérobies actifs au début de l'ensilage peuvent utiliser les sucres solubles et ainsi réduire la quantité d'hexoses et de pentoses disponibles ultérieurement pour les bactéries lactiques. L'acidification de l'ensilage sera alors retardée et des fermentations secondaires

pourront se produire. Notamment, les clostridies transforment l'acide lactique en acide butyrique acide qui est un acide plus faible ; induisant ainsi une augmentation du pH de l'ensilage et un risque de détérioration par d'autres microorganismes. En cas de récolte tardive, les plantes contiennent moins de sucres solubles et la valeur nutritive de la plante ensilée diminue (AFSSA, 2004; Ashbell & Weinberg, 2006). Dans certains cas (graminées et légumineuses essentiellement), il est recommandé de faire sécher brièvement la récolte au champ afin d'obtenir la teneur adéquate en MS (30-40% de MS) nécessaire à la fermentation et limitant la production d'effluents. En effet, le volume d'effluents produit peut varier considérablement selon la teneur en MS, le type de silo, le degré de consolidation, la longueur de hachage des brins, les éventuelles blessures des plantes et la présence d'additifs. Les effluents peuvent causer des problèmes environnementaux, notamment la pollution des sources d'eau, en raison de la valeur très élevée de leur demande biochimique en oxygène (DBO) (jusqu'à 50 000 mg d'O₂/l) (Weinberg & Ashbell, 2003). Par ailleurs, une concentration élevée en matière sèche (> 50 % de MS) dans les matières premières liée à une récolte tardive rend l'ensilage plus susceptible au développement des champignons producteurs de mycotoxines ayant eu la possibilité de s'implanter au champ (Purwin et al., 2006). L'ensilage sera aussi plus sujet à une élévation de température au début de la période de stockage.

b) Mise en silos et stockage

Le nettoyage des silos et des équipements agricoles doit être effectué avant le remplissage afin de réduire les possibilités de contamination par le sol ou l'incorporation de fumier. Le remplissage des silos doit se faire le plus rapidement possible afin d'exclure l'air de la masse ensilée et ainsi minimiser les pertes résultant de la respiration des plantes et de l'activité des microorganismes aérobies.

Une culture saine à l'ensilage doit pouvoir le rester depuis le remplissage du silo, jusqu'à la période de stockage et la distribution. Pour atteindre cet objectif, la contamination associée à l'introduction d'air dans l'ensilage doit être évitée. L'étanchéité des silos pendant de longues périodes se fait généralement grâce à des bâches en polyéthylène (Weinberg et al., 2011). Le film plastique doit pouvoir résister aux dommages physiques causés par les oiseaux ou les rongeurs. Il doit aussi être résistant aux UV, afin de supporter une exposition prolongée au soleil (Dickerson et al., 1991).

c) A l'ouverture

L'ensilage est une compétition entre des phénomènes aérobies et anaérobies. À l'ouverture du silo, l'air peut pénétrer la masse ensilée, ce qui déclenche des phénomènes de dégradation (McEniry et *al.*, 2010). Le volume du silo doit être déterminé selon les besoins alimentaires du troupeau (nombre de bêtes, importance des rations..), et les dimensions doivent être calculées pour permettre un avancement du front d'attaque du silo suffisamment rapide et qui minimise l'exposition quotidienne de l'ensilage à l'air. Une coupe nette du front d'attaque limite les phénomènes d'échauffement dans l'ensilage (AFSSA, 2004). L'élimination systématique des refus d'alimentation avant chaque nouvelle ration évite l'ingestion par les animaux d'ensilage altéré et les problèmes de santé qui en découlent.

Le respect de ces BPE permet d'obtenir une phase aérobie courte, une fermentation importante et une acidification rapide de la masse ensilée avec une prédominance des bactéries lactiques parmi la population microbienne durant la période de stockage. Ces conditions sont néfastes pour la croissance et la survie d'agents pathogènes et de divers microorganismes d'altération de l'ensilage. En effet, la plupart d'entre eux ne peuvent supporter les conditions environnementales caractéristiques d'un ensilage correctement mené.

5.2 Les agents d'ensilages

En plus de limiter les contaminations au moment de l'ensilage, d'autres possibilités existent pour prévenir la présence de pathogènes et la dégradation des ensilages. Le contrôle du processus d'acidification et la garantie de la stabilité aérobie de l'ensilage peuvent aussi être obtenus au travers de l'utilisation d'additifs dans l'ensilage.

Tout produit incorporé au moment de la confection du silo, susceptible d'agir favorablement sur le processus d'ensilage et ses conséquences telles que : l'acidification, la stabilité aérobie, la production d'effluents et la valeur alimentaire est considéré comme agent d'ensilage. Selon la liste des additifs d'ensilage approuvé par le ministère français de l'Agriculture en 2006 (Legarto, 2006a; Legarto, 2006c; Legarto, 2006b), ces agents d'ensilage peuvent être regroupés en trois catégories présentées dans les sections suivantes.

a) Les agents chimiques

Dans ce cas, l'acide ne sert pas de substrat pour permettre le développement des bactéries. Les différents agents chimiques d'ensilage pouvant être ajoutés agissent au niveau physico-chimique

uniquement en baissant le pH. Lorsque le pH passe en dessous de 6, le développement des bactéries lactiques est favorisé et une acidification rapide en résulte : le pH devient rapidement inférieur à 4 et bloque le développement des autres espèces tout en stabilisant l'ensilage. L'acide formique, très couramment utilisé sert de référence pour apprécier l'efficacité d'autres agents d'ensilage.

Les acides minéraux tels que les acides sulfurique et chlorhydrique ont d'abord été utilisés pour promouvoir l'acidification au sein de l'ensilage et limiter la croissance des microorganismes pathogènes. En raison de leur nocivité pour les agriculteurs et les animaux, les acides organiques les ont remplacés. Les agents chimiques inhibent le développement des bactéries indésirables, mais n'inhibent pas la fermentation lactique. En effet, les bactéries lactiques sont moins sensibles aux acides organiques (Selwet, 2004). Il a été montré que l'acide formique améliore la stabilité aérobie des ensilages de blé, de sorgho et de maïs en favorisant la fermentation hétérolactique caractérisée par des concentrations en acide acétique et acide propionique élevées (Kung & Ranjit, 2001). Il a été prouvé que les acides lactique, acétique et formique inhibaient la croissance de *Listeria monocytogenes* et des entérobactéries (Ostling & Lindgren, 1993). Plus précisément, O'Kiely et al. (2001) ont testé l'efficacité d'une solution d'acide formique à 85 % à 3 ml/kg d'ensilage d'herbe inoculé avec 10^4 UFC/g de *E. coli* O157:H7. L'ensilage a été conservé à 15°C pendant 180 jours. Dans ces conditions, l'acide formique augmente de manière significative le taux de mortalité des STEC. Par ailleurs, l'acide formique est considéré comme un traitement efficace contre la production d'amines biogènes dans les ensilages d'herbe et de luzerne (VanOs et al., 1997; Jambor, 2000; Steidlová & Kalac, 2004). Les acides autorisés en France sont : l'acide formique, le formaldéhyde, l'acide sulfurique, l'acide phosphorique, l'acide propionique, l'ammoniaque et le formiate d'ammonium (Interbev, 2005).

Le formol est une solution de formaldéhyde à 35%, efficace dans la conservation de l'ensilage d'herbe. Toutefois, il est considéré comme toxique pour les utilisateurs et a pour effet de réduire la stabilité aérobie et la digestibilité de l'ensilage. Le formol peut donc être utilisé uniquement à faible concentration, en combinaison avec l'acide formique (AFSSA, 2004). Il existe des agents d'ensilage contenant des acides partiellement neutralisés sous forme de sels (nitrites, sulfates) et associés à des conservateurs à base de formol. Il a été prouvé que la dégradation aérobie de l'ensilage était plus lente pour des céréales traitées avec additifs contenant un mélange de formiate d'ammonium, de propionate, de benzoate d'éthyle et de benzoate (Adesogan et al., 2003). Le nitrite de sodium en combinaison avec l'hexamine empêche de manière efficace la croissance des clostridies. La croissance des levures est, de même, limitée en présence de benzoate de sodium (Knicky & Lingvall, 2001). L'utilisation de formiate de calcium, de benzoate de sodium et de nitrite de sodium aboutit également à une meilleure qualité des ensilages de

maïs et réduit considérablement la concentration totale en zéaralénone, déoxynivalénol, ochratoxines et fumonisines (Biro *et al.*, 2009).

b) Les agents enzymatiques et microbiologiques

Les agents enzymatiques augmentant la disponibilité des sucres solubles

Les sucres font partie des agents d'ensilage, c'est à dire qu'ils sont susceptibles d'influencer favorablement le processus d'ensilage, l'acidification, la stabilité aérobie, la valeur alimentaire... L'ajout de substrats sucrés favorise la croissance des bactéries lactiques et le pH de stabilité de l'ensilage sera atteint plus rapidement. Les cultures telles que la luzerne contiennent peu de sucres solubles (< 11-12 % de MS). La fermentation lactique peut être compromise et un ajout de sucres au travers de la mélasse ou du lactosérum est parfois nécessaire. Cette supplémentation en sucres est souvent accompagnée d'une inoculation de bactéries lactiques afin d'assurer le succès des processus fermentaires. La mélasse apporte 0,5 kg de sucres par kilogramme de MS et le lactosérum 0,75 kg de sucres par kilogramme de MS (AFSSA, 2004). Le coût de cette opération peut parfois être élevé, c'est pourquoi l'ajout de sucres reste peu employé dans les ensilages. Par ailleurs, aucune étude n'a été réalisée pour connaître l'effet d'un ajout de sucre sur la survie et la croissance des STEC dans les ensilages.

L'incorporation de céréales dans les ensilages d'herbe pour obtenir des glucides solubles supplémentaires a été étudiée par l'apport de céréales sous la forme de grains germés ou de grains broyés en présence d'amylase. Ce procédé n'a pas permis d'améliorer la qualité de conservation dans la mesure où l'hydrolyse de l'amidon est insuffisante et lente ce qui ne permet pas d'augmenter la vitesse d'acidification de l'ensilage (AFSSA, 2004). Pour éviter les inconvénients liés à un apport extérieur de sucres, des recherches ont été effectuées en utilisant des enzymes cellulolytiques (cellulases) susceptibles de dégrader une partie de la cellulose et des hémicelluloses des plantes en sucres simples utilisables pour les ferments lactiques. Les complexes enzymatiques purifiés (pour éviter des effets protéolytiques sur la plante) sont en général associés aux agents microbiologiques d'ensilage. Dans les ensilages, les conditions de pH et surtout de température ne sont pas très favorables pour obtenir une activité importante des enzymes, et leur coût élevé limite les quantités utilisables.

Les enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques telle que la cellulase peuvent être employées pour convertir la cellulose et les hémicelluloses en sucres fermentescibles afin d'améliorer la fermentation lactique (Zhang *et al.*, 2010). Un produit multi-enzymatique a notamment été employé avec succès pour limiter les teneurs en amines biogènes de l'ensilage de luzerne (Jambor, 2000). Différentes approches sont également employées pour hydrolyser la cellulose

(acide sulfurique, produits alcalins...) et il a été prouvé que le nitrate de fer ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$) est un catalyseur efficace pour l'hydrolyse de l'hémicellulose dans des ensilages de maïs (Sun et al., 2011).

Les agents microbiologiques

L'ajout d'inoculants bactériens est destiné à assurer une accumulation plus rapide des acides organiques pendant la période d'ensilage. Le principal acide organique produit par ces agents d'ensilage ou les bactéries lactiques épiphytes est l'acide lactique, responsable de la forte diminution de pH. La plupart des inoculants disponibles dans le commerce sont des bactéries lactiques homofermentaires car elles produisent rapidement et efficacement de grandes quantités d'acide lactique. L'agent d'ensilage homofermentaire le plus courant est *Lactobacillus plantarum*. D'autres espèces de *Lactobacillus* ou de *Pediococcus* peuvent être employées et *Enterococcus faecium* est aussi fréquemment utilisé (Nkosi et al., 2010; Li & Nishino, 2011).

Filya et al. (2004) ont montré qu'en cas d'anaérobiose insuffisante, l'acide lactique pouvait être utilisé par les levures, entraînant la dégradation de l'ensilage. La fermentation hétérolactique est donc préférée afin d'améliorer la stabilité aérobie lors du désilage. Il a été montré dans de nombreuses études que l'ajout de la bactérie lactique hétérofermentaire *Lactobacillus buchneri* augmentait la stabilité aérobie et réduisait les pertes dues à une mauvaise conservation (Adesogan et al., 2003; Filya et al., 2006; Kleinschmit & Kung, 2006a; Kleinschmit & Kung, 2006b; Nkosi et al., 2009). Ceci s'explique par des concentrations plus fortes en acide acétique, acide propionique et acides aminés libres (Filya & Sucu, 2007), par la production de substances antimicrobiennes telles que le 1-propanol (Driehuis et al., 1999), le 1,2-propanediol (Hu et al., 2009; Schmidt & Kung, 2010), l'acétate de propyle et le 2-butanol (Holzer et al., 2003). Une diminution de la teneur en sucres solubles est observée (Keles & Demirci, 2011) et un plus grand nombre de bactéries lactiques sont dénombrées dans les ensilages supplémentés en *L. buchneri* (Kung et al., 2007). Proportionnellement, la concentration d'acide lactique est diminuée. Tous ces changements conduisent à une diminution du pH (Arriola et al., 2011) et à une inhibition de la croissance et la survie des levures et des moisissures (Filya et al., 2006). Ces études ont été faites sur plusieurs types d'ensilages : maïs, blé, sorgho, d'herbe et d'ensilage d'orge.

Des inoculants bactériens autres que *Lactobacillus buchneri* ont aussi été étudiés pour leur capacité à limiter la dégradation des ensilages, comme indiqué dans le Tableau 8. Il est connu que, en plus des acides organiques, les inoculants produisent également des substances pouvant avoir un potentiel antimicrobien: H_2O_2 , éthanol, diacétyle, exopolysaccharides (Keenan & Bills, 1968; Fuller & Gibson, 1997; Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilán, 2005) ou des peptides antibactériens tels que des bactériocines (Klaenhammer, 1988). Toutefois, des bactériocines purifiées ne sont pas utilisées dans la préservation de l'ensilage en raison de leur effet limité

dans cet environnement complexe (diffusion limitée ou dégradation enzymatique par des protéases).

Tableau 8 : Effet des différents inoculants bactériens étudiés pour améliorer la conservation de l'ensilage, excepté *Lactobacillus buchneri* seul*.

Inoculants bactériens testés	Effet sur la préservation de l'ensilage	Effets physico-chimiques et microbiologiques	Référence
Cocktail de <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> et <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Améliore la stabilité aérobie et limite les pertes de matière sèche.	Forte diminution de pH. Augmentation de la concentration en acide lactique. Diminution de la concentration en acide butyrique. Réduction de la protéolyse des plantes.	Jatkauskas & Vrotniakiene (2009)
Cocktail de <i>Lactobacillus buchneri</i> et <i>Lactobacillus plantarum</i>		Augmentation de la concentration en acide acétique. Inhibition de la croissance des levures. Forte diminution de pH.	Filya (2003); Reich & Kung (2010)
Cocktail de <i>Pediococcus cerevisiae</i> et <i>Propionibacterium acidipropionici</i>		Ralentissement de la hausse de température à l'ouverture.	Higginbotham et al. (1998)
Cocktail de <i>Pediococcus pentosaceus</i> et <i>Lactobacillus buchneri</i>	Améliore la stabilité aérobie.	Augmentation de la concentration en acide acétique.	Kleinschmit & Kung (2006a); Schmidt & Kung (2010); Reich & Kung (2010)
Cocktail de <i>Lactobacillus buchneri</i> et <i>Pediococcus acidilactici</i>		Augmentation des concentrations en acide acétique et 1-2,propanediol.	Reich & Kung (2010)
Cocktail de <i>E. hirae</i> et <i>L. casei</i> ou <i>L. plantarum</i>		Forte diminution de pH. Diminution de la concentration en acide butyrique.	Cai (1999)
Cocktail de <i>L. plantarum</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , et enzymes	Diminue les pertes de matière sèche.	Forte diminution de pH. Augmentation de la concentration en acide lactique.	Kung & Ranjit (2001)
<i>Propionibacterium Acidipropionici</i>	Améliore la stabilité aérobie.	Inhibition du développement des levures. Ralentissement de la hausse de température à l'ouverture.	Higginbotham et al. (1998); Filya et al. (2004);

		Augmentation des concentrations en acides acétique et propionique. Diminution de la production de CO ₂ .	Filya & Sucu (2007)
<i>Enterococcus faecium</i>	Limite l'établissement de microorganismes pathogènes.	Nombre de bactéries lactiques augmente. Réduction du nombre de <i>E. coli</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , staphylocoques et bactéries du genre <i>Bacillus</i> . Réduction du nombre de <i>Listeria</i> et de moisissures. Diminution du pH. Augmentation de la concentration en acide lactique. Diminution de la concentration en acide acétique.	Marcinakova et al. (2008)
<i>Lactobacillus</i> sp, <i>Enterococcus</i> sp. et <i>Streptococcus</i> sp.	Limitation de la concentration en mycotoxines.	Biotransformation de la zéaralenone en α -zéaralenol. Adsorption du déoxynivalénol, de la zéaralenone et de la fumonisine.	Niderkorn et al. (2007)
<i>Lactobacillus plantarum</i> seul ou en cocktail avec <i>Lactobacillus casei</i> , <i>E. faecium</i> et <i>P. pentosaceus</i>	Diminue la concentration en amines biogènes.	Diminution des concentrations en tyramine, cadavérine, putrescine.	Steidlová & Kalac (2004); Steidlová & Kalac (2003)

*Les études portant sur *Lactobacillus buchneri* seul ont été discutées précédemment dans le texte.

De nombreux auteurs ont étudié l'effet d'inoculants bactériens sur la formation d'amines biogènes dans les ensilages. Il a été prouvé que *Lactobacillus casei* diminuait significativement la concentration en amines biogènes dans les ensilages de festulolium, de maïs et dans des rations mixtes alors que l'effet protecteur de *Lactobacillus buchneri* peut varier en fonction du matériel végétal utilisé (Nishino et al., 2007). L'identification de bactéries lactiques capables de neutraliser des fusariotoxines par la formation de complexes stables entre ces toxines et des cellules de bactéries lactiques ont été réalisées dans des infusions de maïs par Niderkorn et al., (2006). Jard et al. (2011) ont recensé les informations concernant l'élimination de mycotoxines par les microorganismes par adsorption ou biotransformation.

Contrairement aux levures et champignons, peu d'études se sont intéressées à l'effet des inoculants bactériens sur l'inhibition des pathogènes tels que *Listeria* (Gouet et al., 1977; Irvin, 1969) ou *Clostridium* (Tabacco et al., 2009).

Concernant les *E. coli*, ces bactéries ne sont plus détectées dans les ensilages lorsque le pH descend en dessous de 5. En général, *E. coli* persiste plus longtemps dans l'ensilage de blé car le pH décroît plus lentement (Chen et al., 2005). Bach et al. (2002) ont testé l'effet de *Pediococcus pentosaceus* et *Propionibacterium jensenii* ou de *E. coli* non pathogènes sur des souches de *E. coli* O157:H7 dans l'ensilage d'orge en mini-silos. Les pathogènes disparaissent dans tous les ensilages, mais la disparition est accélérée par l'ajout d'inoculants dans les silos qui présentent alors des taux de bactéries lactiques et de lactate plus élevés et un pH plus faible (Bach et al., 2002) Pedroso et al., 2010 et Duniere et al., 2011 ont montré que les agents d'ensilage tels que *Lactobacillus buchneri* ou *Enterococcus faecium* empêcheraient la croissance de *E. coli* O157:H7 ou *E. coli* O26 à l'ouverture des silos de maïs.

L'ajout de ferments semble donc être une solution efficace pour limiter la survie des STEC dans l'ensilage, toutefois, les BPE restent encore le principal moyen pour lutter contre la croissance et la survie de tout agent pathogène au sein de l'ensilage.

Il faut noter que l'ensilage en conditions de laboratoire diffère des ensilages grandeur nature de par le degré de tassement, les échanges gazeux ainsi que les propriétés de transfert de chaleur. Tout ceci peut affecter la survie et la croissance des pathogènes. Par conséquent, les résultats d'études en laboratoire doivent être confirmés par des tests en conditions réelles.

Points clés :

- L'ensilage est une méthode de conservation des récoltes garantissant une disponibilité alimentaire tout au long de l'année pour le bétail.
- Le processus d'ensilage est basé sur une fermentation lactique anaérobie permettant la préservation des propriétés nutritives et de la qualité sanitaire des récoltes.
- Des microorganismes d'altération peuvent être présents dans les ensilages, induisant la dégradation de celui-ci et des pertes économiques importantes.
- L'ensilage peut aussi être vecteur de microorganismes pathogènes. La sécurité sanitaire est un objectif primordial pour limiter les maladies animales et leur possible transmission à l'homme, essentiellement *via* une contamination de la chaîne alimentaire.
- Des méthodes chimiques, enzymatiques ou microbiologiques destinées à orienter l'évolution des communautés microbiennes au sein des ensilages existent mais doivent être développées davantage.
- Le respect des BPE ainsi que l'utilisation des différentes catégories d'additifs permettent donc une bonne fermentation et une conservation optimale de l'ensilage, maintenant la haute valeur nutritive de cet aliment.

6. Valorisation

Les informations présentées dans ce chapitre ont fait l'objet d'une revue soumise au journal scientifique à comité de lecture international « *Animal Feed Science and Technology* » (Voir Annexe1) :

« Silage processing and strategies to limit degradation due to undesirable microorganisms ».

Lysiane Dunière, Julien Sindou, Frédérique Chaucheyras-Durand, Isabelle Chevallier, et
Delphine Thévenot.

Conclusion du mémoire bibliographique

En conclusion de ce mémoire bibliographique, il apparaît assez nettement que les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines sont des bactéries pathogènes de l'homme dont le cycle épidémiologique est soumis à de nombreux flux qui peuvent aboutir à des contaminations humaines et entretenir le portage asymptomatique au sein du réservoir animal.

Les bactéries lactiques, quant à elles, sont très utilisées en tant qu'agent technologique de fermentation ainsi que dans des stratégies de bio-protection des aliments, des animaux ou encore de l'homme. Celles-ci ont fait preuve d'un potentiel inhibiteur de nombreux microorganismes et notamment des STEC.

L'ensilage est un écosystème dans lequel les bactéries lactiques sont classiquement retrouvées et pouvant représenter un vecteur de transmission des STEC au réservoir animal.

Actuellement, aucune donnée n'est disponible concernant la prévalence et la dissémination des STEC dans les ensilages. Bien que l'application de mesures d'hygiène et de Bonnes Pratiques d'Ensilage permette de limiter la propagation de la bactérie dans l'environnement de l'élevage, une approche multi-barrières utilisant le potentiel inhibiteur des bactéries lactiques pourrait être envisagée. Cependant, peu d'informations sont actuellement connues concernant l'écologie des STEC dans cet environnement, ainsi que leur devenir en présence d'agents de bio-protection. Notamment, les informations concernant les sérogroupes de STEC non-O157 restent sporadiques et incomplètes.

Le travail expérimental réalisé et présenté ci-dessous avait donc pour objectif d'apporter des réponses à cette problématique. Il s'agissait plus particulièrement :

- D'identifier des bactéries lactiques inhibitrices de la croissance de souches de STEC appartenant à divers sérogroupes et d'étudier plus précisément le mécanisme d'inhibition mis en œuvre. Les résultats obtenus devaient ainsi permettre de sélectionner des souches de bactéries lactiques à fort potentiel inhibiteur envers un large panel de STEC.
- De déterminer le devenir des STEC, d'une part dans de l'ensilage de maïs non inoculé, et d'autre part, en présence des diverses bactéries lactiques sélectionnées pour leur potentiel inhibiteur. Les résultats obtenus devaient permettre d'évaluer le comportement des souches de STEC à différentes étapes de la réalisation d'un ensilage ainsi que d'identifier des souches de bactéries lactiques bio-protectrices *in situ*.

MEMOIRE EXPERIMENTAL

Chapitre 4 : Etude *in vitro*

Identification et étude de bactéries lactiques inhibitrices des STEC

Les travaux présentés dans ce chapitre répondent au premier objectif du projet de thèse à savoir, sélectionner des bactéries lactiques inhibitrices de la croissance de différents sérogroupes de STEC, ainsi que d'étudier plus précisément le phénomène d'inhibition observé.

1. Matériel et méthodes

1.1 Matériel

a) Bactéries lactiques :

Au total, 268 bactéries lactiques appartenant à différents genres ont été testées pour leur capacité à inhiber la croissance des STEC *in vitro* (Tableau 9). Vingt-cinq souches sont issues de la collection Lallemand (Lallemand SAS, Blagnac, France). Elles peuvent être utilisées en tant que ferments dans différents types de fabrications (ensilages, probiotiques...). Les 243 autres souches testées proviennent de la collection de l'Unité de Recherche CALITYSS (VetAgro Sup, Lempdes, France) et la plupart ont été isolées d'atelier de fabrication de saucissons secs.

Pour leur conservation, toutes les souches ont été stockées à -80°C dans 30% de glycérol.

Tableau 9 : Genre, nombre et collection d'origine des souches de bactéries lactiques utilisées

Genre	Nombre	Collection
<i>Enterococcus</i>	81	Lallemand /CALITYSS
<i>Lactobacillus</i>	85	Lallemand / CALITYSS
<i>Lactococcus</i>	3	CALITYSS
<i>Leuconostoc</i>	3	Lallemand / CALITYSS
<i>Pediococcus</i>	3	Lallemand / CALITYSS
<i>Propionibacterium</i>	1	Lallemand
<i>Vagococcus</i>	8	CALITYSS
Non Déterminé	84	CALITYSS

Certaines souches issues de la collection CALITYSS n'avaient pas été identifiées lors de leur isolement et leur identification n'a pas été envisagée lors de ce travail de thèse dans la mesure où les souches concernées ne présentaient pas de potentiel inhibiteur intéressant.

b) Souches de STEC :

La totalité des souches de STEC testées sont issues du Laboratoire d'études des Microorganismes Alimentaires Pathogènes (VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France), Laboratoire National de Référence des *E. coli*. Les souches ont été conservées en cryobilles (Technical services, CL, UK) et stockées à -80°C.

Caractérisation des profils de virulence des souches de STEC

Les profils de virulence de ces souches ont été caractérisés par PCR. A partir de la collection de référence, une cryobille de chaque souche a étéensemencée sur gélose PCA (bioMérieux, France) et incubée à 37°C pendant 18 à 24 h. Une extraction d'ADN a été réalisée de la manière suivante : une colonie de chaque isolat a été ressuspendue dans 250 µl d'eau Ultra Pure (laboratoire Aguetan, France), chauffée à 95°C pendant 15 minutes puis centrifugée (15700 × g pendant 3 minutes). Les lysats ainsi préparés ont été testés par réaction PCR pour la présence des gènes de virulence indiqués dans le Tableau 10 selon les conditions de dénaturation, d'hybridation et d'élongation décrites dans les articles indiqués en référence. La taille des amplicons obtenus a été évaluée après migration par électrophorèse d'un gel d'agarose à 2% (Eurogentec, France) contenant 5 % de bromure d'ethidium (BET) dans un tampon TAE 1X

(Sigma-Aldrich, Germany) en utilisant le marqueur de taille de 19 à 1114 pb (Molecular Marker VIII, Roche, Germany) et comparée avec la taille de l'amplicon attendue. Certaines réactions de PCR ciblant la présence des antigènes flagellaires H₂, H₈ et H₂₈ ont été réalisées en PCR en temps réel (RT-PCR) selon le protocole décrit par Madic et *al.* (2010).

Tableau 10 : Cible, gènes et références des réactions PCR utilisées pour la caractérisation.

Cible	Gène	Référence
Sérotype O157:H7	<i>uidA</i>	Cebula et <i>al.</i> (1995)
Antigène somatique O26	<i>wzx</i>	DebRoy et <i>al.</i> (2004)
Antigène somatique O103	<i>rlmB</i>	Fratamico et <i>al.</i> (2005)
Antigène somatique O111	<i>rfb</i>	Paton & Paton (1998)
Antigène somatique O145	<i>wck</i>	Feng et <i>al.</i> (2005)
Antigène flagellaire H11	<i>fliC_{H11}</i>	Durso et <i>al.</i> (2005)
Antigène flagellaire H2	<i>fliC_{H2}</i>	Madic et <i>al.</i> (2010)*
Antigène flagellaire H8	<i>fliC_{H8}</i>	Madic et <i>al.</i> (2010)*
Antigène flagellaire H28	<i>fliC_{H28}</i>	Madic et <i>al.</i> (2010)*
Intimine	<i>eae</i>	China et <i>al.</i> (1999)
Shiga-toxine 1	<i>stx1</i>	Paton & Paton (1998)
Shiga-toxine 2	<i>stx2</i>	Paton & Paton (1998)
Variants des Shiga-toxines	<i>stxc</i>	Monday et <i>al.</i> (2007)

* Les réactions de PCR ont été réalisées selon le protocole de Madic et *al.* (2010) en PCR en temps réel (RT-PCR).

Trente-six souches de STEC ont été testées. Les souches ont été choisies selon leur appartenance aux 5 sérogroupes de EHEC majeurs définis par l'AFSSA : O157, O26, O103, O111 et O145 (AFSSA, 2010). De plus, des origines et des profils de virulence différents ont été sélectionnés au sein de ces sérogroupes afin d'obtenir un panel de souches de STEC le plus complet possible (Tableau 11).

Tableau 11 : Caractéristiques des souches STEC utilisées

Etape du criblage	Souche	Sérotype	Origine	Facteur de virulence			
				<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stxc</i>
2	ENV181	O157:H7	E	+	-	+	+
2	6352	O157:H7	E	+	-	-	+
2	B26	O157:H7	E	+	-	+	+
2	B183	O157:H7	E	+	-	+	+
2	LS33	O157:H7	F	+	+	+	+
2	LS29	O157:H7	F	+	+	+	+
2	76.6	O157:H7	F	+	+	+	+
2	R33.9	O157:H7	F	+	-	+	+
2	05117C	O157:H7	V	+	-	+	+
2	LS240	O157:H7	V	+	-	+	+
1	435	O157:H7	V	+	+	+	+
1	MK4124-2b	O157:H7	V	+	-	+	+
2	114.2	O26:H11	E	+	-	-	-
2	5380.1	O26:H11	From	+	-	-	-
2	4198.1	O26:H-	From	+	-	-	-
2	119.1	O26:H11	E	+	-	-	-
2	116.1	O26:H11	E	+	-	-	-
2	10d	O26:H11	From	+	+	-	+
1	51.2	O26:H11	From	+	+	-	+
2	LA302224.01	O26:H11	L	+	-	+	+
1	60.1	O26:H11	L	+	-	-	-
2	MAC42.4	O26:H11	L	+	+	-	+
2	118.1	O26:H11	E	+	-	-	-
2	B08	O26:H-	L	+	+	+	+
2	2056.1	O103:H2	L	-	-	-	-
1	1.1.1	O103:H-	L	-	-	-	-
2	E08.1	O103:H2	NR	+	+	-	+
2	B07.1	O103:H-	NR	+	-	+	+
2	54159.1	O111:H8	From	+	-	-	+
2	A07.1	O111:H-	NR	+	-	-	-
2	C08.1	O111:H-	NR	+	+	+	+

1	O111.08	O111:H-	NR	+	+	+	+
2	A08.1	O145:H-	NR	+	+	-	+
2	E07.1	O145:H28	NR	+	+	-	+
1	O145.07	O145:H-	NR	+	+	-	+
2	4811.1	O145:H-	From	+	-	-	-

E: Environnement ; F: Fèces ; V : Viande ; From : Fromage ; L : Lait ; NR : Non Référencée. Étape du criblage indique dans quelle partie du test sur gélose du potentiel inhibiteur des bactéries lactiques ces souches de STEC ont été utilisées.

Caractérisation de l'acido-résistance des souches de STEC :

La capacité des souches à utiliser le système de résistance à l'acidité *via* la décarboxylation de l'acide aminé glutamate a été testée selon le protocole de Takada et *al.*, (2007). Brièvement, les souches ont étéensemencées dans 10 ml de milieu M9 supplémenté par 0,4 % de glucose (Fluka, Germany) et incubées à 37°C pendant 22 à 24 h. Le milieu M9 est constitué de 3 g de KH₂PO₄ (Merck, Germany), 13,6 g de Na₂HPO₄ (Merck, Germany), 0,5 g de NaCl (Sigma-Aldrich, Germany), 0,25 g de MgSO₄ (Merck, Germany), 0,5 g de NH₄Cl (Merck, Germany), 0,0147 g de CaCl₂ (Merck, Germany) qsp 1l d'eau distillée. La souche de *E. coli* O157:H7 EDL933 et une souche de *Klebsiella pneumoniae* ont été utilisées respectivement comme témoins positif et négatif. Deux millilitres de chaque culture ont été centrifugés (15700 × g pendant 10 minutes) et le culot a été resuspendu avec 2 ml de solution NaCl à 0,9 %. Une deuxième étape de centrifugation à 15700 × g a été effectuée pendant 5 minutes et le culot a été resuspendu dans 2 ml de NaCl à 0,9%. Cette suspension a ensuite été ajustée à 10¹⁰ UFC/ml par la solution de NaCl à 0,9% au moyen d'un densimat (bioMérieux, France) soit DO_{600nm} = 3. Un millilitre de cette suspension a été ajoutée à 1 ml de solution GAD et incubée à 35°C au bain marie. Le milieu GAD est constitué de 0.05 g de vert de bromocrésol (Alfa Aesar, Germany), 90 g de NaCl, 3 ml de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Germany), 1 g d'acide L-glutamique (Sigma-Aldrich, Germany), qsp 1l d'eau distillée. Le pH de cette solution a été ajusté à 3,4. La lecture a été faite à l'œil nu après 1, 2 et 4 h d'incubation. L'activité de l'enzyme glutamate décarboxylase se matérialise par un virage de la couleur de la solution du jaune au bleu. Des réactions intermédiaires comme un virage du jaune au vert traduisent l'activité d'un seul des 2 gènes (*gadA* ou *gadB*) entraînant une expression enzymatique réduite de moitié.

Etude de la proximité génétique des souches

Une étude génomique des 36 souches de STEC a été réalisée afin d'évaluer leur proximité génétique. Pour cela, deux approches complémentaires ont été appliquées. L'analyse par PFGE est considérée comme une des méthodes de référence pour le typage de bactéries pathogènes car cette technique est basée sur l'analyse du génome entier (Miko *et al.*, 2010). L'analyse par MLVA est très discriminante et peut être employée pour identifier les relations génétiques entre différentes souches (Lindstedt *et al.*, 2007; Miko *et al.*, 2010).

Pulsotypage des souches

Le protocole suivi pour réaliser le pulsotypage des souches de STEC est adapté du protocole PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) du Center for Disease Control pour *E. coli* O157:H7 (Ribot *et al.*, 2006). Cette méthode de macro-restriction permet de séparer des fragments d'ADN de très grande taille, de 30 à 2000kb (Schwartz *et al.*, 1983). Le principe est le suivant : les cellules bactériennes sont lysées puis l'ADN est enrobé dans de l'agarose pour le protéger avant de subir une étape de digestion par une enzyme de restriction à sites de coupure rares. Une électrophorèse en champs pulsés est mise en œuvre sur les fragments d'ADN obtenus et la polarité du courant est modifiée à intervalles réguliers afin de séparer des fragments de grande taille. Chaque souche est ainsi caractérisée par un profil PFGE constituant une carte d'identité génétique. La PFGE est considérée comme la méthode de référence pour le typage moléculaire de nombreux pathogènes.

Le protocole utilisé pour la réalisation des inserts est similaire à celui de Ribot *et al.*, (2006) avec l'enzyme de restriction *Xba*I (Roche, Germany). Quelques modifications mineures ont été apportées à ce protocole : le milieu de croissance utilisé pour les STEC était la gélose TSA (Trypticase Soy Agar, bioMérieux, France) et la composition du milieu de suspension des colonies a été légèrement modifiée (Cell Suspension Buffer : 100 mM Tris (Sigma-Aldrich, Germany), 100 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Germany) [pH 8.0]).

Des standards de taille moléculaire (Lambda ladders, ProMega-Markers, USA) ont été placés en première et dernière positions sur chaque gel. Des inserts des souches séquencées Sakai (*E. coli* O157:H7) et 11368 (*E. coli* O26) ont été placés sur la deuxième et l'avant dernière position de chaque gel pour s'affranchir des variations liées à l'expérimentation. Les conditions d'électrophorèse décrites dans le protocole ont été appliquées sur l'appareil CHEF DR-III system (Bio-Rad laboratories, USA). Après la migration et passage dans un bain de BET, les profils ont pu être observés sous ultra violets et l'acquisition d'une image a été réalisée avec le logiciel Vision-Capt (Vilber Lourmat, Germany).

Les différents pulsotypes ont été analysés à l'aide du logiciel GelCompar II version 6.5 (Applied-Maths, Belgium) en utilisant un coefficient de Dice de 1,5% de tolérance pour la similarité et le paramètre UPGMA (un-weighted pair group method with arithmetic mean) pour générer des dendrogrammes.

Etude par Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA)

L'analyse MLVA ou Multi-Locus VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) Analysis, est l'étude par PCR de plusieurs VNTR. Les VNTR sont des séquences répétées en tandem. Pour un VNTR donné, positionné en un locus donné sur le génome, le nombre N des répétitions dont il se compose, constitue un allèle. Deux individus différents peuvent, pour une même séquence répétée, posséder un nombre N différent correspondant donc à deux allèles distincts. Afin d'augmenter la probabilité de distinguer deux souches proches, plusieurs locus associés correspondant à plusieurs séquences VNTR sont analysés en parallèle (MultiLocus VNTR Analysis). Un fluorochrome différent est utilisé pour chaque locus et une électrophorèse capillaire permet d'évaluer la taille de l'amplicon (liée au nombre N) auquel un numéro d'allèle est attribué. Les profils MLVA des souches étudiées sont ensuite analysés.

Le protocole de Lindstedt et *al.* (2007) établi pour typer différents sérogroupes de *E. coli* et utilisant l'analyse de 7 VNTR différents, a été suivi pour cette étude. L'extraction d'ADN des souches de STEC a été réalisée de la même manière que pour la caractérisation des souches (voir 1.1.c). Les réactions de PCR ont été mises en œuvre selon le protocole de Lindstedt et *al.* (2007), en utilisant le kit QUIAGEN PCR-multiplex pour les loci CVN003, CVN014 (PCR 1) d'une part, et pour les loci CVN001, CVN004, CVN007 et CVN015 (PCR 2) d'autre part. La réaction de PCR des loci CVN002 (PCR 3) a été réalisée en simplex en utilisant le kit PCR Takara Taq (Takara, Japan). Après amplification, les échantillons à analyser ont été reconstitués dans un microtube comme indiqué dans le protocole (20 µl de la PCR1, 3,5 µl de la PCR 2, 10 µl de la PCR 3 qsp 100µl d'eau RNase/DNase free), puis envoyés à Biofidal® (Lyon, France) pour migration en électrophorèse capillaire sur l'appareil ABI3730 XL (Applied Biosystem, USA). Le standard de taille 600Liz (GeneScan, Applied Biosystem, USA) a été utilisé. En fonction de la taille et de la couleur associées aux fragments amplifiés des numéros d'allèles ont été attribués en se référant à la publication Lindstedt et *al.* (2007). L'allèle numéro 0 a été assigné aux amplicons non détectés.

Les dendrogrammes ont ensuite été construits avec le logiciel BioNumerics v3.5 (Applied-Maths, Belgium) en utilisant le coefficient Categorical et l'algorithme de Ward.

c) Milieu de croissance :

Bactéries lactiques

Les milieux utilisés pour la croissance des bactéries lactiques sont le bouillon MRS (Biokar diagnostics, France) ainsi que les géloses MRS (BD Difco, USA). Ce milieu est spécifiquement adapté à la croissance des lactobacilles et permet la croissance des bactéries lactiques en général (de Man et *al.* 1960). A partir de la collection de référence, 20 µl de chaque culture de bactéries lactiques ont été ensemencés sur gélose MRS et incubés à 30°C pendant 24 ou 48 h afin de vérifier la pureté de l'isolat. Plusieurs colonies issues d'une culture pure ont été ensemencées dans du bouillon MRS et incubées à 30°C pendant 24 à 48 h. Cette étape de croissance a été réalisée avant chacune des expérimentations décrites ci-après dans le point 1.2.

STEC

Les milieux utilisés pour la croissance des souches de STEC sont le bouillon BHI (Oxoid, UK) et les géloses PCA (bioMérieux, France). Les milieux servant à l'isolement et la détection des souches de STEC sont la gélose chromogène ColiID (bioMérieux, France). L'incubation des souches de STEC se fait à 37°C pendant 24 h pour les différents milieux utilisés. A partir de la collection de référence, une cryobille de chaque souche de STEC a été ensemencée sur gélose PCA. Plusieurs colonies d'une culture pure ont ensuite été ensemencées dans 9 ml de bouillon BHI et incubées. Cette étape de croissance a été réalisée avant chacune des expérimentations décrites ci-après dans le point 0.

Optimisation d'un milieu pour la croissance simultanée des deux microorganismes

Pour permettre la croissance simultanée des deux types de microorganismes, un milieu spécifique a dû être développé. Ce milieu est composé à 50 % (v/v) de milieu MRS et BHI. Plus précisément, de l'agarose (Vitro agar, Kalys, France) a été ajoutée pour obtenir une concentration finale de 7,5 g/l. La composition finale du milieu MRS/BHI est de 35,5 g/l de MRS agar, 18,5 g/l de bouillon BHI et 3,5 g/l de Vitro agar qsp 1 l d'eau déminéralisée. Pour des cultures en bouillon, le même protocole de fabrication a été suivi sans ajout d'agarose et en utilisant du milieu MRS bouillon en remplacement du milieu MRS agar.

1.2 Méthodes

a) Criblage sur gélose du potentiel inhibiteur des bactéries lactiques

L'activité inhibitrice des souches de bactéries lactiques a été testée d'après le protocole modifié de Tagg & McGiven (1971). Les cultures de STEC et de bactéries lactiques ont été respectivement

ajustées à des concentrations de 10^4 et 10^7 UFC/ml à l'aide d'un densimat et par dilutions successives au $1/10^{\text{ème}}$ dans une solution de TS (Tryptone sel, bioMérieux, France). Chaque culture de STEC a été coulée en masse à une concentration finale de 10^3 UFC/ml dans 20 ml de gélose MRS/BHI en surfusion mélangée manuellement. Une fois la gélose prise en masse, 10 μ l de chaque culture de bactéries lactiques ont été déposés sous forme d'une goutte à la surface de la gélose. Après que les gouttes aient séché, les géloses ont été incubées à 30°C pendant 48 h. Elles ont ensuite été examinées pour la production de halo d'inhibition autour des colonies de bactéries lactiques. La largeur la plus faible de la zone traduisant une absence de développement de la souche de STEC a été mesurée. Chaque test a été réalisé en triplicata et une souche lactique a été considérée comme inhibitrice lorsque la zone d'inhibition était de 2 mm au minimum autour de la colonie, pour chacune des 3 répétitions. Ce critère de 2 mm a été choisi pour sélectionner une vingtaine de bactéries lactiques.

Afin de limiter le nombre de tests, le criblage a été réalisé en 2 étapes : une première étape a permis de tester les 268 bactéries lactiques envers seulement 7 souches de STEC. Ces souches de STEC ont été choisies aléatoirement parmi les 5 sérogroupes (O157, O26, O103, O111 et O145). Elles correspondent à l'étape de criblage numéro 1 dans le Tableau 11. Les bactéries lactiques considérées comme inhibitrices (23 souches) ont ensuite été testées envers les 29 autres souches de STEC (correspondant à l'étape de criblage numéro 2 dans le Tableau 11) afin de confirmer leur inhibition envers un panel plus large de STEC.

b) Exploitation statistique des résultats du criblage

Les résultats du criblage sont exprimés en largeur du halo d'inhibition (mm) des 36 souches de STEC testées en triplicata avec les souches lactiques sélectionnées dans la première partie du criblage. Les souches de STEC sont caractérisées par deux facteurs fixes : leur séro groupe (5 modalités) et leur origine (6 modalités : Environnement, Fèces, Fromage, Lait, Viande ou Non référencée). Afin de tester l'impact que ces 2 facteurs fixes peuvent avoir sur la taille du halo d'inhibition, un modèle linéaire croisé mixte avec répétitions a été ajusté aux données, en prenant en compte ces 2 facteurs fixes ainsi que 2 facteurs aléatoires croisés : les souches de STEC (36 modalités) et les souches de bactéries lactiques sélectionnées (23 modalités). Un test-F pour évaluer la significativité de chaque facteur fixe ainsi que l'ajustement du modèle ont été réalisés avec le package lme4 du logiciel R (Bates, 2010). Les facteurs « souches » sont considérés comme aléatoires car les bactéries ont été échantillonnées au hasard parmi des populations de bactéries lactiques et de STEC.

c) Identification des produits responsables de l'inhibition

La production de composés antimicrobiens a été évaluée chez les 6 souches de bactéries lactiques sélectionnées pour leur potentiel inhibiteur envers les souches de STEC testées. Cette identification des mécanismes d'inhibition a été réalisée en présence de 9 STEC : A08, C08, E08, 76.6, 6352, 10d, 116.1, 60.1 et 435. Le protocole décrit par Yaakoubi et *al.* (2009) permet de mettre en évidence la production d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène ainsi que de certains peptides antimicrobiens. Ce protocole se base sur un arbre décisionnel présenté Figure 17. Pour déterminer si les souches de bactéries lactiques sont inhibitrices des souches STEC considérées, le surnageant de la culture lactique a été neutralisé pour éliminer successivement l'action de différents facteurs et permettre d'identifier les produits responsables de l'inhibition.

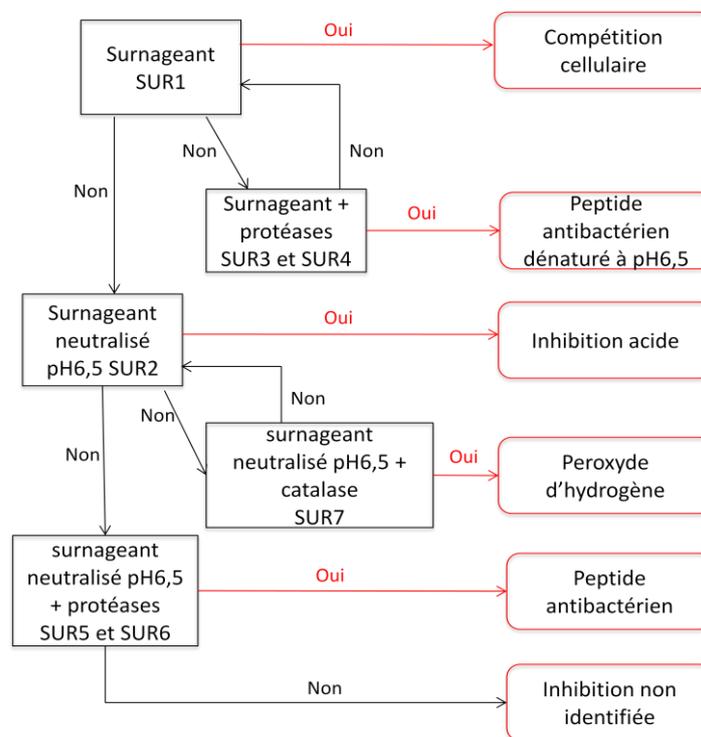


Figure 17 : Arbre décisionnel des modalités d'identification des produits responsables de l'inhibition portant sur la question de la croissance des STEC, (« oui » traduisant une croissance des STEC et « non » une absence de croissance) d'après Yaakoubi et *al.* (2009).

Plus précisément, les cultures de STEC ont été ajustées au moyen d'un densimat $DO_{600nm}=0,8$ et diluées dans du TS pour atteindre une concentration finale de 10^3 UFC/ml. Le surnageant de chacune des cultures de bactéries lactiques a été obtenu et stérilisé par filtrations successives à l'aide d'un filtre de $0,45 \mu m$ puis $0,2 \mu m$ (SUR1) (Minisart, Sartorius Stedim Biotech, Germany). Une aliquote de ce surnageant a été neutralisée par ajout de soude NaOH 1N (SUR2). Une aliquote de chaque surnageant SUR1 et SUR2 a été soumise séparément à la digestion

enzymatique par 3 protéases différentes : la trypsine (EC 3.4.21.4), l' α -chymotrypsine (EC 3.4.21.1) et la pepsine (EC 3.4.23.1) (Sigma-Aldrich, Germany) ; ces protéases étant les plus généralement utilisées pour étudier la sensibilité des bactériocines et confirmer leur nature protéique (Benkerroum et *al.*, 2000). Pour chaque protéase une solution mère de 2 mg/ml a été préparée dans une solution tampon appropriée : la trypsine et l' α -chymotrypsine ont été dissoutes dans une même solution tampon de phosphate (0,1 M, pH 6), et la pepsine a été dissoute dans une solution de HCl (0,02 M, pH 2). Les 2 solutions de protéases ont été mélangées indépendamment à un volume égal de surnageant SUR1 ou SUR2 et incubée à 37°C pendant 3 h (SUR3 et SUR4 issus de la digestion de SUR1 ; et SUR5 et SUR6 issus de la digestion de SUR2). Enfin, 127 μ l d'une solution aqueuse de catalase (C100, Sigma-Aldrich Chemie, Allemagne) ont été ajoutés à 500 μ l de SUR2 pour obtenir une concentration finale de 25 mg/ml (SUR7). Le mélange a été gardé à température ambiante pendant 20 min pour éliminer l'effet du peroxyde d'hydrogène. Un volume de 160 μ l de culture de STEC a été distribué dans une microplaque de 96 puits (CellStar, Greiner bio-One), puis un volume de 40 μ l de surnageant traité (SUR1, SUR2, SUR3, SUR4, SUR5 ou SUR6) y a été ajouté. Des témoins négatifs (milieu MRS/BHI en présence de surnageant traité) ainsi que des témoins positifs (culture de STEC en présence de MRS/BHI traité) ont été réalisés dans le même temps. Les puits en bordure de plaque n'ont pas été utilisés afin d'éviter les effets de bords. Les plaques ont ensuite été incubées à 30°C pendant 48 h et des lectures de densité optique à 600 nm ont été réalisées à 0, 8, 24, 32 et 48 h sur le lecteur de microplaque Opsys MR (ThermoLab systems).

d) Dosage de la production d'acide lactique et d'acide acétique

Les dosages d'acide acétique et d'acide D- et L-lactique ont été effectués pour les 6 souches considérées comme inhibitrices d'après le criblage grâce à des kits enzymatiques (R-Biopharm, Germany) et une lecture spectrophotométrique à 340 nm. Les cultures de bactéries lactiques ont été placées dans un bain-marie à 80°C pendant 15 minutes afin de stopper les éventuelles réactions enzymatiques. Le surnageant de chaque culture a été dilué au 1/10 dans une solution de TS et les dosages ont été réalisés conformément au protocole fourni par le fabricant. Les concentrations d'acides ont été exprimées en acide lactique total et acide acétique (en g/l).

e) Cinétique d'inhibition

La cinétique d'inhibition de 9 souches de STEC a été évaluée en présence de la bactérie lactique la plus inhibitrice 6A1MLb4. Il s'agit des mêmes souches de STEC employées pour identifier les produits responsables de l'inhibition : A08, C08, E08, 76.6, 6352, 10d, 116.1, 60.1 et 435. Les

cultures de STEC ont été ajustées à 10^8 UFC/ml au moyen du densimat soit $DO_{600nm}=0,8$ puis diluées avec une solution de TS. La même démarche a été suivie pour la culture de bactérie lactique. Chaque souche de STEC a ensuite été co-inoculée avec la souche de bactérie lactique dans 50 ml de bouillon MRS/BHI à des concentrations finales respectives de 10^1 et 10^4 UFC/ml. Des cultures pures de STEC et de la souche de bactérie lactique ont été réalisées en parallèle.

Le dénombrement des STEC ou des bactéries lactiques a été effectué à 0, 4, 6, 8, 10, 24, 30, 34 et 48 h après inoculation, et le nombre de bactéries lactiques et de STEC viables a été déterminé par dépôt de 100 μ l de bouillon par l'ensemencement spiral (WASP Spiral plating, AES Laboratory, France) sur gélose MRS et Coli ID. Les géloses Coli ID servant au dénombrement des STEC ont été incubées à 37°C pendant 24 h, et les géloses MRS pour le dénombrement des bactéries lactiques ont été incubées à 30°C pendant 24 à 48 h. Les colonies obtenues ont été dénombrées à l'aide d'un compteur automatique de colonies EC2 easy count 2 (AES Laboratory, France).

f) Modélisation des cinétiques d'inhibition lors des co-inoculations

A titre de rappel, 9 souches de STEC ont été co-inoculées avec la souche lactique 6A1MLb4, correspondant à 9 cinétiques de croissance simultanée. En parallèle, des cultures pures de STEC et de bactéries lactiques ont été réalisées pour chaque souche soit un total de 10 cinétiques en tant que témoins positifs. Un modèle global (Modèle 1) a été utilisé pour décrire la croissance simultanée des bactéries lactiques et des STEC pour chacune des 9 co-inoculations (Équation 2).

$$\left\{ \begin{array}{l} y_{LAB}(t) = \begin{cases} y_{0, LAB} + \frac{\mu_{max, LAB}}{\ln(10)} \times t & \text{pour } t < t_{max} \\ y_{0, LAB} + \frac{\mu_{max, LAB}}{\ln(10)} \times t_{max} & \text{pour } t \geq t_{max} \end{cases} \\ y_{STEC}(t) = \begin{cases} y_{0, STEC} + \frac{\mu_{max, STEC}}{\ln(10)} \times t & \text{pour } t < t_{max} \\ y_{0, STEC} + \frac{\mu_{max, STEC}}{\ln(10)} \times t_{max} - \frac{b}{\ln(10)} \times (t - t_{max}) & \text{pour } t \geq t_{max} \end{cases} \end{array} \right.$$

Équation 2 : Modèle 1 avec $y_{LAB}(t)$ et $y_{STEC}(t)$ la densité de population en bactéries lactiques et en STEC respectivement (\log_{10} UFC/ml) au temps t (h) ; $y_{0, LAB}$ et $y_{0, STEC}$ la densité de population initiale en bactéries lactiques et en STEC respectivement ; $\mu_{max, LAB}$ et $\mu_{max, STEC}$ le taux de croissance maximal (h^{-1}) pour les souches de bactérie lactique et de STEC respectivement, b le coefficient de destruction (h^{-1}) et t_{max} le temps auquel la croissance des 2 populations de STEC et de bactéries lactiques s'arrête.

Ce modèle traduit une croissance exponentielle de chaque souche, marquant un arrêt au même moment pour chacune des 2 populations dès que la souche majoritaire (ici la souche de bactérie lactique) atteint la phase stationnaire. Afin de décrire la tendance observée dans certaines de nos cinétiques, un déclin exponentiel de la population de STEC après le temps t_{\max} a été ajouté au modèle de base. Un cas particulier peut être défini à partir du Modèle 1 sans prendre en compte le phénomène de déclin, en fixant le coefficient b à 0. Ce modèle simplifié a été nommé Modèle 2. Pour chaque co-inoculation, les deux modèles ont été ajustés aux données en utilisant un modèle de régression non linéaire grâce au package nls du logiciel R. Les ajustements des 2 modèles testés ont été comparés par un test F (Bates & Watts, 2007).

2. Résultats

2.1 Caractérisation des souches de STEC :

La plupart des souches de STEC sélectionnées possèdent le gene *eae* codant pour l'intimine. Toutes les souches appartenant au sérotype O157:H7 ont la capacité de produire des Shiga-toxines par l'intermédiaire des gènes *stx1*, *stx2* ou d'un de leurs variants (Tableau 11). Les souches de *E. coli* O26 présentent plus fréquemment le gène *stx1* que le gène *stx2*, cependant 7 des 12 souches de ce sérotype ne possèdent aucun des gènes codant pour la production de Shiga-toxines. Les souches appartenant aux sérogroupes O103, O111 et O145 sont au nombre de 12 et possèdent le gène *eae* hormis 2 souches. Le gène *stx1* a été détecté plus fréquemment que le gène *stx2*, respectivement chez 6 et 3 souches de STEC. Enfin, une souche (54159.1) possède un variant des gènes *stx*. Quatre de ces souches ne possèdent aucun gène codant pour la production de Shiga-toxines.

Les résultats de l'analyse de résistance à l'acidité ont montré que toutes les souches de *E. coli* O157:H7 avaient la capacité d'utiliser le système d'acido-résistance *via* la glutamate décarboxylase (Tableau 14). Une seule des souches appartenant au sérotype O26 n'a pu utiliser le système de résistance à l'acidité glutamate-dépendant. Parmi les 12 souches de *E. coli* appartenant aux 3 autres sérogroupes testés, 5 ont démontré une activité de la glutamate décarboxylase leur permettant de résister à l'acidité.

2.2 Etude de la proximité génétique des souches

a) Pulsotypage des souches :

Au total, 36 souches de STEC ont été pulsotypées. Deux souches se sont avérées non typables du fait d'autolyse de leur ADN malgré plusieurs essais ($n = 3$). Les souches de *E. coli* O157:H7 Sakai et *E. coli* O26 11368 sont des souches séquencées et ont été incluses dans notre étude pour servir de référence. Au total, 31 profils différents caractérisés par au moins 3 bandes de différences ont été observés. Ces 31 profils ont pu être rassemblés en 7 groupes. Un dendrogramme a été construit pour la totalité des souches de STEC étudiées. Les groupes de souches observées sont identifiés par une accolade sur le côté de la Figure 18 et indiqués dans le Tableau 14. Le pourcentage de similarité des souches est indiqué en haut à gauche de la figure.

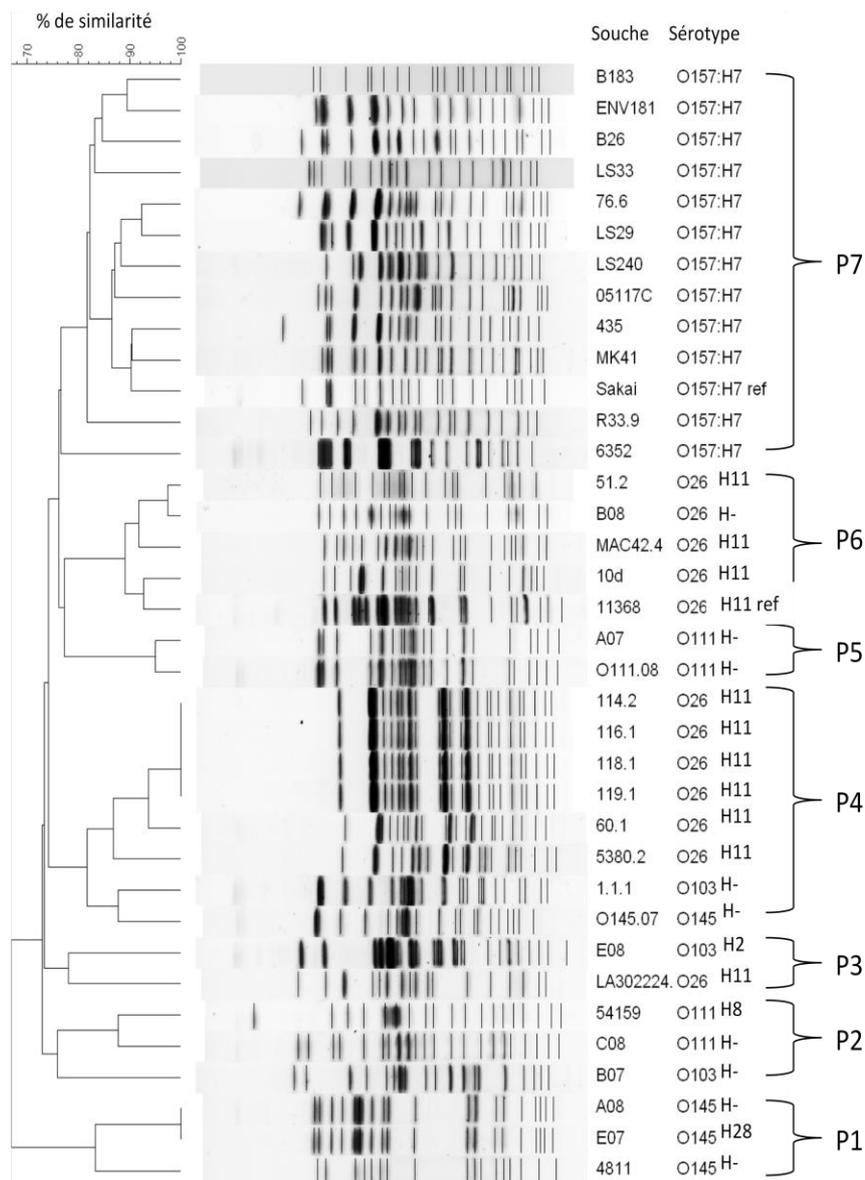


Figure 18 : Dendrogramme des profils de champs pulsés des souches de STEC obtenus avec l'enzyme *Xba*I en utilisant un coefficient de Dice de 1,5% et la méthode UPGMA.

Des groupes de souches de STEC ont pu être identifiés en fonction de leur proximité génétique par la technique du PFGE. Ils sont nommés de P1 à P7, en commençant par le groupe présentant le degré de similarité le plus bas avec les autres souches de STEC étudiées. Le groupe P1 est constitué de 3 souches de *E. coli* O145, dont 2 sont considérées comme des clones, bien qu'elles ne présentent pas exactement les mêmes caractéristiques (O145:H- et O145:H28). Le groupe P2 comprend 2 souches appartenant au sérotype O111 proches à 88 % et une souche de *E. coli* O103:H- présentant seulement 75 % de proximité génétique. Les 2 autres souches appartenant au sérotype O111 ont été assignées au groupe P5 (95 % de similarité). Les souches de *E. coli* O26 ont été rassemblées majoritairement dans 2 groupes : P4 présentant 82 % de similarité et le groupe P6 présentant 90 % de similarité. Cependant le groupe P4 comprend également 2

souches d'autres sérogroupes : O103 et O145. Le groupe P3 rassemble 2 souches de sérotype différents, présentant un pourcentage de similarité de moins de 80 %. Enfin, toutes les souches de *E. coli* O157:H7 ont été assignées au groupe P7. Ce groupe montre une proximité génétique forte avec plus de 82% de similarité entre les souches, excepté pour la souche 6352 qui se distingue avec seulement 76% de similarité. Les souches Sakai de *E. coli* O157:H7 et 11368 de *E. coli* O26:H11 ont été regroupées avec des souches des mêmes sérotypes avec de forts degrés de similarité (plus de 90 %).

b) Etude par MLVA

Les souches de *E. coli* O157:H7 Sakai et *E. coli* O26 11368 ont aussi été ajoutées à cette étude en tant que souches de référence et un total de 38 souches de STEC a donc été analysé. Au total, 28 profils, différant d'au moins un allèle, ont été observés et les souches ont été assignées à 5 groupes. Le dendrogramme obtenu pour la totalité des souches de STEC est présenté Figure 19. Les différents groupes de souches de STEC sont indiqués par une accolade sur le côté et sont indiqués dans le Tableau 14. Les numéros d'allèles correspondant aux différents VNTRs étudiés sont indiqués dans les colonnes CVN001 à CVN015.

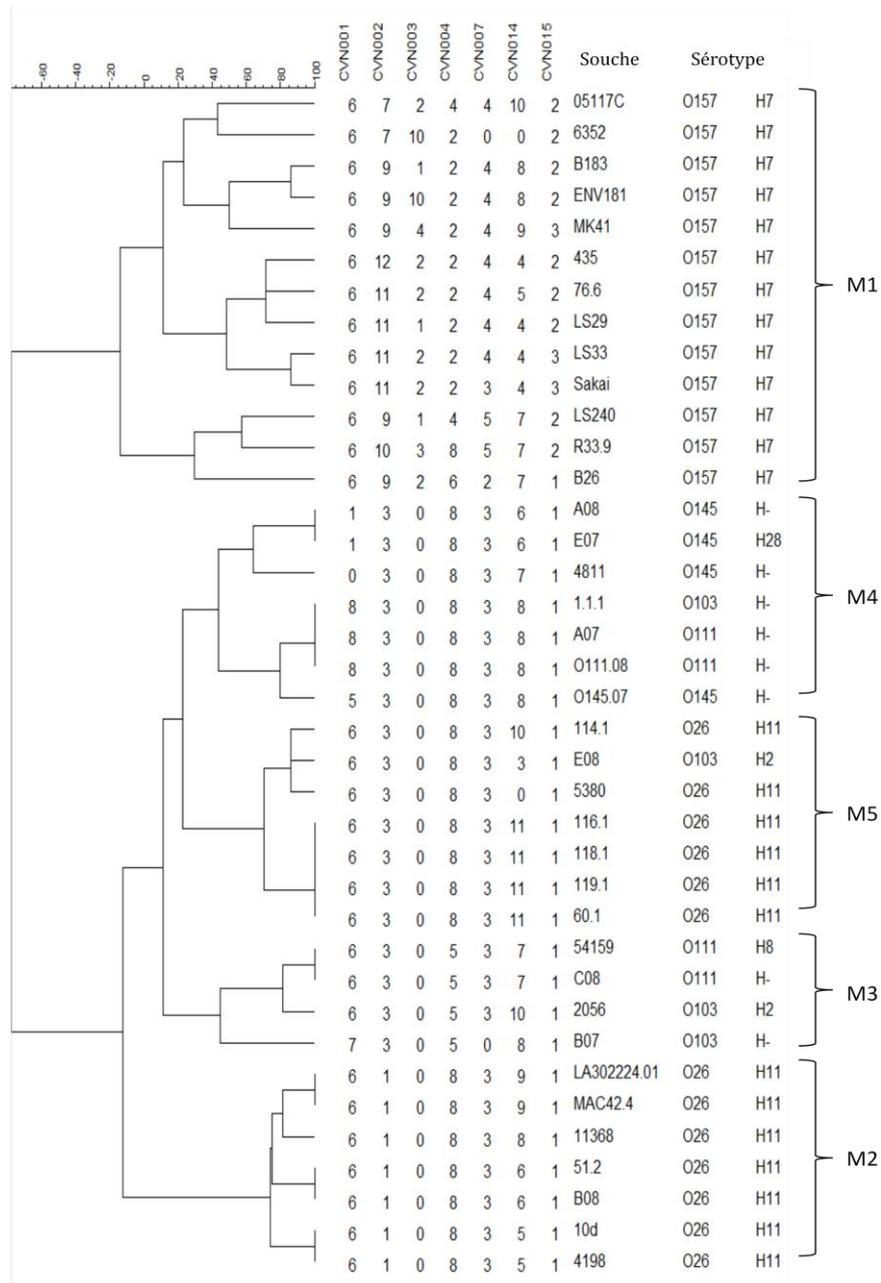


Figure 19 : Dendrogrammes des profils MLVA des souches de STEC obtenus en utilisant le coefficient Categorical et l'algorithme de Ward.

La variabilité la plus importante a été observée sur le locus CVN014 chez toutes les souches de STEC testées. Le locus CVN003 n'est jamais amplifié chez les STEC non-O157 et une grande variabilité d'allèles a été observée chez les souches de *E. coli* O157:H7. D'après l'analyse en MLVA, ces souches O157:H7 ont été classées dans un seul groupe : le groupe M1. Les souches de *E. coli* O26 ont pu être classées en 2 groupes distincts : M2 et M5. Il est à noter que ce groupe inclut également une souche de *E. coli* O103 (E08). Les groupes auxquels ont été assignées les souches STEC appartenant aux autres sérogroupes, sont les groupes M3 et M4.

2.3 Criblage sur gélose du potentiel inhibiteur des bactéries lactiques

a) Première étape du criblage

La première partie du criblage a permis d'étudier la capacité inhibitrice des 268 bactéries lactiques envers 7 souches de STEC assignées à l'étape de criblage 1 dans le Tableau 11. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 20. Les zones d'inhibition observées dans cette première partie du criblage se situaient entre 0 et 10 mm de large. Cependant, 75 % des valeurs observées se situent entre 0 et 3 mm.

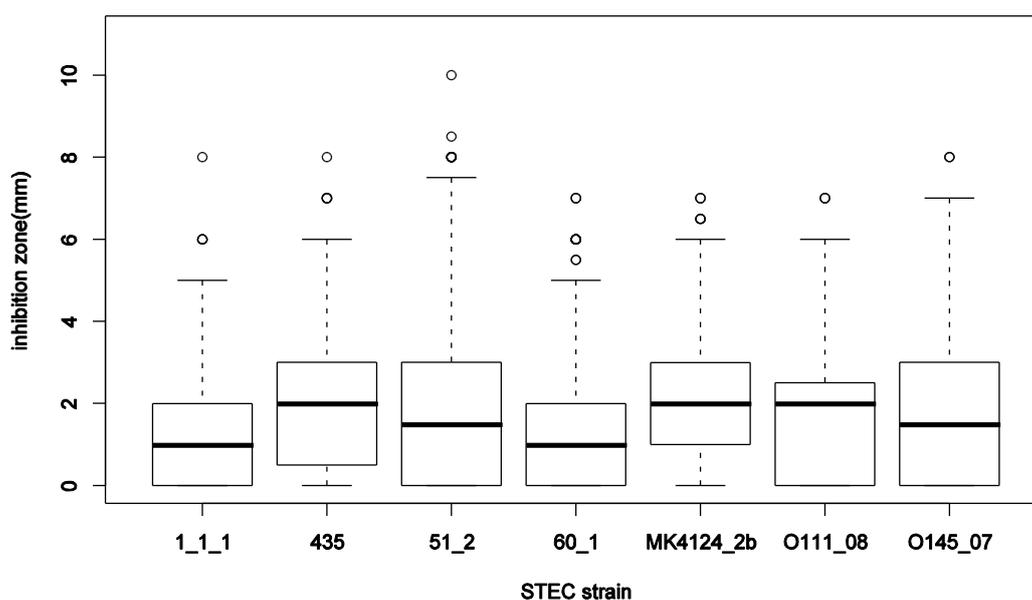


Figure 20 : Boîte à moustaches représentant la taille des zones d'inhibition (mm) observées lors du criblage des 268 bactéries lactiques envers 7 souches de STEC en triplicata.

Le rectangle représente 50 % des valeurs obtenues, la médiane est représentée par un trait en gras à l'intérieur de ce rectangle, et l'écart entre les extrémités des moustaches englobe 90 % des valeurs observées. Enfin, les valeurs extrêmes sont identifiées par des points à l'extérieur de la boîte à moustache.

Parmi ces 268 bactéries lactiques, 23 d'entre elles se sont révélées totalement inefficaces pour inhiber la croissance des STEC testées car elles n'ont pas présenté de halo d'inhibition dans les conditions de l'étude. Deux cent vingt deux bactéries lactiques ont montré une inhibition trop faible pour au moins une des 7 souches de STEC testées (caractérisée par au moins un halo < 2 mm). Enfin, pour 23 des bactéries lactiques testées, une zone d'inhibition d'au moins 2 mm a pu être observée pour chacune des 3 répétitions contre les 7 souches de STEC (Tableau 12). Ces 23 souches appartenant à différents genres ont donc été sélectionnées pour être testées envers un nombre plus important de souches de STEC afin de confirmer leur potentiel inhibiteur.

Tableau 12 : Identification du genre ou de l'espèce des 23 souches considérées comme inhibitrices des 7 STEC testées dans la première partie du criblage.

Genre	Espèce	Souche	Zone d'inhibition moyenne (mm)
<i>Enterococcus</i>	NI	11A1FLb21	6,81 (± 3,39)
		19	4,69 (± 3,04)
		2F244	3,72 (± 1,75)
		2F243	4,15 (± 2,36)
	<i>E. faecium</i>	17v	7,93 (± 2,67)
		FA62	3,26 (± 1,97)
<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>Lc garvieae</i>	M15L	7,31 (± 3,19)
<i>Lactobacillus</i>	NI	FA18	5,43 (± 3,23)
		FB32b	4,63 (± 3,03)
	<i>L. sakei</i>	FB32	6,25 (± 3,59)
		M16.4T	5,56 (± 2,69)
		FA54	4,29 (± 2,23)
		FA21a	5,69 (± 3,76)
		FB34b	3,86 (± 3,51)
		FA50a	2,58 (± 2,25)
		FA58b	4,68 (± 2,42)
		FA47	3,38 (± 2,06)
		FB29	3,92 (± 2,97)
		FA46	3,88 (± 3,61)
		FA61	1,43 (± 2,07)
Lbsakei	4,26 (± 2,06)		
<i>Leuconostoc</i>	<i>Ln mesenteroides</i>	6A1MLb4	9,18 (± 4,59)
<i>Propionibacterium</i>	NI	R0410	5,81 (± 3,36)

NI : Non identifiée, la détermination de l'espèce n'a pu se faire avec un pourcentage d'identification suffisant par les méthodes employées (séquençage de l'ARNr 16S et galerie API).

b) Deuxième étape du criblage

Les 23 bactéries lactiques sélectionnées ont été ensuite testées de la même manière envers 29 autres souches de STEC. La Figure 21 montre les valeurs d'inhibition obtenues en fonction du sérotype et de l'origine des souches de STEC. A titre indicatif, les effectifs n'étaient pas

similaires entre les sérogroupes : O157:H7 (12), O26 (12), O103 (4), O111 (4) et O145 (4) ; ni entre les origines : Environnement (8), Fèces (4), Fromage (6), Lait (6), Viande (4) et Non Référencée (8).

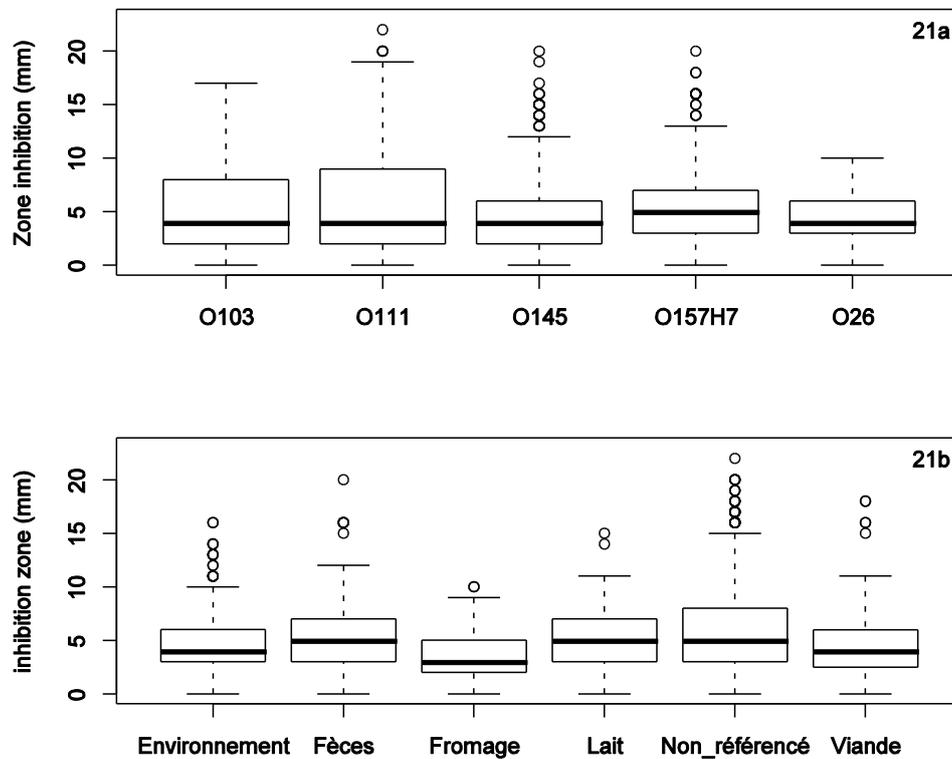


Figure 21 : Boîte à moustaches représentant la taille des zones d'inhibition (mm) observées lors du criblage des 23 bactéries lactiques envers 36 souches de STEC en fonction de leur séro-groupe (21a) ou de leur origine (21b) en triplicata.

Bien que quelques valeurs extrêmes soient observées dans certains groupes, peu de différences ont pu être relevées (Figure 21). Il ne semble pas y avoir d'influence de l'origine ni des sérogroupes des souches de STEC testées sur la taille de la zone d'inhibition.

Cette deuxième partie de criblage a permis de sélectionner 6 bactéries lactiques inhibitrices de la totalité des souches de STEC testées (Figure 22).

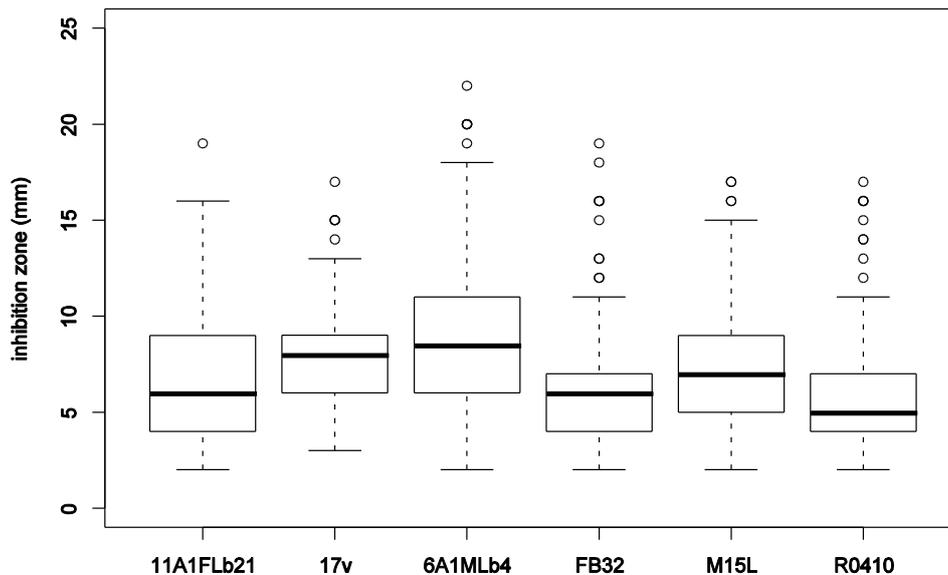


Figure 22 : Boîte à moustaches de la taille des zones d'inhibition (mm) observées lors du criblage des 6 bactéries lactiques envers 36 souches de STEC en triplicata.

Ces 6 bactéries lactiques ont montré des halos d'inhibition de 2 mm au minimum autour des colonies pour chaque triplicata. Ces souches appartiennent à 5 genres différents : *Enterococcus* (11A1FLb21 et 17v), *Lactobacillus* (FB32), *Lactococcus* (M15L), *Leuconostoc* (6A1MLb4) et *Propionibacterium* (R0410). La moitié des valeurs d'inhibition observées avec la souche 6A1MLb4 est supérieure à 8 mm. Les résultats obtenus ont montré que dans les conditions testées, cette souche de *Leuconostoc mesenteroides* est la souche la plus inhibitrice (Figure 22).

c) Exploitation statistique des résultats de criblage

Une analyse de variances (ANOVA) portant sur les données obtenues a montré que les 2 facteurs aléatoires (« souches de STEC » et « souches de bactéries lactiques ») ont un effet significatif sur la taille du halo d'inhibition (P -value < 2.2e-16). De plus, un modèle prenant en compte l'interaction entre les 2 facteurs est significativement mieux ajusté aux données, qu'un modèle sans interactions (P -value < 2.2e-16). Les écart-types estimés par ce modèle montrent que la variabilité des 2 facteurs aléatoires est du même ordre de grandeur : 1,9336 et 1,8144 respectivement pour les souches de STEC et de bactéries lactiques. Il existe de plus, une variabilité non négligeable (1,6832) par rapport à la variabilité résiduelle (1,5512) liée à l'interaction entre ces 2 facteurs.

Aucun effet des facteurs fixes « sérogroupes » et « origine » n'a pu être observé par l'analyse du modèle linéaire croisé mixte avec répétitions. De ce fait, le modèle simplifié prenant en compte uniquement les 2 facteurs aléatoires et leur interaction a été étudié plus précisément et la normalité des distributions des effets aléatoires estimés par ce modèle a été testée (Figure 23).

Aucune déviation particulière par rapport à la normalité n'a été mise en évidence pour le facteur « souches lactiques » (Figure 23a). Cependant, les effets estimés du facteur « souche STEC » ne sont pas répartis de manière homogène (Figure 23b) et diffèrent significativement d'une distribution suivant la loi normale ($p = 0.0008$ selon le test de normalité de Shapiro-Wilk). Pour cette dernière distribution, 3 groupes de STEC ont été identifiés : un groupe A caractérisant les souches STEC les plus sensibles à l'inhibition par les bactéries lactiques ; un groupe B de souches STEC montrant une sensibilité intermédiaire et un groupe C de sensibilité très faible (Figure 23b). Le groupe de sensibilité de chacune des souches de STEC testées a été reporté dans le tableau récapitulatif 14. La plupart des souches de STEC O157:H7 font partie du groupe de sensibilité B alors que les souches de *E. coli* O26 sont prédominantes dans le groupe C. Les souches appartenant aux sérogroupes O103, O111 et O145 sont retrouvées dans les groupes A et C.

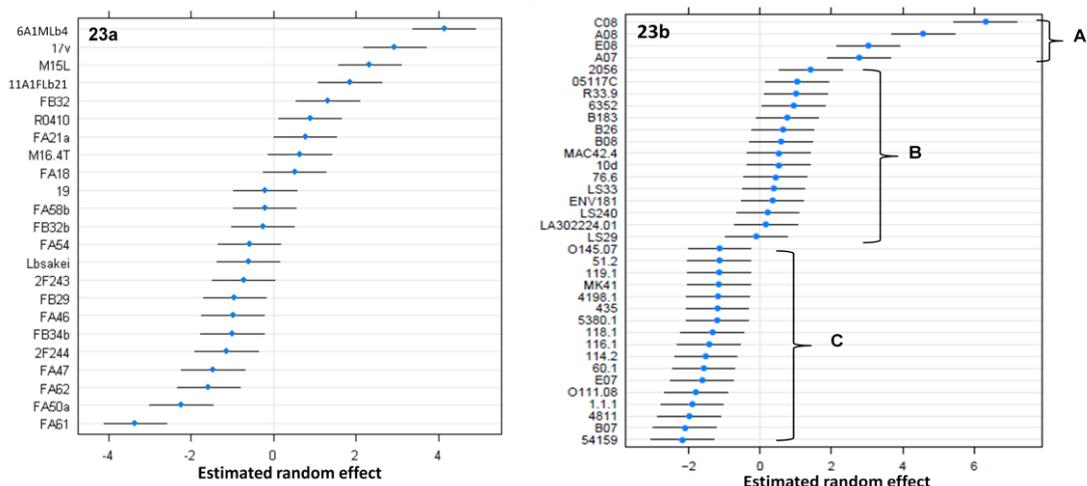


Figure 23 : Distribution des effets aléatoires estimés pour les facteurs bactéries lactiques (23a) et STEC (23b) avec les 3 groupes de sensibilité associés (A, B and C).

2.3 Identification des produits responsables de l'inhibition

La production de composés antimicrobiens a été testée pour les 6 bactéries lactiques sélectionnées dans la 2^{ème} partie du criblage en présence de 3 souches de STEC issues des 3 groupes de sensibilité identifiés. L'origine et le séro groupe de ces souches n'a pas été pris en compte puisque l'exploitation statistique précédente n'a pas mis en évidence d'effet de ces facteurs.

Les observations aux différentes étapes du protocole étaient identiques pour les 6 bactéries lactiques étudiées et quelle que soit la souche de STEC testée. A titre d'exemple, la Figure 24 montre l'inhibition de croissance des souches de STEC appartenant aux 3 groupes de sensibilité en présence du surnageant non traité pour les 6 bactéries lactiques étudiées.

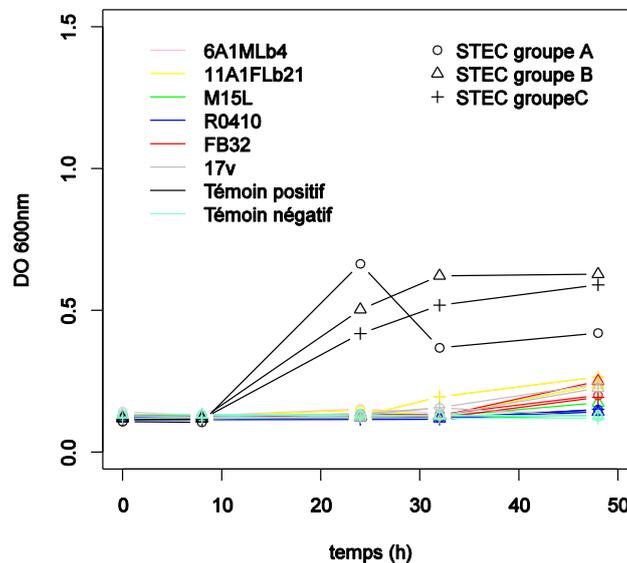


Figure 24 : Moyenne des cinétiques de croissance pour les souches de STEC des groupes A, B et C (n = 3), en présence de chacun des surnageants de culture des 6 bactéries lactiques.

La Figure 25 illustre à titre d'exemple les résultats obtenus pour les souches de STEC du groupe C (435, 116.1 et 60.1). Il a été observé que les surnageants de cultures des 6 bactéries lactiques (SUR 1) étaient inhibiteurs de la croissance des STEC au cours des 48 h d'observation (Figure 25a). Lorsque les surnageants ont été traités par la pepsine (SUR 3), le même niveau d'inhibition a pu être observé envers les souches de STEC (Figure 25b). Au contraire, l'ajout de trypsine et α -chymotrypsine dans leur milieu tamponné à pH6 (SUR 4), a induit une augmentation de la valeur de pH des échantillons levant l'inhibition acide initiale. Les résultats issus de ce traitement n'ont donc pas été traités car les effets de l'acide ou des protéases n'ont pas pu être distingués. La neutralisation du surnageant par l'hydroxyde de sodium (SUR 2) a permis de lever totalement l'inhibition de croissance pour chacune des souches de STEC testées. Leurs cinétiques de croissance étaient alors similaires à celles des témoins positifs (Figure 25c). L'ajout de catalase au surnageant neutralisé (SUR 7) identifiant la production de peroxyde d'hydrogène, de même que l'effet des protéases (SUR 5 et 6) n'ont pas été investigués en accord avec l'arbre décisionnel présenté Figure 17.

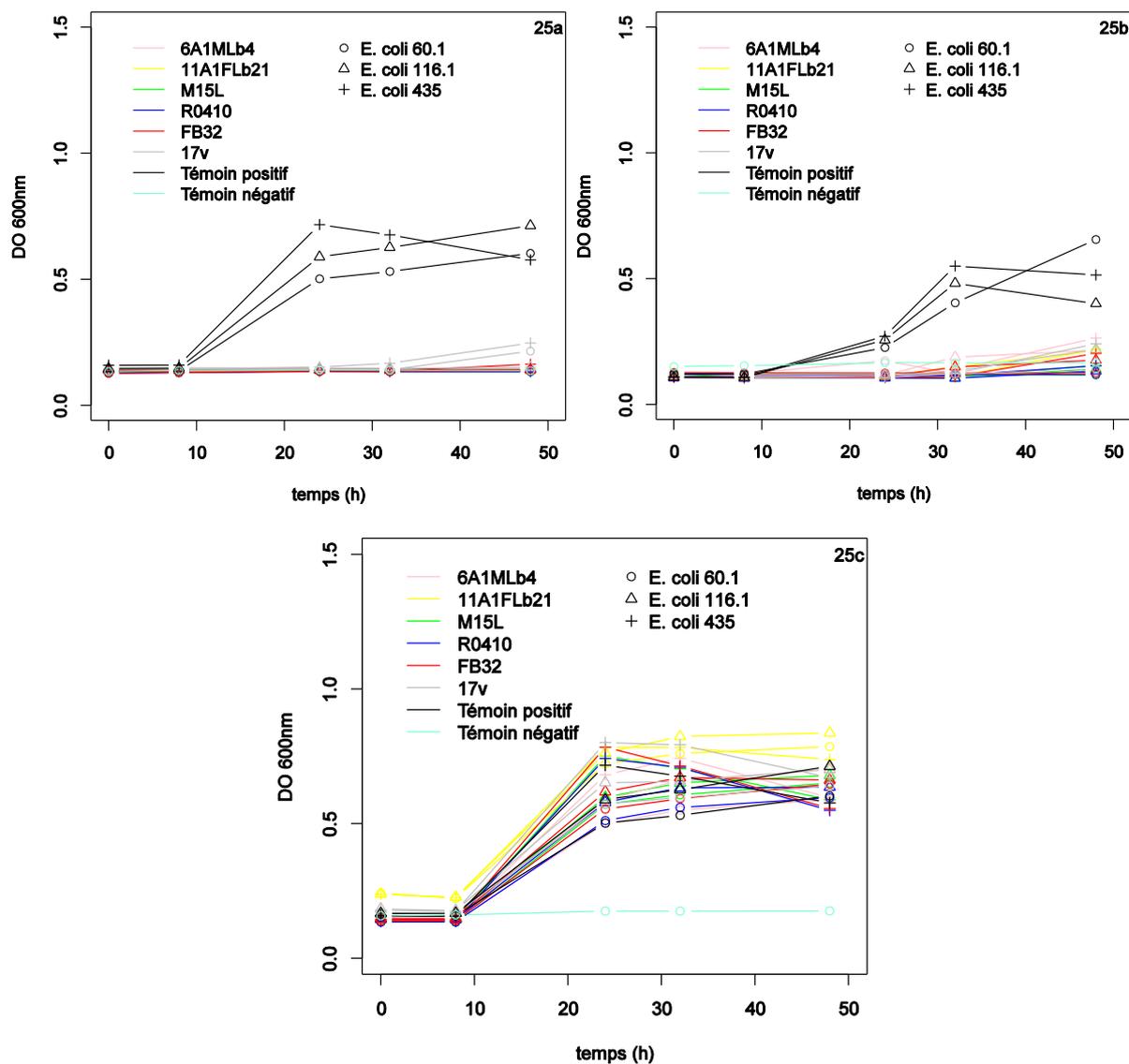


Figure 25 : Cinétiques de croissance des 3 souches de *E. coli* du groupe C (60.1, 116.1 et 435) testées en triplicata, en présence de chacun des 6 surnageants de cultures des bactéries lactiques ; SUR 1 surnageant seul (25a), SUR 3 surnageant traité avec la pepsine (25b) et SUR 2 surnageant neutralisé (25c).

Pour toutes les analyses effectuées (6 bactéries lactiques testées envers 9 STEC), un agent inhibiteur a pu être identifié (Tableau 13). La production d'acides lactique et acétique a été dosée chez ces souches au moyen de kit enzymatiques.

Tableau 13 : Genre ou espèce, agent inhibiteur identifié et concentration en acide lactique et acide acétique pour les 6 souches de bactéries lactiques inhibitrices des 36 souches de STEC.

Souche	Genre, espèce	Agent inhibiteur identifié	Concentration (g/l)	
			Acide lactique	Acide acétique
11A1FLb21	<i>Enterococcus</i>	Acides organiques	2,43	ND
17v	<i>Enterococcus faecium</i>	Acides organiques	5,361	ND
FB32	<i>Lactobacillus sakei</i>	Acides organiques	4,145	2,1
M15L	<i>Lactococcus garvieae</i>	Acides organiques	5,716	2,42
6A1MLb4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Acides organiques	5,589	1,96
R0410	<i>Propionibacterium</i>	Acides organiques	5,787	2,06

ND: non déterminé pour les souches homofermentaires (11A1FLb21 et 17v).

Les quantités produites sont similaires pour les 6 souches de bactéries lactiques, exceptée pour la souche 11A1FLb21 produisant seulement 2,43 g/l d'acide lactique dans ces conditions. Du fait de leur métabolisme homofermentaire, la production d'acide acétique n'a pas été évaluée chez les souches d'*Enterococcus* 17v et 11A1FLb21.

2.4 Cinétiques d'inhibition

a) Description des cinétiques

Un total de 10 cinétiques de cultures pures et 9 cinétiques de croissances simultanées ont été réalisées pour la souche lactique 6A1MLb4 et 3 souches de STEC appartenant aux 3 groupes de sensibilité A, B ou C identifiés lors du criblage sur gélose. L'évolution de la souche de bactérie lactique 6A1MLb4 était similaire en co-culture et en culture pure. Elle pouvait être décrite par une phase exponentielle suivie d'une phase stationnaire lorsque la densité de population atteint son maximum (environ 10^8 UFC/ml). La Figure 26 illustre à titre d'exemple cette évolution pour 3 souches de STEC A (C08), B (6352) et C (60.1) co-inoculées avec la souche de bactérie lactique 6A1MLb4.

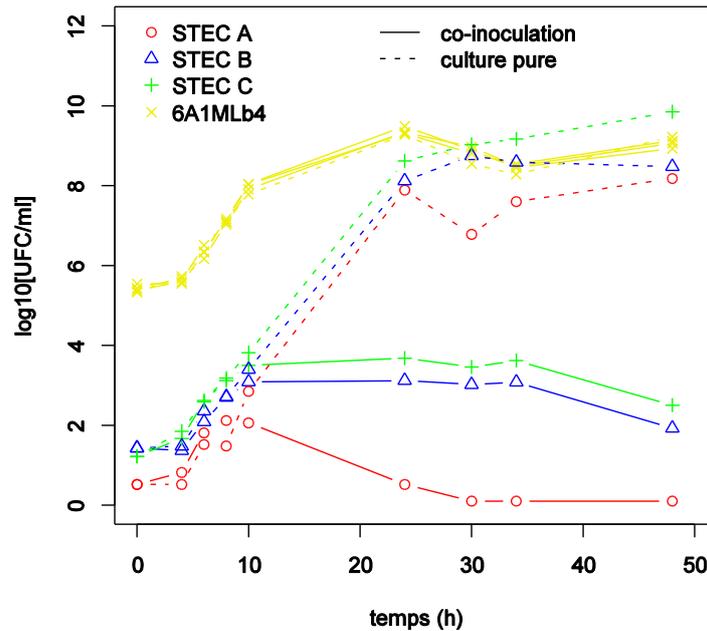


Figure 26 : Croissance des souches de STEC A (C08), B (6352) et C (60.1) et de la bactérie lactique 6A1MLb4 (LAB) lors des co-inoculations ou en culture pure.

Les cinétiques des différentes souches de STEC obtenues en cultures pures ont présenté la même évolution. A l'inverse, lorsque ces souches STEC ont été co-inoculées avec la souche de bactérie lactique, un arrêt brutal de la phase exponentielle a pu être observé au moment où la population de bactéries lactiques atteignait le seuil maximal de densité (Figure 26). Aucune différence n'a été observée entre les taux de croissance maximum en culture pure ou en co-inoculations pour chacun des deux microorganismes.

b) Modélisation des cinétiques d'inhibition

L'observation des courbes obtenues a montré des différences dans l'évolution des souches de STEC lors des co-cultures. En effet, l'arrêt simultané de la croissance des 2 microorganismes est suivi dans certains cas d'une phase stationnaire traduisant un effet bactériostatique de la population de bactéries lactiques sur les STEC. Dans d'autres cas, seule la population de bactéries lactiques présente une phase stationnaire et la densité de population de STEC diminue. Ce phénomène décrit un effet bactéricide des bactéries lactiques envers les STEC.

L'évolution des souches de STEC ayant montré une phase de déclin peut être décrite par le Modèle (1) alors que l'évolution des souches caractérisées par une phase stationnaire est décrite par le Modèle (2) (Équation 2).

Les résultats des test-F ont été utilisés pour comparer l'ajustement des modèles aux données. Le Modèle 1 prenant en compte la phase de déclin a été choisi pour décrire les données obtenues pour toutes les souches de STEC du groupe de sensibilité A, ainsi que 2 des STEC du groupe B (76.6 et 10d) et une souche du groupe C (116.1) (Figure 27).

Le Modèle 2 décrivant une phase stationnaire a, quant à lui, été utilisé pour rendre compte de la croissance des souches de STEC 6352 du groupe B et 60.1 et 435 du groupe C (Figure 27).

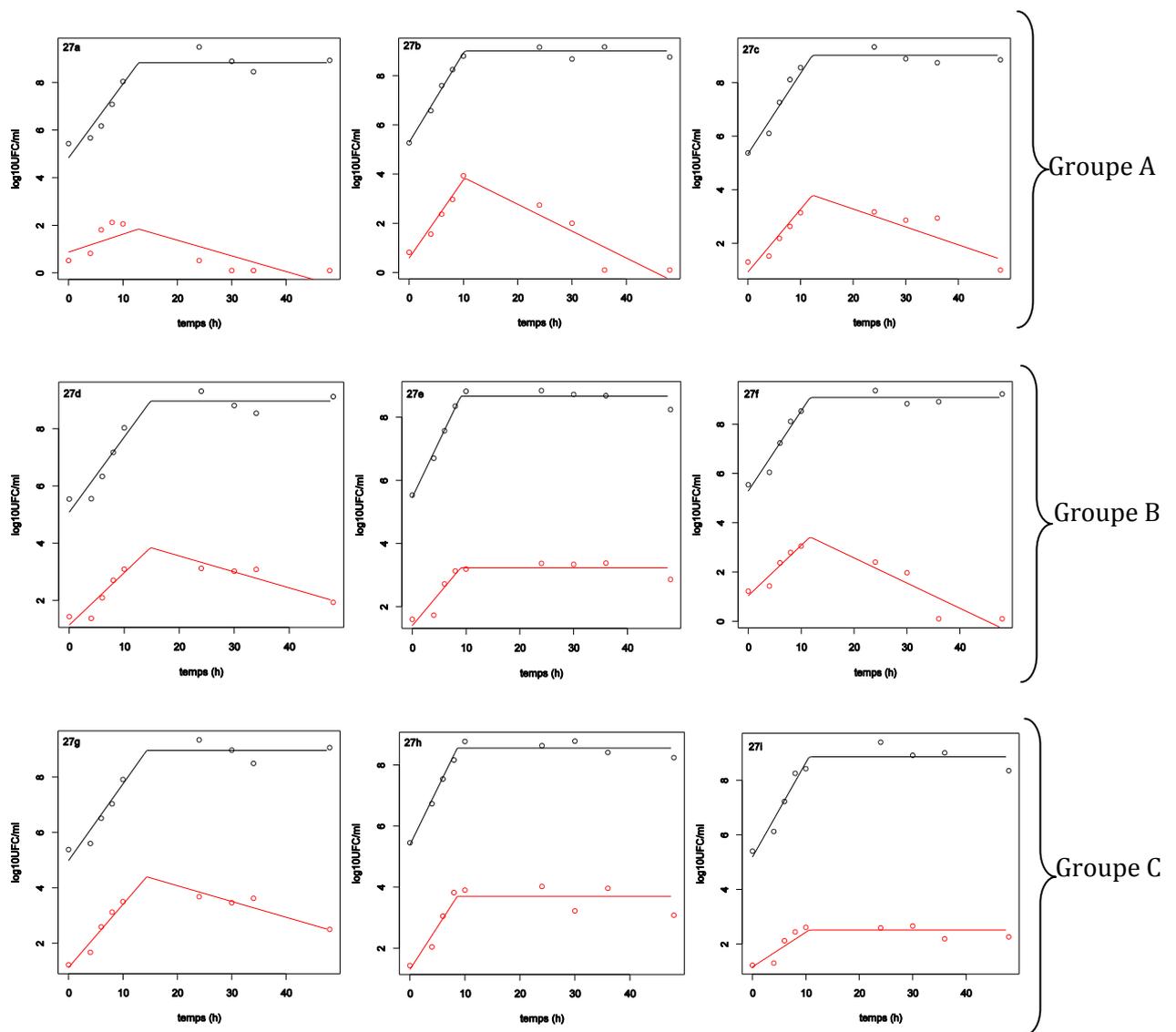


Figure 27: Dénombrements et modélisation des co-inoculations de la bactérie lactique 6A1MLb4 *Leuconostoc mesenteroides* et des 9 souches de STEC appartenant aux trois groupes de sensibilité A, B et C.

Croissance de la souche de bactérie lactique (6A1MLb4) et des souches de STEC A08 (27a), C08 (27b) et E08 (27c) appartenant au groupe de sensibilité A ; des souches de STEC 76.6 (27d), 6352 (27e) et 10d (27f) appartenant au groupe de sensibilité B ; et des souches de STEC 116.1 (27g), 60.1 (27h) et 435 (27i) appartenant au groupe de sensibilité C. Les données expérimentales (○) sont représentées en noir pour les populations de bactéries lactiques et en rouge pour les populations de STEC co-inoculées, les lignes continues représentent leurs modélisations.

Tableau 14 : Caractéristiques des souches STEC utilisées

Étape du criblage	Souche	Sérotype	Origine	Système glutamate	Group e PFGE	Groupe MLVA	Groupe sensibilité
2	ENV181	O157:H7	E	+	P7	M1	B
2	6352	O157:H7	E	+	P7	M1	B
2	B26	O157:H7	E	+	P7	M1	B
2	B183	O157:H7	E	+	P7	M1	B
2	LS33	O157:H7	F	+	P7	M1	B
2	LS29	O157:H7	F	+	P7	M1	B
2	76.6	O157:H7	F	+	P7	M1	B
2	R33.9	O157:H7	F	+	P7	M1	B
2	05117C	O157:H7	V	+	P7	M1	B
2	LS240	O157:H7	V	+	P7	M1	B
1	435	O157:H7	V	+	P7	M1	C
1	MK4124-2b	O157:H7	V	+	P7	M1	C
2	114.2	O26:H11	E	+	P4	M5	C
2	5380.1	O26:H11	From	+	P4	M5	C
2	4198.1	O26:H-	From	+	NT	M2	C
2	119.1	O26:H11	E	+	P4	M5	C
2	116.1	O26:H11	E	+	P4	M5	C
2	10d	O26:H11	From	+	P6	M2	B
1	51.2	O26:H11	From	+	P6	M2	C
2	LA302224.01	O26:H11	L	+	P3	M2	B
1	60.1	O26:H11	L	+	P4	M5	C
2	MAC42.4	O26:H11	L	+	P6	M2	B
2	118.1	O26:H11	E	+	P4	M5	C
2	B08	O26:H-	L	-	P6	M2	B
2	2056.1	O103:H2	L	-	NT	M3	A
1	1.1.1	O103:H-	L	+	P4	M4	C
2	E08.1	O103:H2	NR	-	P3	M5	A
2	B07.1	O103:H-	NR	+	P2	M3	C
2	54159.1	O111:H8	From	+	P5	M3	C
2	A07.1	O111:H-	NR	-	P5	M4	A
2	C08.1	O111:H-	NR	-	P5	M3	A
1	O111.08	O111:H-	NR	+	P5	M4	C
2	A08.1	O145:H-	NR	-	P1	M4	A
2	E07.1	O145:H28	NR	-	P1	M4	C
1	O145.07	O145:H-	NR	+	P4	M4	C
2	4811.1	O145:H-	From	-	P1	M4	C

E: Environnement ; F: Fèces ; V : Viande ; From : Fromage ; L : Lait ; NR : Non Référencée ; NT: non typable; (+) pour le système glutamate, signifie que la souche a démontré une activité totale ou partielle de l'enzyme glutamate décarboxylase permettant sa survie en milieu acide (voir protocole de Takada et *al.* (2007)).

3. Discussion

Les bactéries lactiques ont un fort intérêt en bioprotection. Elles peuvent notamment être utilisées en tant que probiotiques dans l'alimentation humaine ou animale (Calderon et al., 2007; Papathomopoulou & Kotzekidou, 2009; Tsai et al., 2010; Zago et al., 2011). Elles peuvent aussi être employées comme agent de fermentation ou dans un intérêt sanitaire, en limitant le développement de bactéries pathogènes (Caplice & Fitzgerald, 1999). Des études concernant le potentiel inhibiteur de souches de bactéries lactiques envers des souches de STEC ont, en effet, été réalisées *in vitro* (Gopal et al., 2001) ou dans diverses matrices : en modèle du rumen (Chaucheyras-Durand et al., 2010b), dans des produits laitiers (Pereira et al., 2009; Londero et al., 2011), dans des ensilages (Pedroso et al., 2010) ou encore dans des produits carnés (Awaisheh & Ibrahim, 2009). Cependant ces études ont essentiellement concerné le sérotype O157 et peu d'informations sont actuellement disponibles sur les autres sérotypes de STEC considérés comme pathogènes. L'objectif de la présente étude était de sélectionner des bactéries lactiques capables d'inhiber la croissance d'un large panel de souches de STEC *in vitro* et de caractériser leurs mécanismes d'inhibition. Pour ce faire, une sélection de bactéries lactiques inhibitrices de la croissance des STEC a tout d'abord été réalisée, associée à une analyse des données d'inhibition en fonction de divers facteurs. Une étude plus poussée portant sur la caractérisation du mécanisme d'inhibition a été menée sur les 6 souches les plus inhibitrices. Elle a porté d'une part sur l'identification des produits inhibiteurs selon un arbre décisionnel, et d'autre part sur la cinétique d'inhibition observée lors des co-inoculations.

Des souches de STEC présentant différents profils de virulence, origines et sérotypes ont été choisies afin d'étudier une grande variabilité de souches potentiellement pathogènes. Une étude de la proximité génétique de ces souches a été menée par PFGE et MLVA. Ces 2 techniques ont mis en évidence une variabilité des souches testées : 31 profils obtenus classés en 7 groupes selon le PFGE et 28 profils classés en 5 groupes selon la MLVA. Comme attendu, les groupes sont majoritairement liés au sérotype des souches de STEC et la plupart de ces souches ont été assignées à des groupes similaires d'après ces 2 techniques. Cette concordance entre les 2 techniques a été relevée par d'autres auteurs (Dyet et al., 2010), bien que dans certains cas, il ait été démontré que la MLVA était une méthode plus discriminante (Konno et al., 2011). Concernant certaines souches, des relations de clonalité ont pu être observées avec les 2 techniques, mais ne concernent pas toujours les mêmes isolats. Afin d'affiner l'analyse en PFGE, il aurait été possible d'utiliser une 2^{ème} enzyme de restriction et d'analyser les profils obtenus. La plupart des clones ont été observés par la technique de la MLVA et les loci utilisés pour cette étude offraient peut être une variabilité insuffisante pour distinguer tous les isolats. La mise au

point d'une analyse MLVA portant sur 10 loci a été réalisée récemment par Løbersli et *al.*, (in press) et permettrait d'améliorer fortement les performances de cette méthode. Une analyse MLVA spécifique du sérotype O157:H7 existe, et est décrite dans la littérature (Hyytiä-Trees et *al.*, 2006), cependant elle ne peut être appliquée aux autres sérogroupes de STEC et n'a donc pas été choisie. Certaines souches de STEC n'avaient pas pu être analysées du fait d'autolyse de leur ADN, et la mise en œuvre d'un 2^{ème} outil de typage moléculaire utilisant d'autres cibles génétiques a ainsi permis d'apporter des informations complémentaires sur la proximité génétique des souches de STEC testées.

Six bactéries lactiques de différents genres ont été sélectionnées pour leur capacité à inhiber les 36 souches de STEC testées par un criblage en 2 étapes. L'étude statistique sur ces données a montré une importante variabilité des valeurs d'inhibition. Cette variabilité était essentiellement due aux souches de bactéries lactiques et de STEC testées. L'analyse a aussi montré que les variations d'inhibition observées n'étaient pas dues de manière significative à l'origine ou au sérotype des souches choisies. Néanmoins, des classes de sensibilités ont pu être déterminées pour les souches de STEC : un groupe A de souches de STEC fortement inhibées par les bactéries lactiques, un groupe B de STEC montrant une inhibition intermédiaire et un groupe C rassemblant les souches de STEC les moins sensibles à l'inhibition par les bactéries lactiques (Tableau 14).

Contrairement aux résultats de l'analyse statistique, un effet de l'origine ou du sérotype des souches de STEC testées sur la sensibilité aux bactéries lactiques était initialement attendu. En effet, il est connu que les souches de STEC provenant de l'environnement ont subi de nombreux stress comme une faible disponibilité des nutriments, des phénomènes de dessiccation ou encore d'importantes variations de température (Cebrián et *al.*, 2008). Les souches issues des aliments ont subi quant à elles des stress technologiques tels que l'acidité du milieu et une activité de l'eau (a_w) faible, notamment dans le fromage ; ou encore des températures de stockage basses pendant la réfrigération du lait ou la congélation de la viande par exemple. Enfin, les souches de STEC issues des fèces ont résisté aux stress physiologiques de l'hôte comme l'acidité de l'estomac, la présence de sels biliaires et d'acides gras volatils dans le tractus digestif, ainsi que des phénomènes de compétition avec la flore endogène de l'hôte (Kazmierczak et *al.*, 2005). Ces différents stress auraient ainsi pu déclencher l'expression des mécanismes de résistance favorisant ensuite la capacité de ces souches à résister à l'inhibition par les bactéries lactiques (Dong & Schellhorn, 2010). Par ailleurs, des études ont montré que les souches de *E. coli* O157:H7 sont moins fréquemment retrouvées dans le lait ou les produits laitiers (Baylis, 2009) comparé aux sérogroupes de STEC non-O157, alors qu'il s'agit du sérotype le plus fréquemment isolé des produits carnés (AFSSA, 2003). Les souches de STEC non-O157 issues de

produits laitiers pourraient donc être plus résistantes à l'inhibition par les bactéries lactiques du fait de leur contact prolongé avec celles-ci dans la matrice alimentaire. Les souches de *E. coli* O157:H7 auraient pu, quant à elles, être plus sensibles du fait d'un contact moins long avec une population de bactéries lactiques en plus faible densité. Il s'agit en effet, d'une situation observable dans la principale matrice alimentaire où ce sérotype est retrouvé : les produits carnés. Cependant, les résultats obtenus ne confirment pas cette hypothèse. La croissance des souches de STEC a été réalisée en milieu synthétique de laboratoire ce qui aurait pu altérer leur éventuelle adaptation préalablement acquise dans d'autres matrices.

Enfin, aucune des 2 études, par PFGE ou par MLVA, n'a permis de mettre en évidence des liens entre la proximité génétique des différentes souches de STEC et leurs groupes de sensibilité. Bien qu'une discrimination plus importante *via* l'utilisation d'une 2^{ème} enzyme en PFGE ou d'un plus grand nombre de loci en MLVA aurait probablement pu distinguer les différents clones de STEC, une telle analyse n'aurait vraisemblablement pas permis d'établir un lien avec leur groupe de sensibilité. Au sein d'une même origine ou d'un même séro groupe de STEC, des souches présentent néanmoins des sensibilités différentes aux bactéries lactiques. Il semblerait que cela soit dû à la souche elle-même, ainsi probablement qu'à des caractéristiques génétiques non encore identifiées.

Les bactéries lactiques sélectionnées grâce au criblage ont démontré leur potentiel inhibiteur envers toutes les souches de STEC testées, indépendamment de leurs caractéristiques phénotypiques ou génotypiques. Le test d'identification a montré que l'inhibition de la croissance des STEC, quelque soit leur groupe de sensibilité, était principalement due à la production d'acides organiques excrétés dans le milieu par les bactéries lactiques. En fonction de leurs voies métaboliques, les bactéries lactiques produisent essentiellement de l'acide lactique et acétique (Dridier & Prévost, 2009) et il a été démontré que les 6 bactéries lactiques sélectionnées ont acidifié *in vitro* le milieu de culture *via* ces acides (Tableau 13). Les rendements de production observés pour ces acides ont varié en fonction des souches considérées. L'inhibition de la croissance des STEC peut aussi être liée à une compétition cellulaire, notamment pour l'accès aux nutriments. Cependant cet effet reste marginal, puisque l'inhibition de croissance des STEC a été observée en présence du seul surnageant de culture lactique. Il est aussi possible que l'inhibition de croissance des STEC puisse être liée à la présence simultanée d'autres substances antimicrobiennes. Les bactéries lactiques testées appartenaient à différents genres connus pour produire des bactériocines (Klaenhammer, 1988). En effet, les bactéries lactiques peuvent synthétiser des composés protéiques nommés bactériocines. Ces composés sont capables d'inhiber un large spectre de microorganismes, notamment des bactéries d'altération ou des pathogènes (Jack et *al.*, 1995). La production de bactériocine est sous l'influence de nombreux facteurs dont les plus importants sont le pH, la température et la composition du milieu

(Drosinos et al., 2005). La production de telles substances antimicrobiennes par les bactéries sélectionnées n'a pas été observée dans cette étude. Il est donc possible que les bactéries étudiées ne soient pas productrices de bactériocines ou que les conditions *in vitro* de l'étude n'aient pas permis de révéler la synthèse de ces composés. En effet, des études ont montré que la production de bactériocine était maximale lorsque les conditions de pH et de température étaient inférieures aux conditions optimales de croissance de la bactérie considérée (DeVuyst et al., 1996; Aasen et al., 2000).

Le type d'inhibition a aussi été investigué par le biais de co-inoculations. Les inocula des 2 microorganismes ont été choisis avec le même écart de concentration que pour le criblage sur gélose ainsi que pour permettre une observation de la croissance de la population majoritaire (bactéries lactiques). Les inocula utilisés étaient de 10^1 UFC/ml pour les STEC et 10^4 UFC/ml pour les bactéries lactiques. Les 9 souches de STEC testées ont été choisies au hasard, au sein des 3 groupes de sensibilités A, B ou C. La souche 6A1MLb4 de *Leuconostoc mesenteroides* a montré le plus fort potentiel d'inhibition lors du criblage, c'est pourquoi cette souche a été choisie pour réaliser les co-inoculations *in vitro*.

Deux modèles ont été ajustés aux données de croissance simultanée de la souche 6A1MLb4 et des 3 souches de STEC de chaque classe de sensibilité. Les modèles utilisés traduisent un arrêt simultané de la phase exponentielle des 2 populations microbiennes. Cet effet de compétition est connu sous le nom d'effet Jameson et a déjà été employé avec succès pour décrire ce type de données (Delignette-Muller et al., 2006; Vimont et al., 2006; Cornu et al., 2011). Le Modèle (1) a montré un meilleur ajustement aux données de croissance des souches de STEC appartenant au groupe de sensibilité A. La croissance simultanée décrite par ce Modèle (1) pourrait être comparée au mécanisme biologique de production d'un composé bactéricide par les bactéries lactiques en phase stationnaire, conduisant à la destruction progressive de la population de STEC. Les données de croissance des souches de STEC appartenant aux groupes B et C de sensibilité intermédiaire ou faible, et co-inoculées avec la souche 6A1MLb4 ont pu être décrites par le Modèle (1) ou par le Modèle (2). Dans le cas du Modèle (2), seul un effet bactériostatique a été observé sur la population de STEC.

Bien que 3 groupes de sensibilité aient pu être définis, l'ajustement des données de croissance simultanée à un modèle spécifique a pu être réalisé uniquement pour les 3 souches appartenant au groupe de sensibilité A. Ces souches de STEC se sont avérées incapables d'utiliser le système de résistance à l'acidité dépendant du glutamate (Tableau 14). Il est donc possible que ces souches soient plus sensibles à l'inhibition par les bactéries lactiques, puisque ce système est considéré comme le plus efficace pour protéger des souches de *E. coli* des effets bactéricides de nombreux acides organiques (Castanie-Cornet et al., 1999; Lin et al., 1996). Cependant d'autres

souches de STEC (10d et 116.1) possédant ce système de résistance ont montré une décroissance de leur population lorsqu'elles étaient inoculées en présence de la souche 6A1MLb4. L'effet bactéricide de la substance produite par la bactérie lactique ne peut donc pas être expliqué uniquement par l'utilisation ou non du système de résistance à l'acidité glutamate dépendant. Des modifications de l'organisation de la membrane cellulaire des STEC, facilitant l'entrée de petites molécules dans le cytoplasme, pourraient expliquer partiellement cette différence (Zhang *et al.*, 2000). Des études plus poussées sont maintenant requises pour élucider les raisons de l'effet bactéricide des bactéries lactiques sur certaines souches de STEC.

Il est important de garder à l'esprit que les changements observés dans les populations de STEC et de bactéries lactiques lors des co-inoculations sont spécifiques des conditions *in vitro* choisies. Les 2 populations pourraient avoir des comportements totalement différents dans d'autres environnements tels que des matrices alimentaires. Il serait alors nécessaire de prendre en compte la flore microbienne naturelle de l'aliment qui se compose de plusieurs espèces pouvant aussi produire des substances antimicrobiennes. Dans ce cas, la combinaison de différents microorganismes pourrait avoir un effet de bioprotection synergique envers les souches de STEC, accélérant leur élimination ou au contraire, un effet antagoniste favorisant leur survie. Il a notamment été démontré que la production de biofilm par des souches de *E. coli* O157:H7 étaient fortement augmentée par la présence d'une bactérie accompagnatrice dans des biofilms (Uhlich *et al.*, 2010).

Un effet bactériostatique serait intéressant pour développer des stratégies de bioprotection. Cependant, du fait de la faible dose infectieuse des STEC (Tilden *et al.*, 1996), il est indispensable que les méthodes de bioprotection soient basées sur un effet bactéricide. Dans les industries alimentaires, la plupart des techniques d'élimination des bactéries utilisent des agents chimiques (acide chlorhydrique, hydroxyde de sodium...) ou des traitements physiques comme la pasteurisation (Bari *et al.*, 2003; Mak *et al.*, 2001). Cependant, des stratégies de préservation des aliments *via* l'ajout de bactéries lactiques ou de leurs produits de fermentation ont déjà été employées avec succès pour l'élimination de *E. coli* O157:H7 (Mufandaedza *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2010; Chang & Chang, 2011) et doivent maintenant être développées envers d'autres sérogroupes.

En conclusion, cette étude a montré que des STEC de différents sérogroupes pouvaient être inhibées par des bactéries lactiques *via* la production d'acides organiques. Bien que le sérotype et l'origine des souches de STEC n'aient pas influencé significativement les variations d'inhibition, des groupes de sensibilité ont été observés chez les souches de STEC. Les raisons déterminant l'effet bactéricide des bactéries lactiques sur certaines souches de STEC

restent non élucidées et nécessitent des études plus poussées afin de pouvoir utiliser ces souches dans diverses stratégies de bioprotection.

Les bactéries lactiques sélectionnées dans notre étude ont montré un potentiel bioprotecteur contre un large panel de souches de STEC et leur possible utilisation en bioprotection devrait maintenant être investiguée envers d'autres microorganismes pathogènes tels que *Listeria monocytogenes* ou *Salmonella*. Elles pourraient également être utilisées dans un but bioprotecteur en différents points de la chaîne alimentaire, depuis l'alimentation des animaux par une utilisation dans l'ensilage ou en tant que probiotiques notamment, jusqu'au tractus gastro-intestinal humain.

4. Valorisation des résultats obtenus

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'un article qui sera soumis prochainement à la revue scientifique à comité de lecture internationale « Applied and Environmental Microbiology » ainsi que d'un poster et de 2 communications orales présentés lors d'un congrès international et 2 congrès nationaux.

4.1 Publication prévue (Voir Annexe 2)

« Study of Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) growth inhibition *in vitro* by Lactic Acid Bacteria and characterization of the inhibition. »

Lysiane Dunière, Marie-Laure Delignette-Muller, Frédérique Chaucheyras-Durand, Isabelle Chevallier et Delphine Thévenot.

4.2 Poster (Voir Annexe 3)

« Study of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* growth inhibition by Lactic Acid Bacteria ».

Lysiane Dunière, Marie-Laure Delignette-Muller, Audrey Gleizal, Franck Ferré, Isabelle Chevallier et Delphine Thévenot.

Poster présenté lors de la "2nd ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans and the Environment" du 8 au 10 Juin 2010, Toronto, Canada.

4.3 Communication orale n°1 (Voir Annexe 4)

Communication présentée lors du 8^{ème} congrès national de la Société Française de Microbiologie
du 2 au 4 Juin, Marseille, France.

« ETUDE DE L'INHIBITION DE CROISSANCE DE SOUCHES D'*ESCHERICHIA COLI* PRODUCTEURS
DE SHIGA TOXINES (STEC) PAR DES BACTERIES LACTIQUES. »

L Dunière, D Thevenot, I Chevallier

4.4 Communication orale n°2 (Voir Annexe 5)

Communication présentée lors du 17^{ème} Colloque des Bactéries Lactique, du 25 au 27 Octobre
2010, Nancy, France.

« ETUDE DE L'INHIBITION DE CROISSANCE DES *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTEURS DE
SHIGA-TOXINES (STEC) PAR DES BACTERIES LACTIQUES. »

Dunière Lysiane, Delignette-Muller Marie-Laure, Gleizal Audrey, Ferre Franck, Chevallier
Isabelle, Thevenot Delphine

Chapitre 5 : Etude *in situ*

Validation du potentiel bio-protecteur dans des ensilages de maïs

Les travaux présentés dans ce chapitre ont permis de répondre au 2nd objectif de la thèse : en effet, l'étude du devenir de souches de STEC au sein des ensilages ainsi que leurs évolutions en présence de diverses bactéries lactiques sélectionnées préalablement pour leur pouvoir inhibiteur dans le chapitre précédent, a permis d'une part d'apporter de nouvelles informations sur le comportement de souches de STEC non-O157 dans l'ensilage et d'autre part, de valider le potentiel inhibiteur de certaines bactéries lactiques en conditions *in situ*.

1. Matériel et méthodes

1.1 Matériel

a) Bactéries lactiques

Les 8 bactéries lactiques employées dans cette partie ont été préalablement utilisées dans l'étude *in vitro* (Tableau 15).

Tableau 15 : Genre ou espèce, métabolisme fermentaire et collection d'origine des 8 souches de bactéries lactiques utilisées.

Souche	Genre ou espèce	Métabolisme fermentaire	Collection d'origine
11A1FLb21	<i>Enterococcus</i>	Homofermentaire	CALITYSS
17v	<i>Enterococcus faecium</i>	Homofermentaire	CALITYSS
6A1MLb4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Hétérofermentaire	CALITYSS
FB32	<i>Lactobacillus sakei</i>	Hétérofermentaire	CALITYSS
M15L	<i>Lactococcus garvieae</i>	Hétérofermentaire	CALITYSS
R0410	<i>Propionibacterium</i>	Hétérofermentaire	Lallemand
NCIMB 40788	<i>Lactobacillus buchneri</i>	Hétérofermentaire	Lallemand
E09	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Homofermentaire	CALITYSS

Les informations concernant le genre, l'espèce et le métabolisme des souches ont été extraites du soucier de référence des collections CALITYSS et Lallemand.

Les 6 premières ont été sélectionnées pour leur pouvoir inhibiteur envers de nombreuses souches de STEC (voir Chapitre 4) et les 2 souches NCIMB 40788 et E09 ont été rajoutées : la souche de *Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788 issue de la collection Lallemand est actuellement commercialisée comme agent d'ensilage. Lors de travaux préalables, la souche E09 issue de la collection CALITYSS a montré un potentiel inhibiteur fort envers *Listeria monocytogenes* CIP7837 et plus faible envers *E. coli* CIP548T (travail de Master II, Govindasamy, 2009). Par ailleurs cette espèce est fréquemment isolée d'ensilage (Holzer et al., 2003) et peut aussi être utilisée comme agent d'ensilage. Les souches de la collection CALITYSS ont été isolées d'ateliers de fabrication de saucissons. Pour leur conservation, toutes les souches ont été stockées à -80°C dans 30% de glycérol.

b) Souches de STEC :

Trois souches de *E. coli* appartenant au sérotype O26 ont été testées (Tableau 16). Ces souches sont issues de la collection du LMAP (VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France), Laboratoire National de Référence des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines et ont également été utilisées lors de la première étude *in vitro* (voir Chapitre 4). Ces 3 souches appartiennent au groupe de sensibilité C défini lors du Chapitre 4. Une de ces souches est issue de l'environnement de la ferme (C2) et les 2 autres proviennent de produits laitiers (C1 et C3). Leurs profils de virulence ont été caractérisés lors de l'étude décrite dans le Chapitre 4. Les souches ont été conservées en cryobilles (Technical services, CL, UK) et stockées à -80°C.

Tableau 16 : Origine, sérotype et facteurs de virulence des souches de STEC testées.

Souche	Origine	Sérotype	Facteurs de virulence			
			<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	Système glutamate
60.1	Lait	O26:H11	+	-	-	+
114.2	Environnement	O26:H11	+	-	-	+
4198.1	Fromage	O26:H-	-	-	-	+

c) Maïs destiné à l'ensilage

Des plants entiers de maïs fourrager ont été récoltés durant la 2^{ème} semaine du mois de Septembre 2010, à un stade de maturité pâteux-vitreux, correspondant à 40,7% de matière sèche. Avant toute expérimentation, le maïs fourrager a été analysé par PCR en temps réel (RT-

PCR) dans le but de rechercher la présence de souches de *E. coli* O26 selon le protocole décrit ultérieurement (DebRoy et *al.*, 2004)

1.2 Méthodes

a) Schéma de l'étude *in situ*

Cette étude a été menée en 2 parties. La première partie des expérimentations s'est intéressée au devenir des 3 souches de *E. coli* O26 lors d'une contamination au moment de la mise en silos et en présence de divers inoculants. Cette partie a été nommée Etude *in situ* 1 tout au long de ce travail. La 2^{ème} partie des expérimentations a été menée afin d'évaluer le devenir de ces mêmes souches de *E. coli* dans le cas d'une contamination à l'ouverture des silos à différents stades d'aération (immédiatement après ouverture ou après 144 h d'aération). Dans ce cas, les 8 bactéries lactiques testées (Tableau 15) ont été ajoutées à l'ensilage comme des inoculants classiques c'est-à-dire au moment de la mise en silos. Cette partie a été nommée Etude *in situ* 2 tout au long de ce travail. La Figure 28 illustre le protocole d'ensemble de cette étude.

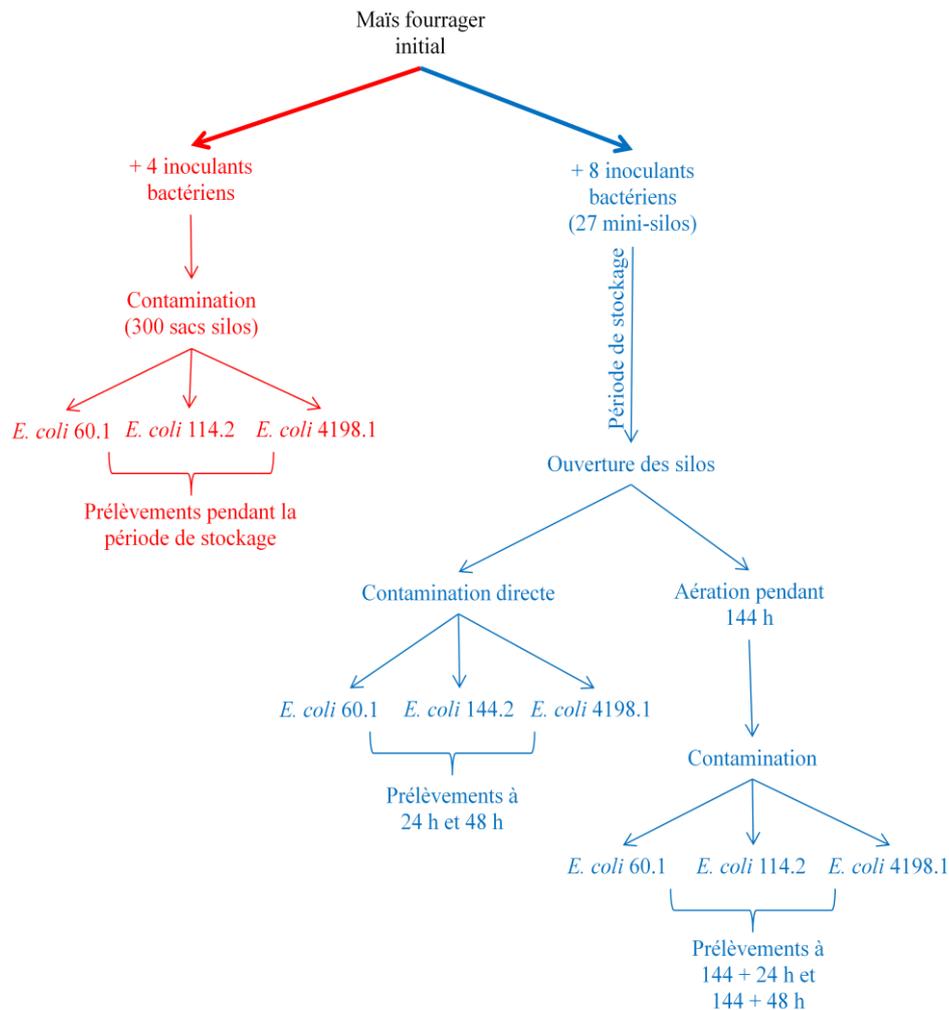


Figure 28 : Schéma récapitulatif du protocole d'ensemble suivi pour l'étude *in situ*. Les étapes constituant l'Étude *in situ* 1 sont indiquées en rouge, celles correspondant à l'Étude *in situ* 2 sont indiquées en bleues.

b) Préparation des inocula microbiens

Les bactéries lactiques ont été mises en culture dans du bouillon MRS (Biokar Diagnostic, France) et incubées à 30°C pendant 24h. Ces bactéries ont été sédimentées par centrifugation (3000 × g, 10 minutes), lavées 2 fois et resuspendues dans une solution de Tryptone Sel (TS, bioMérieux, France). Les cellules ont été ajustées à une densité optique à 600 nm de 0,8 au moyen d'un Densimat (bioMérieux, France) soit 10⁷ UFC/ml de suspension. La suspension obtenue a ensuite été soumise à des dilutions successives au 1/10^{ème} dans du TS afin d'ensemencer le maïs à un taux de 10⁶ UFC /g d'ensilage pour chaque souche. Un contrôle de la concentration bactérienne a été réalisé sur les dilutions par dénombrement sur gélose MRS (BD Difco, USA).

Les souches de *E. coli* O26 ont été mises en culture dans 10 ml de bouillon BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid, UK) et incubées à 37°C pendant 24 h. Le même protocole que celui appliqué pour les bactéries lactiques a été suivi pour atteindre un inoculum de 10⁵ UFC/g d'ensilage pour chaque souche de *E. coli*.

c) Inoculation des bactéries lactiques et des *E. coli* pour l'Etude *in situ* 1

Pour cette étude, les inoculants bactériens ayant été appliqués à l'ensilage durant la période de stockage, étaient la souche de *Propionibacterium* R0410, la souche de *Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788, la souche de *Leuconostoc mesenteroides* 6A1MLb4 ainsi qu'un mélange en proportions égales des ces 3 souches (mix). Ces 4 inoculants bactériens ont été ajoutés au maïs à la concentration choisie (10⁶ UFC/g). Deux cent cinquante grammes de maïs fourrager par traitement ont été répartis dans des bacs en plastique et chaque inoculant bactérien a été ajouté en versant 25 ml de suspension puis mélangé manuellement afin de répartir l'inoculum de manière homogène. Des témoins négatifs ont été réalisés en remplaçant l'inoculant bactérien par de l'eau. Pour chaque traitement, les 250 g de maïs ainsi inoculés ont été divisés en 3 portions égales et contaminés indépendamment à un taux de 10⁵ UFC/g des 3 souches de *E. coli* O26. Des portions de 50 g de ce maïs ainsi traité ont été transférées dans des sacs translucides de 20 × 30 cm (Boyauderie Duclos, France). L'air a été évacué des sacs par un appareil de mise sous vide (Bower 42, Henkelmann, Murin et Fouillat, France) réglé à -81 kPa pour obtenir des conditions anaérobies proches de celles retrouvées dans un ensilage. Tous les traitements ont été réalisés en triplicata et ont été stockés pendant 0, 5, 8, 21 et 90 jours à 20°C à l'abri de la lumière. Au total, 300 sacs d'ensilage ont été réalisés de cette manière (Figure 28).

d) Inoculation des bactéries lactiques et des *E. coli* pour l'Etude *in situ* 2

Les 8 inoculants bactériens (voir Tableau 15), ayant servi à la 2^{ème} partie de l'étude ont été préparés de la même manière que précédemment. Chaque inoculant a été expérimentalement ensemencé en triplicata à 2 kg de maïs répartis sur une bâche plastique en pulvérisant 200 ml de la suspension bactérienne et en mélangeant manuellement afin d'obtenir une distribution homogène de l'inoculum. Le maïs fourrager a ensuite été compacté dans des tubes cylindriques en Polyvinyle Chloride (PVC) de 2kg de contenance et permettant d'atteindre des conditions d'anaérobioses similaires à celles d'un véritable silo. Trois témoins négatifs ont été réalisés en pulvérisant de l'eau sur le maïs. Au total 27 mini-silos ont ainsi été réalisés. Les tubes étaient équipés d'une valve permettant l'évacuation des gaz produits au cours du stockage. Les minisilos ont été stockés pendant 120 jours à température ambiante (20°C). A l'ouverture des silos,

le maïs à la surface présentant des moisissures a été éliminé. Approximativement 500g d'ensilage ont été prélevés, mélangés et utilisés pour une contamination immédiate par *E. coli* O26. L'ensilage restant dans chaque mini-silo (environ 600 g) a été recouvert d'une double épaisseur de gaze pour éviter une trop forte déshydratation tout en permettant une exposition aérobie et a été stocké pendant 144 h à 20°C. L'ensilage destiné à la contamination immédiate a été réparti en 3 portions de 150 g, transféré dans un sac en plastique et contaminé de manière indépendante par 10^5 UFC/g de *E. coli* O26 60.1, 114.2 et 4198.1. Ces sacs ont été stockés à température ambiante et le pH ainsi que des dénombrements de *E. coli* et des bactéries lactiques ont été réalisés 24 h et 48 h après contamination. Le même protocole a été appliqué au reste de l'ensilage ayant subi 144 h d'aération et ayant été mélangé avant de réaliser les contaminations.

Les divers ensilages préalablement traités avec les inoculants bactériens ont donc été contaminés à 2 stades d'aération (immédiatement à l'ouverture des silos ou 144 h après) et des prélèvements ont été réalisés 24 h et 48 h après chaque contamination comme indiqué Figure 28.

e) Prélèvements, énumération et détection des microorganismes

Les analyses ont été réalisées de la même manière lors de l'Etude *in situ* 1 et 2 : pour chaque temps de prélèvement, 25 g d'ensilage ont été dilués (1:10) dans de l'eau peptonnée tamponnée (BPW, bioMérieux, France) dans un sac stomacher stérile (BagSystem 400 ml, Model+, Interscience, France) et homogénéisés pendant 30 s avec un stomacher (Stomacher Mix1, AES Laboratory, France). Des dilutions décimales successives ont ensuite été réalisées dans une solution de TS (bioMérieux, France) pour permettre le dénombrement des *E. coli* O26 et des bactéries lactiques. La concentration en *E. coli* O26 a été déterminée par étalement de 3 dilutions successives sur géloses ColiID (bioMérieux, France) complétées avec 0,05 mg/l de céfixime et 2,5 mg/l de potassium tellurite (CT, bioMérieux, France). Les géloses ont été incubées 24 h à 37°C. Les colonies violettes ont été identifiées comme *E. coli* O26. Des confirmations ont été réalisées pour détecter la présence de ces souches en amplifiant l'antigène somatique O26 par réaction de PCR en temps réel (RT-PCR) (DebRoy et al., 2004). La population totale de bactéries lactiques a été dénombrée sur gélose MRS après incubation à 30°C pendant 48 h. Ces analyses ont été réalisées au moyen d'un enseigneur spiral (WASP spiral plating, AES Laboratory, France) et le dénombrement des colonies a été réalisé par un compteur automatique de colonies (EC2, AES Laboratory, France). Lorsqu'aucune colonie n'a pu être isolée, la détection de *E. coli* O26 a été réalisée après une étape d'enrichissement du bouillon de 24 h à 37°C afin de confirmer la présence ou l'absence de la bactérie cible dans l'ensilage. Plus précisément, 1 ml du bouillon d'enrichissement a été prélevé et une séparation immunomagnétique (IMS) a été réalisée

manuellement en suivant les recommandations du fournisseur (Dynabeads, Invitrogen, France). Les billes éluées ont ensuite été déposées sur gélose Sorbitol MacConkey (SMAC, bioMérieux, France) et incubées 24 h à 37°C. Les colonies présomptives de *E. coli* O26 ont été analysées par RT-PCR de la même manière que précédemment afin de s'assurer que les colonies isolées appartenaient bien au sérotype O26. En parallèle, une extraction d'ADN génomique à partir d'un millilitre de bouillon d'enrichissement a été réalisée avec l'automate EZ1 selon les recommandations du fabricant (bioMérieux, France) et la présence de l'antigène somatique O26 a été recherchée dans cet échantillon par RT-PCR.

f) Analyses physico-chimiques

La matière sèche (MS) de chaque échantillon a été déterminée par séchage de 10 g d'ensilage au four pasteur à 105°C pendant 24h conformément au protocole décrit par Bach *et al.* (2002). Les mesures de pH ont été déterminées directement au moyen d'un pHmètre (WTW, pH330, Weilheim, Germany) à chaque temps d'échantillonnage. Pour l'Etude *in situ* 1, la concentration en acide D- et L-lactique a été déterminée sur 25 g d'ensilage issus des témoins négatifs en utilisant une électrophorèse capillaire. Les concentrations en Acides Gras Volatils (AGV) ont été obtenues par chromatographie en phase gazeuse. Ces analyses ont été réalisées par la société Laréal, France. Pour l'Etude *in situ* 2, 200 g d'ensilage ont été réservés à l'ouverture de chaque mini-silos afin d'être analysés par la société Inzo (France). Les paramètres analysés étaient : les teneurs en matière sèche, matières minérales, protéines, cellulose, amidon, sucres solubles, fibres (NDF neutral detergent fiber, ADF acid detergent fiber), lignine, la digestibilité de la cellulase, le pH, les concentrations en acides acétique, lactique, propionique et butyrique, la digestibilité de la matière organique, les unités fourragères (UFL et UFB), les teneurs en azote ruminal, en protéines digestibles dans l'intestin (PDIA), en glucides ruminants ainsi que les unités d'encombrement (UEL et UEB).

Les Unités Fourragères sont classées en 2 catégories selon les tables INRA 2010. Les Unités Fourragères « Lait » (UFL) sont définies comme la quantité d'énergie nette pour la production laitière contenue dans un kilogramme d'orge de référence (870 g de matière sèche ; 2700 kcal d'énergie métabolisable). Les Unités Fourragères « Viandes » (UFV) sont définies comme la quantité d'énergie nette contenue dans un kilogramme d'orge de référence pour l'entretien et le croît chez l'animal à l'engrais, à un niveau de production de 1,5. Par définition l'herbe jeune et feuillue a une valeur d'encombrement de 1 unité par kilogramme de matière sèche chez les bovins (UEB), les ovins (UEM) et les vaches et chèvres laitières (UEL). Cette herbe est un aliment

de référence présentant un taux de matière azotée totale de 15 % de MS et une digestibilité de la matière organique de 77 %.

g) Analyses statistiques

Pour l'Etude *in situ* 1, une analyse de variance (ANOVA) utilisant le facteur « agent d'ensilage » avec 5 modalités (NCIMB 40788, R0410, 6A1MLb4, mix et eau) a été réalisée pour identifier une différence significative entre les dénombrements de bactéries lactiques après 90 jours en fonction de l'inoculant testé.

Pour l'Etude *in situ* 2, le même test avec 9 modalités (8 inoculants bactériens et l'eau) a été réalisé pour les dénombrements de bactéries lactiques, 48 h après contamination aux 2 temps d'aération. L'hypothèse d'une différence significative en fonction des inoculants utilisés a aussi été testée pour les résultats des différents paramètres physico-chimiques obtenus à l'ouverture des silos.

Les analyses statistiques ont été réalisées au moyen du logiciel R (R Development Core Team & R foundation for statistical computing, 2011). Une différence significative a été définie par une *P*-value de moins de 0,05. Lorsque nécessaire, la moyenne de valeurs de pH, des dénombrements de bactéries lactiques ou des résultats physico-chimiques a été indiquée avec l'écart-type entre parenthèses.

2. Résultats

Aucune souche de *E. coli* O26 n'a été détectée avant les contaminations expérimentales du maïs fourrager initial. En effet, aucune colonie violette n'a été observée sur gélose ColiID et les réactions de RT-PCR pour la présence de l'antigène somatique O26 dans le bouillon d'enrichissement étaient négatives.

2.1 Etude *in situ* 1 : Devenir des *E. coli* O26 pendant la période de stockage en présence de divers inoculants bactériens.

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'ordre suivant : les résultats des analyses physico-chimiques sont tout d'abord abordés, puis l'évolution des populations de bactéries lactiques et des souches de *E. coli* est décrite.

a) Evolution des paramètres physico-chimiques

L'évolution du pH était similaire dans tous les sacs-silos (Figure 29).

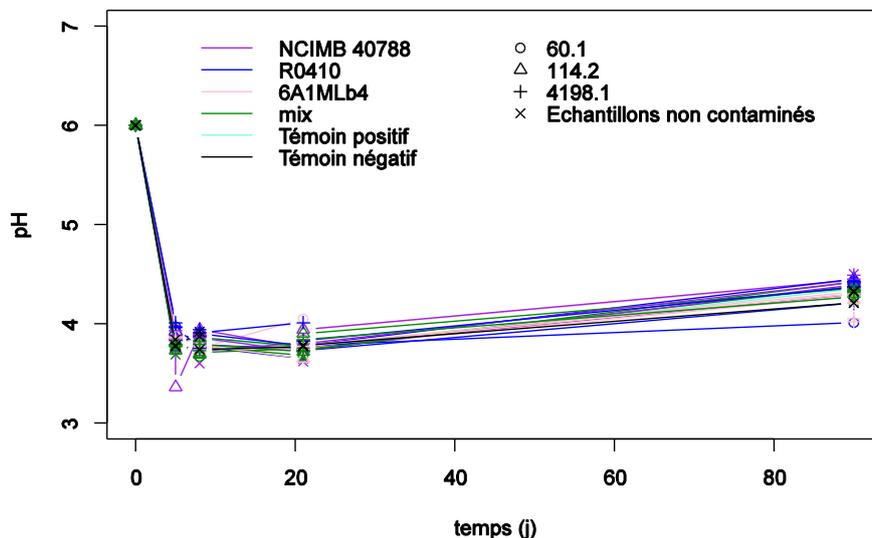


Figure 29 : Evolution des valeurs de pH dans les différents sacs-silos au cours de la période de stockage. Les valeurs de pH dans les silos contenant les inoculants bactériens sont représentées en couleur et la contamination par les différentes souches de *E. coli* dans ces silos est indiquée par des symboles différents.

Le pH initial du maïs était de 6,0. Au début de la fermentation, le pH a baissé de manière brutale jusqu'à des valeurs inférieures à 4 dès le 5^{ème} jour. Les valeurs de pH ont légèrement augmenté par la suite en passant de 3,85 (\pm 0,1) au jour 5 à 4,33 au jour 90 (\pm 0,1). Dans les échantillons témoins, la concentration en acide lactique semble corrélée à l'évolution des valeurs de pH. Une très forte augmentation de la concentration en acide lactique a été observée entre une concentration de 4,5 g/kg de MS dans le maïs fourrager initial et jusqu'à 46,28 g/kg de MS au 21^{ème} jour. Une faible diminution pendant la dernière partie du stockage a pu être observée et la concentration d'acide lactique a finalement atteint une valeur de 41,35 g/kg de MS au 90^{ème} jour. Les profils d'AGV ont montré la même évolution : l'acide acétique a été produit avec un pic de 11,83g/kg de MS au 21^{ème} jour après la mise en silo et la concentration finale était de 10,7 g/kg de MS en fin de période de stockage. Les autres AGV dosés (acide propionique, acide butyrique et isobutyrique, acide valérique et isovalérique) étaient à des taux inférieurs à la limite de détection de l'appareil ($<$ 0,1 g/kg) tout au long de la période de stockage. L'évolution de la matière sèche était similaire dans tous les sacs-silos (Figure 30).

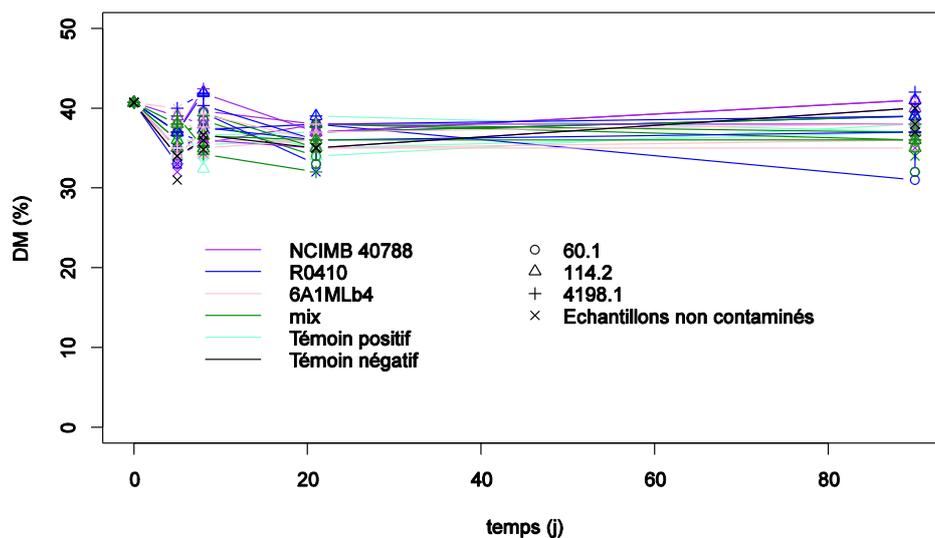


Figure 30 : Evolution de la teneur en matière sèche dans les différents sacs-silos au cours de la période de stockage. Les valeurs de pH dans les silos contenant les inoculants bactériens sont représentées en couleur et la contamination par les différentes souches de *E. coli* dans ces silos est indiquée par des symboles différents.

Une faible diminution de la MS a pu être observée au cours des 90 jours de stockage en passant d'une teneur de 40,7 % dans le maïs fourrager initial à 37,7 % (\pm 2,27) en fin de stockage.

b) Evolution de la population de bactéries lactiques.

Les dénombrements de bactéries lactiques ont montré des valeurs comparables entre les différents sacs-silos au cours du temps et ont augmenté de $7,26 \log_{10}$ UFC/g ($\pm 6,97 \log_{10}$ UFC/g) à $8,4 \log_{10}$ UFC/g ($\pm 7,89 \log_{10}$ UFC/g) en 8 jours (Figure 31). La charge en bactéries lactiques a ensuite légèrement décliné. Les dénombrements de bactéries lactiques dans les ensilages préalablement inoculés avec *Propionibacterium* R0410, *Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788 et *Leuconostoc mesenteroides* 6A1MLb4 sont apparus proches de ceux des ensilages contenant uniquement les bactéries lactiques endogènes du maïs fourrager initial, et ce, tout au long de la période de stockage. Cependant après 90 jours, les taux de bactéries lactiques dénombrés étaient plus importants dans certains sacs-silos mais aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les ensilages avec ou sans inoculant bactérien. (P-value > 0,05).

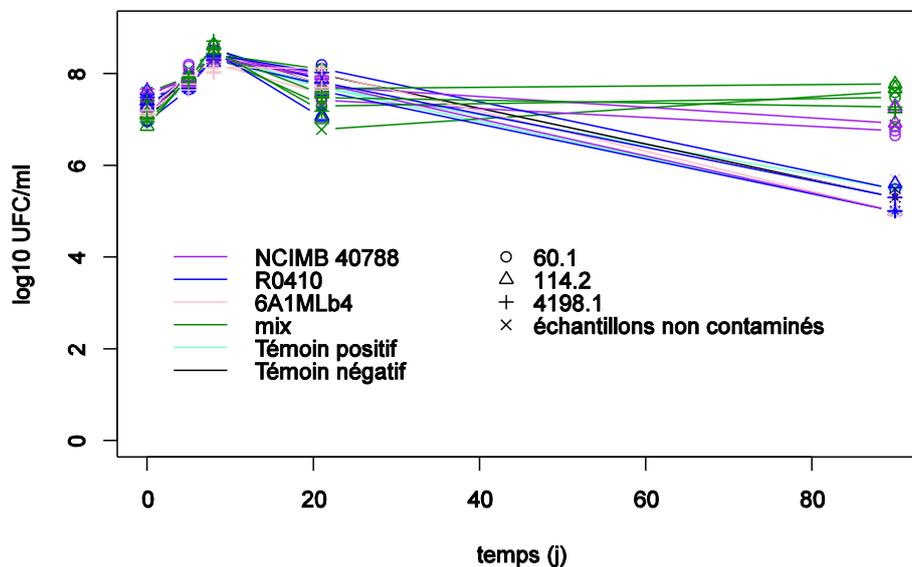


Figure 31 : Dénombrement de la population totale de bactéries lactiques dans les différents sacs-silos au cours de la période de stockage.

c) Evolution des souches de *E. coli* O26

Les dénombrements et la détection des *E. coli* O26 expérimentalement contaminés ont été réalisés aux jours 0, 5, 8, 21 et 90 après la mise en silo. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Dénombrement et détection des souches de *E. coli* O26 dans les différents sacs-silos aux jours 0, 5, 8, 21 et 90 après mise en silo (n=3).

<i>E. coli</i> O26	Inoculum	Détection				
		0 jour	5 jours	8 jours	21 jours	90 jours
60.1	-	2.57E+04	2 / 3	3 / 3	0 / 3	0 / 3
114.2	-	2.04E+04	1 / 3	2 / 3	0 / 3	0 / 3
4198.1	-	4.17E+04	3 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
60.1	R0410	7.33E+04	3 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
	NCIMB 40788	1.80E+05	3 / 3	1 / 3	0 / 3	0 / 3
	6A1MLb4	1.43E+05	2 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
	Mix	5.28E+05	3 / 3	3 / 3	0 / 3	0 / 3
114.2	R0410	1.83E+05	2 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
	NCIMB 40788	2.27E+05	3 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
	6A1MLb4	2.07E+05	3 / 3	1 / 3	0 / 3	0 / 3
	Mix	4.00E+05	3 / 3	1 / 3	0 / 3	0 / 3
4198.1	R0410	1.70E+05	1 / 3	1 / 3	0 / 3	0 / 3
	NCIMB 40788	4.95E+05	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
	6A1MLb4	2.33E+05	1 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
	Mix	7.36E+05	1 / 3	3 / 3	0 / 3	0 / 3

La détection des souches de *E. coli* O26 a été réalisée après enrichissement par réaction de RT-PCR en recherchant la présence de l'antigène O26. (2/3) : nombre de signaux positifs détectés / nombre d'essais réalisés.

Entre le 1^{er} et le 5^{ème} jour, une diminution importante de la concentration en *E. coli* O26 a été observée dans tous les silos. En effet, au 5^{ème} jour, la plupart des dénombrements se situaient en dessous du seuil de 100 UFC/g d'ensilage. Bien qu'aucune souche de *E. coli* O26 n'ait pu être isolée, l'antigène somatique O26 a été amplifié par RT-PCR dans tous les silos, exceptés ceux préalablement inoculés avec la souche de *Lactobacillus buchneri* NCIMB 40 788 et contaminés par la souche O26 4198.1. Au 8^{ème} jour, l'antigène somatique O26 a été détecté par observation de signaux PCR dans les silos traités avec le mélange d'inoculants bactériens (mix). Dès le 21^{ème} jour, plus aucun signal concernant *E. coli* O26 n'a été détecté dans les ensilages après enrichissement. Les mêmes résultats ont été observés à la fin de la période de stockage (90^{ème} jour). Aucune tendance particulière n'a été observée concernant l'évolution des 3 souches de *E. coli* O26 testées pendant la période de stockage en fonction des différents inoculants employés (R4010, NCIMB 40788, 6A1MLb4 ou mix).

2.2 Etude *in situ* 2 : Devenir des *E. coli* O26 dans des ensilages de maïs préalablement traités avec divers inoculants bactériens lors d'une contamination à l'ouverture des silos.

La présentation des résultats de cette Etude *in situ* 2 commence par une description des paramètres physico-chimiques analysés, suivie par la présentation des analyses microbiologiques lors des 2 étapes de contaminations : contamination immédiate à l'ouverture des silos ou après aération.

a) Analyses physico-chimiques et nutritionnelles des ensilages à l'ouverture

A l'ouverture, les valeurs de pH pour tous les silos étaient d'environ 4,43 ($\pm 0,1$) excepté pour un des silos inoculés avec la souche hétérofermentaire d'*Enterococcus* 11A1FLb21. Ce silo présentait en effet, une valeur de pH très élevée (pH 8,03). Les résultats liés à ce silo en particulier ont été exclus de l'analyse nutritionnelle. L'analyse des valeurs nutritionnelles est présentée dans le Tableau 18, et peu de différences entre les silos ont été observées. Les différences significatives sont identifiées par une lettre dans la dernière colonne dont la signification est indiquée en bas du tableau.

Tableau 18 : Valeurs nutritionnelles moyennes des mini-silos et *P*-value des inoculants testés.

Paramètres	Unités	Moyenne (n = 26)	<i>P</i> -value < 0,05
Matière sèche (MS)	%	39,42 (± 0,80)	ns
Azote ammoniacal/azote total	% de MS	4,00 (± 0,91)	A
pH	-	4,42 (± 0,14)	ns
Acide acétique	g/kg de MS	10,91 (± 4,02)	A
Acide butyrique	g/kg de MS	< 0,05	ns
Acide lactique	g/kg de MS	52,31 (± 6,07)	B
Acide propionique	g/kg de MS	< 0,05	ns
Matières minérales	% de MS	4,50 (± 0,35)	ns
Protéines	% de MS	7,35 (± 0,19)	ns
Cellulose	% de MS	16,34 (± 0,75)	ns
Amidon	% de MS	41,01 (± 1,77)	ns
NDF	% de MS	34,37(± 1,41)	ns
Digestibilité cellulase/MS	% de MS	76,79 (± 1,05)	ns
Sucres solubles	% de MS	0,11 (± 0,28)	ns
ADF	% de MS	18,19 (± 0,91)	ns
ADL	% de MS	1,45 (± 0,22)	C
PDIA	g/kg de MS	16,01 (± 0,47)	ns
Glucides ruminiaux	g/kg de MS	442,36 (± 9,20)	ns
Azote ruminal	g/kg de MS	50,16 (± 1,30)	ns
UEL	/kg de MS	0,88 (± 0,02)	ns
UEB	/kg de MS	0,95 (± 0,01)	ns
DMO	% de MS	75,29 (± 0,43)	ns
UFL	/kg de MS	0,97 (± 0,01)	ns
UFV	/kg de MS	0,88 (± 0,01)	ns

A : différence significative entre les valeurs obtenues pour les silos traités avec les souches *Lb. buchneri* NCIMB 40788, *Lb. plantarum* E09 et *Lc. garviae* M15L comparés à tous les autres silos ; B : différence significative entre les valeurs obtenues pour les silos traités avec la souche *Lc. garviae* M15L comparés avec les silos traités avec les souches *Ln. mesenteroides* 6A1MLb4 et *Lb. sakei* FB32 ; C : différence significative entre les valeurs obtenues pour les silos traités avec la souche *Lb. plantarum* E09 et ceux avec la souche *Enterococcus faecium* 17V ainsi que entre les silos traités avec *Lb. sakei* FB 32 et les témoins négatifs ; ns : non significatif, les différences observées n'étaient pas significatives au seuil de 5%.

La Figure 32 montre les valeurs nutritionnelles attendues pour un ensilage de maïs de très bonne qualité selon les Tables INRA de 2010 ainsi que les valeurs obtenues pour les mini-silos réalisés lors de cette étude. Toutes les valeurs n'ont pu être comparées par manque de données de références.

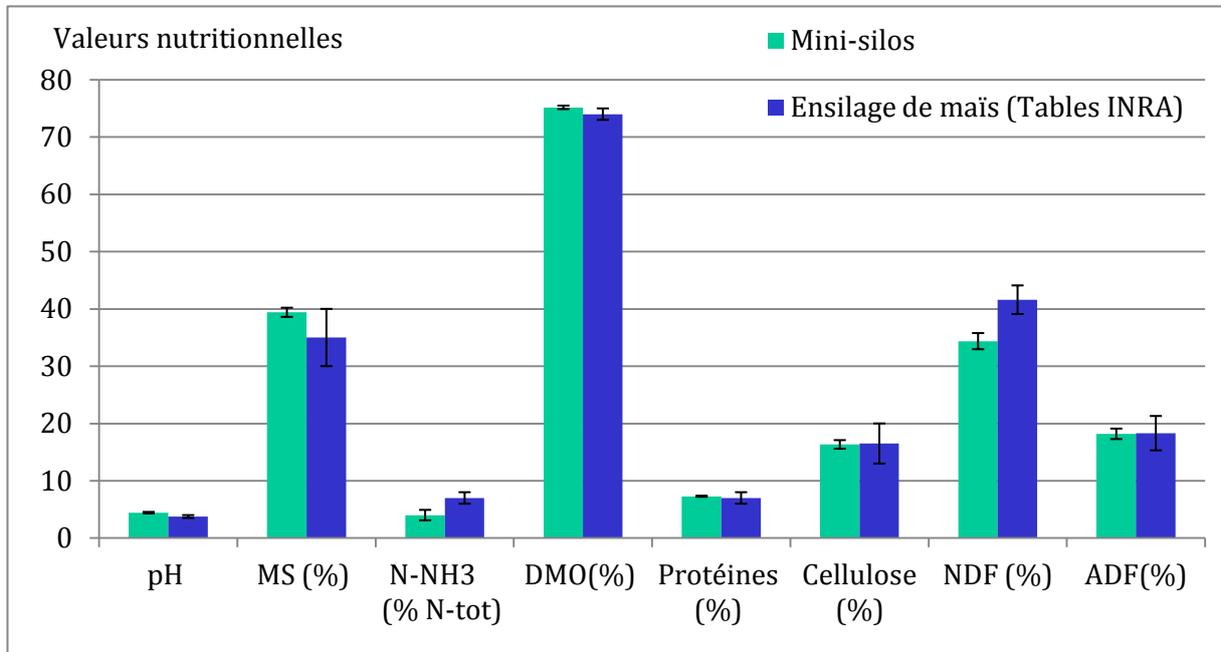


Figure 32 : Histogramme comparatif des valeurs nutritionnelles attendues pour un ensilage de maïs de très bonne qualité (INRA 2010) et valeurs moyennes obtenues dans les mini-silos (n = 26).

Les mini-silos réalisés lors de cette étude étaient donc de bonne qualité nutritionnelle quel que soit l'inoculant testé. Selon les Tables (INRA 2010), les teneurs en acides organiques devraient être supérieures à 47 g/kg de MS pour l'acide lactique, aux alentours de 11 g/kg de MS pour l'acide acétique et très faibles pour les acides propionique et butyrique, ce qui est tout à fait comparable avec les valeurs obtenues lors de ce travail. Les teneurs en acides organiques obtenues traduisent donc une bonne fermentation au sein des ensilages tout au long de la période de stockage. De plus, les unités fourragères et unités d'encombrement apparaissent très proches de la valeur de référence 1, rendant ainsi compte de la bonne qualité nutritionnelle des différents silos. Un des paramètres les plus importants pour évaluer la qualité d'un ensilage est le pH qui doit se situer aux alentours de 4.

b) Contamination directe à l'ouverture des silos

Les valeurs de pH des différents silos ont légèrement augmenté au cours des 48 h qui ont suivi la contamination par les souches de *E. coli* O26, mais la plupart sont restées en dessous d'un pH de

6 (Figure 33). Les mini-silos préalablement inoculés avec les bactéries lactiques homofermentaires *Lb. plantarum* E09 et *E. faecium* 17v ainsi que les souches hétérofermentaires *Lb. sakei* FB32, *Ln. mesenteroides* 6A1MLb4 et *Propionibacterium* R0410 ont présenté des valeurs de pH très basses au cours de ces 48 h. Le silo C inoculé avec la souche *Enterococcus* 11A1FLb21 a présenté des valeurs de pH beaucoup plus élevées que tous les autres silos (Figure 33c).

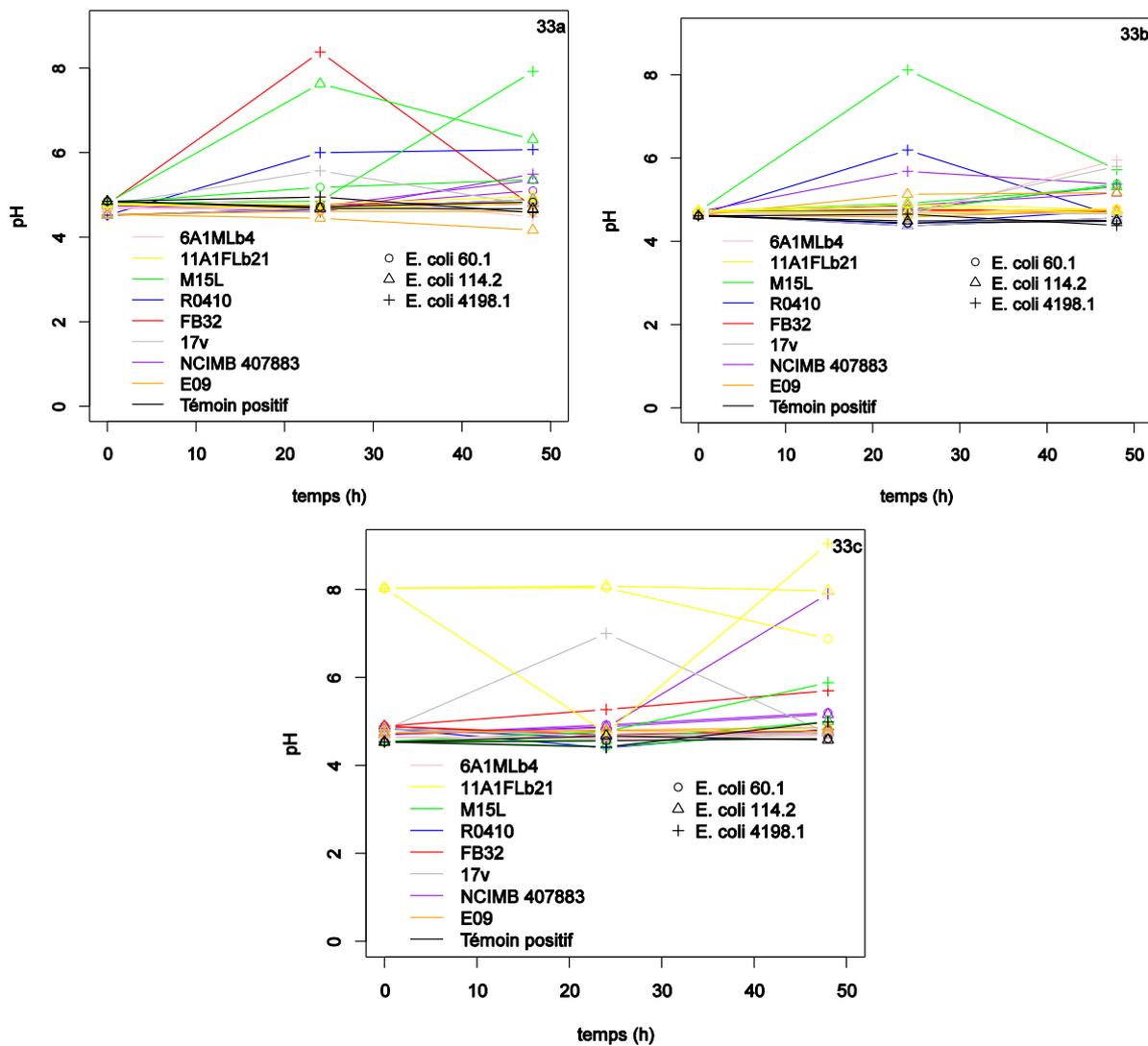


Figure 33 : Evolution des valeurs de pH au cours des 48 premières heures après ouverture dans les silos A (33a), B (33b) et C (33c), contaminés avec les 3 souches de *E. coli* 60.1, 114.2 et 4198.1.

La population totale de bactéries lactiques a évolué de la même manière entre les différents silos. La population était comprise entre $8,98 \times 10^5$ UFC/g et $3,6 \times 10^6$ UFC/g à l'ouverture et a été dénombrée entre $7,4 \times 10^5$ UFC/g et $2,4 \times 10^7$ UFC/g au cours de 48 h suivantes. Des évolutions aléatoires ont été observées en fonction des silos. La population totale de bactéries lactiques a montré une légère décroissance au cours des 48 h de prélèvement dans les ensilages préalablementensemencés avec *Leuconostoc mesenteroides* 6A1MLb4 et *Propionibacterium* R0410 et contaminés par la suite avec la souche de *E. coli* O26 114.2. Le même constat a pu être fait pour les silos non inoculés par les bactéries lactiques et contaminés avec la souche *E. coli* 4198.1. La concentration en bactéries lactiques totale a augmenté dans les autres silos. De même que pendant la période de stockage, aucune différence significative dans les dénombrements de bactéries lactiques n'a été observée 48 h après contamination entre les silos traités avec les différents inoculants bactériens et les silos témoins négatifs contenant uniquement les bactéries lactiques endogènes (P-value > 0,05).

Vingt-quatre heures après la contamination, la plupart des dénombrements de *E. coli* étaient en dessous du seuil de 100 UFC/g d'ensilage, cependant les souches étaient détectées après enrichissement par RT-PCR. Les résultats obtenus sont présentés Tableau 19.

Tableau 19 : Dénombrement et détection des souches de *E. coli* O26 dans les mini-silos 24 et 48 heures après contamination à l'ouverture (n=3).

		Dénombrement (log ₁₀ UFC/g) ou détection par RT-PCR (+ ou -)								
Temps	Echantillon\ <i>E. coli</i>	60.1			114.2			4198.1		
		silos A	silos B	silos C	silos A	silos B	silos C	silos A	silos B	silos C
24 h	Témoin négatif	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6A1MLb4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	R0410	+	+	+	+	+	+	5,72	+	+
	NIMB 40788	+	+	+	+	+	+	4,56	1	+
	11A1FLb21	+	+	5,84	+	+	5,7	+	+	5,09
	17v	+	+	+	+	3,92	+	+	5,14	+
	FB32	+	+	+	+	+	+	+	+	4,31
	E09	+	+	+	+	5,29	+	+	5,41	+
	M15L	4,81	+	+	5,61	+	3,51	5,73	2,51	4,9
48 h	Témoin négatif	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	6A1MLb4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R0410	-	-	-	+	-	-	+	-	4,54
	NCIMB 40788	-	+	+	+	+	+	4,23	1,83	+
	11A1FLb21	-	-	5,34	+	-	4,7	-	-	4,76
	17v	+	-	-	-	1,85	-	-	-	+
	FB32	-	-	-	-	-	-	-	-	3,73
	E09	+	-	-	-	4,49	-	-	4,81	2,47
	M15L	3,99	+	-	5,3	+	2,31	4,69	0,52	4,27

La détection de souches de *E. coli* O26 a été réalisée après enrichissement par RT-PCR ciblant l'antigène O26 : (+) signifie qu'un signal positif a été détecté ; (-) aucun signal n'a été détecté.

Quarante huit heures après contamination, les souches de *E. coli* O26 étaient moins fréquemment détectées. Les souches de *E. coli* isolées des silos après 24 h l'étaient encore après 48 h. Les ensilages préalablement traités avec la souche de *Leuconostoc mesenteroides* 6A1MLb4 étaient les seuls silos pour lesquels aucune des 3 souches de *E. coli* O26 n'a pu être détectée pour chaque répétition (Tableau 19). Aucun des autres inoculants bactériens testés n'a montré le même effet sur la survie des 3 souches de *E. coli* O26. La souche 4198.1 est la souche la plus fréquemment isolée des différents silos aux 2 temps de prélèvement avec des dénombrements allant de 0,52 log₁₀ UFC/g à 4,81 log₁₀ UFC/g. Les silos inoculés préalablement avec les souches *Lactococcus garviae* M15L (silos A, B et C) et *Enterococcus* 11A1FLb21 (silo C) ont montré une

bonne survie des différentes souches de *E. coli* testées au cours des 48 h de prélèvement (Tableau 19).

c) Contamination après 144 h d'aérobiose

Après 144h d'exposition aérobie, les valeurs de pH dans la plupart des silos ont montré une importante augmentation pour atteindre 7,16 ($\pm 1,16$). Vingt quatre heures plus tard (144 h + 24 h), le pH moyen de l'ensilage a légèrement diminué à pH 6,92 ($\pm 0,84$) et a finalement atteint des valeurs de 6,77 ($\pm 0,84$) à 144 h + 48 h. Les silos caractérisés par des valeurs de pH basses au cours des 48 h après la 1^{ère} contamination, étaient les silos préalablement inoculés avec les souches de bactéries lactiques *Ln. mesenteroides* 6A1MLb4, *Propionibacterium* R0410, *E. faecium* 17v, *Lb. sakei* FB32 ainsi que le silo témoin. Ces mêmes silos ont présenté des valeurs de pH plus faibles après 144 h d'aérobiose : pH 6,29 ($\pm 0,53$). Les teneurs en matière sèche étaient similaires dans tous les silos et ont montré une augmentation durant les 144 h d'exposition aérobie en atteignant une valeur finale moyenne de 50,9 % ($\pm 0,73$ %).

L'évolution de la population totale de bactéries lactiques après 144 h d'aérobiose était similaire dans tous les silos et comparable à l'évolution observée au cours de 48 premières heures après ouverture. La population était comprise entre 10^6 UFC/g et 10^8 UFC/g à 144 h et est restée stable au cours des 48 h suivantes.

Aucune différence significative n'a été observée 48 h après contamination (P-value > 0,05). Les 3 souches de *E. coli* inoculées ont pu être dénombrées dans tous les silos au cours des 48 h d'échantillonnage (Figure 34).

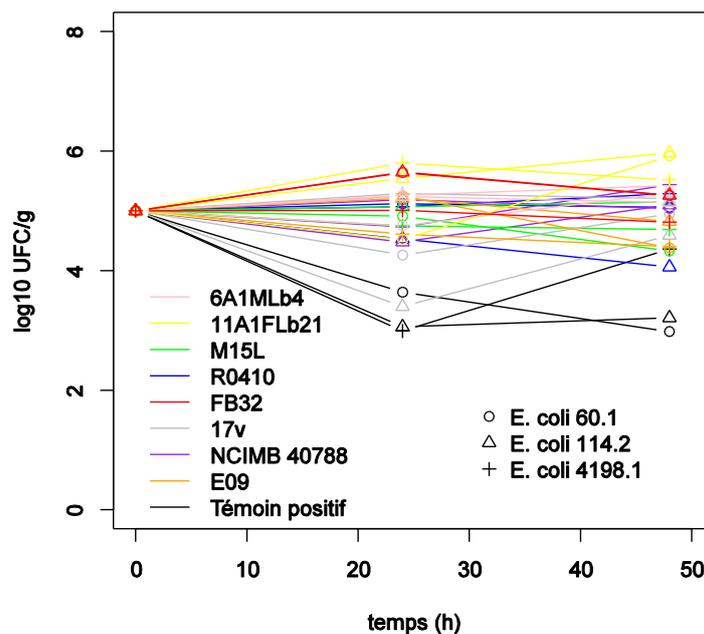


Figure 34 : Moyenne des dénombrements des souches de *E. coli* 60.1, 114.2 et 4198.1 dans les silos préalablement traités avec diverses souches de bactéries lactiques lors d'une contamination 144 h après ouverture (n = 3).

Aucune différence significative de dénombrements des contaminants n'a été mise en évidence après une période d'exposition aérobie exceptée pour la souche 60.1 dont les dénombrements étaient significativement plus importants dans les silos inoculés avec la souche *Enterococcus* 11A1FLb21 que dans les silos témoins. Une croissance des 3 souches de *E. coli* a pu être observée dans les ensilages préalablement inoculés avec 11A1FLb21 alors que dans tous les autres silos, la concentration de souches de *E. coli* est restée stable ou a légèrement diminué (Figure 34). En moyenne, les contaminants ont été dénombrés à des taux allant de 2,98 \log_{10} UFC/g à 5,97 \log_{10} UFC/g d'ensilage.

3. Discussion

Les ensilages peuvent être contaminés par de nombreux microorganismes pathogènes et notamment par les STEC *via* l'eau d'irrigation, le fumier ou la terre (Weinberg *et al.*, 2004). Le respect de méthodes inspirées de la démarche HACCP ainsi que des Bonnes Pratiques d'Ensilage doit être appliqué aux diverses cultures fourragères ainsi qu'aux aliments pour animaux en général (Weinberg *et al.*, 2004). Le nettoyage des équipements est un des points permettant de réduire de manière significative la contamination et la dissémination des pathogènes au sein des élevages. Cependant, un autre point critique serait de maîtriser l'implantation des STEC dans les ensilages afin de limiter leur possible dissémination dans la chaîne alimentaire humaine. Selon les bonnes pratiques de fabrication, un délai d'au minimum 4 semaines doit être respecté entre l'épandage de fumier et la récolte des cultures afin de limiter la présence de bactéries butyriques dans les ensilages. Cette mesure préventive pourrait également être appliquée afin de limiter la présence de STEC. L'élimination de souches de *E. coli* ou *E. coli* O157 a été démontrée précédemment pendant la période de stockage d'ensilages de maïs et d'herbe (Bach *et al.*, 2002; Byrne *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005; Pedroso *et al.*, 2010). Cependant, seuls Pedroso *et al.* (2010) ont étudié le devenir des *E. coli* O157:H7, qui est le sérotype de STEC le plus fréquemment associé à des épidémies, dans des ensilages à l'ouverture des silos. Bien que des souches appartenant à d'autres sérogroupes, notamment au séro groupe O26, soient de plus en plus associées à des maladies diarrhéiques, aucune information n'est actuellement disponible concernant la survie et le comportement de souches de *E. coli* pathogènes appartenant à des sérogroupes non-O157. Notre étude avait pour objectif d'évaluer le devenir de souches de *Escherichia coli* O26 dans des ensilages de maïs ainsi que le potentiel de divers inoculants bactériens à contrôler le développement de ces pathogènes. Dans la première partie de cette étude, les contaminations expérimentales de l'ensilage de maïs ont été réalisées au moment de la mise en silo (Etude *in situ* 1). Dans la deuxième partie, les contaminations ont eu lieu après l'ouverture des silos, à deux étapes d'exposition aérobie (Etude *in situ* 2). De ce fait, la discussion ci-dessous portant sur la totalité de l'étude *in situ* aborde tout d'abord, les différents points importants de l'Etude *in situ* 1 puis ceux de l'Etude *in situ* 2.

Le maïs initial présentait une teneur en MS de 40,7%, ce qui correspond à l'étape de maturité ultime pour l'ensilage de maïs. L'ajout d'inoculants bactériens dilués dans une solution de TS peut entraîner une baisse de la valeur de MS au moment de la mise en silo. Les faibles fluctuations de MS observées lors de cette étude présentent les mêmes caractéristiques que celles d'un ensilage bien conservé. En effet, une forte teneur en MS en fin de stockage implique

de faibles pertes dues aux effluents. En effet, ceux-ci auraient pu entraîner des sucres solubles, de l'azote, des minéraux ou encore une partie des inoculants ajoutés (AFSSA, 2004).

Les trois souches de *E. coli* testées dans ce Chapitre 5 (issues de l'environnement et de produits laitiers) appartiennent au sérotype O26. Ce sérotype est de plus en plus fréquemment associé à des infections à STEC chez les humains (Caprioli et al., 1997). Il est également couramment retrouvé dans des populations de bovins (Jenkins et al., 2008). Bien que les souches utilisées soient négatives pour les gènes *stx*, elles possèdent toutes le gène *eae*, codant pour la protéine d'adhésion intimine. Les souches 60.1 et 114.22 possèdent également le gène *fliC* codant pour l'antigène flagellaire H11. Ces souches sont considérées comme potentiellement pathogènes, plus précisément il s'agit de souches AEEC (Attaching and Effacing *E. coli*) (AFSSA, 2010) représentant une préoccupation majeure. Ces souches de *E. coli* ont également été choisies en fonction de l'étude précédente (voir Chapitre 4), pour leur résistance accrue à l'inhibition par les bactéries lactiques lors de co-inoculations *in vitro*. Le niveau de contamination par *E. coli* utilisé (1×10^5 UFC /g) est élevé par rapport à une contamination naturelle. Ce taux a été choisi afin de visualiser clairement une diminution du nombre de pathogènes au cours des expérimentations.

Le processus d'ensilage est basé sur une fermentation lactique due à des bactéries lactiques épiphytes. L'ajout d'inoculants bactériens dans l'ensilage est destiné à assurer une accumulation plus rapide des acides organiques durant la période de stockage. Le principal acide organique produit par les agents microbiens d'ensilage ainsi que les bactéries lactiques endogènes est l'acide lactique. Ce dernier est responsable de la forte diminution de pH traditionnellement observée dans les silos. Filya et al. (2004) ont démontré que l'acide lactique pourrait être utilisé comme substrat par des levures en cas d'anaérobiose insuffisante, entraînant ainsi une détérioration des ensilages. Il a été prouvé que les acides à chaîne courte, tels que l'acide acétique, inhibaient la croissance des levures et moisissures dans l'ensilage et participaient à sa conservation (Driehuis & Oude Elferink, 2000; AFSSA, 2004; Filya et al., 2006). A l'inverse, le fait de détecter de l'acide butyrique dans des ensilages est un signe de fermentation due à des microorganismes indésirables devant absolument être évitée. Les trois inoculants bactériens testés dans cette Etude *in situ* 1 sont connus pour leur métabolisme hétérofermentaires. *Lactobacillus buchneri* est reconnu comme étant un agent microbien d'ensilage très efficace pour améliorer la stabilité aérobie (Driehuis et al., 1999). Cette espèce partage des voies métaboliques communes avec *Propionibacterium* sp et fermente notamment les sucres et le lactate en acétate et propionate (Higginbotham et al., 1998). *Leuconostoc mesenteroides* est une espèce capable de produire du lactate, de l'acétate, de l'éthanol et du

diacétyle. Ces composés sont considérés comme des métabolites antimicrobiens (Rouse & van Sinderen, 2008). Ces souches de bactéries lactiques ont été choisies pour leur capacité à inhiber la croissance de la plupart des STEC lors de co-inoculations *in vitro* bien que certaines d'entre elles ne soient pas habituellement considérées comme des additifs microbiens d'ensilage (voir Chapitre 4).

Lors de l'Etude *in situ* 1, la contamination par les souches de STEC a eu lieu au moment de la mise en silo. Les résultats ont montré que 1×10^5 UFC / g de *E. coli* O26 ont pu être éliminés de l'ensilage de maïs en 5 jours. Cette observation peut être reliée à l'évolution du pH au sein des silos. La diminution du pH est en effet due à la production de divers acides organiques par les populations de bactéries lactiques (AFSSA, 2004). Les acides organiques non dissociés sont capables de passer à travers la membrane bactérienne et peuvent conduire à la mort de la cellule bactérienne (Roe et al., 2002; Hirshfield et al., 2003). L'acide lactique, connu pour être le plus efficace pour inhiber la croissance de souches de *E. coli* pathogènes *in vitro* (Buchanan & Edelson, 1999), est le principal acide produit dans l'ensilage (AFSSA, 2004). De possibles changements dans l'intégrité ou la composition de la membrane cellulaire pourraient apparaître chez certaines souches de *E. coli* au cours de la période de stockage. Ces changements, préjudiciables à la cellule, pourraient limiter sa survie et expliquer en partie les différences observées entre les souches de STEC. Toutes les souches de *E. coli* testées au cours du présent travail possèdent le gène *rpoS*, connu pour contrôler de nombreux gènes liés aux stress tels que ceux impliqués dans les réponses aux stress acides (Bhagwat et al., 2005; Coldewey et al., 2007) ainsi que dans le système de résistance à l'acidité glutamate-dépendant. En dépit du fait que les souches testées présentent des mécanismes de résistance à l'acidité, la charge en *E. coli* O26 a très fortement diminué au début de la période de stockage dans les divers silos. Ce phénomène peut être relié à la rapidité de diminution du pH. La légère augmentation de pH observée à la fin de la période de stockage dans les sacs-silos est probablement due au développement de microorganismes hétérofermentaires transformant l'acide lactique en acides plus faibles tels que les AGV. Les caractéristiques physico-chimiques (AGV, pH) obtenues dans les sacs-silos pendant la période de stockage étaient caractéristiques d'un processus d'ensilage correctement mené (AFSSA, 2004; INRA, 2010) : la concentration en acide lactique était d'environ 47 g/kg de MS, 11g/kg de MS pour l'acide acétique, les acides butyrique et iso-butyrique n'ont pas été détectés, enfin le pH était proche de 4. Le pH final est resté faible jusqu'à la fin de la période de stockage et n'a pas permis la survie des souches de *E. coli* O26 testées. Par ailleurs, l'obtention de résultats de RT-PCR négatifs pour la détection de l'antigène O26 après une étape d'enrichissement suggère que les cellules de *E. coli* O26 ne se trouvaient pas dans un état viable non cultivable (VBNC), mais au contraire que ces cellules ont été complètement éliminées de tous les silos testés dès le 21^{ème} jour.

L'anaérobiose est l'une des conditions les plus importantes pour la conservation de l'ensilage en permettant un démarrage précoce de la fermentation lactique (AFSSA, 2004). Cependant, la bonne conservation d'un ensilage est aussi le résultat d'autres mécanismes tels que l'abaissement du potentiel d'oxydo-réduction et la compétition de divers microorganismes pour les nutriments (Holzer et al., 2003). Ces changements microbiens et physico-chimiques sont parfois considérés comme des effets de barrière. Dans cette Etude *in situ* 1, le fait d'utiliser des additifs bactériens seuls ou en combinaison, n'a pas induit de modification particulière vis-à-vis de la survie des souches de *E. coli* O26 au cours de la période de stockage par rapport aux ensilages témoins. De plus, lorsque les pathogènes étaient co-inoculés avec le mélange de bactéries lactiques, les souches de *E. coli* 60.1, 114.2 et 4198.1 ont été détectées jusqu'au 8^{ème} jour, indiquant ainsi l'absence d'effet synergique des 3 additifs testés contre la croissance de *E. coli* O26 dans ces ensilages. Une compétition entre les souches de bactéries lactiques pourrait exister au sein des silos, cependant ce phénomène n'a pas été mis en évidence. Des différences dans l'efficacité des inoculants auraient pu être observées avec des temps de prélèvement plus courts (durant les cinq premiers jours post-ensilage). Il est également possible que les composés antimicrobiens éventuellement produits par les inoculants bactériens tels que des bactériocines, le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, ou le diacétyl (Fuller & Gibson, 1997), aient eu un effet très limité en raison de la complexité de l'environnement de l'ensilage (pas de diffusion ou effet de dilution de la substance produite). Le taux d'inoculation appliqué (1×10^6 cellules viables par gramme d'ensilage) est traditionnellement considéré comme suffisant pour que les inoculants bactériens employés puissent supplanter la population de bactéries lactiques épiphytes et deviennent ainsi la population prédominante dans l'ensilage (Gollop et al., 2005). Selon notre étude, les changements de densité de population dans les ensilages témoins ou inoculés ont été similaires dans l'Etude *in situ* 1. Au cours de la période de stockage, la population totale en bactéries lactiques a augmenté dans tous les silos en raison du processus de fermentation, puis elle a ensuite légèrement diminué dès lors que le pH de stabilité (pH 4) a été atteint. Cette évolution est habituellement observée au sein des ensilages (Driehuis et al., 1999). Toutefois, les données concernant l'implantation à long terme des additifs bactériens étudiés n'étaient pas disponibles et des études ont montré que l'effet des inoculants pouvait différer selon le lieu de récolte (Schmidt & Kung, 2010) et la présence potentielle de bactériophages dans les cultures (Mäyrä-Mäkinen & Bigret, 1993). L'inoculant NCIMB 40788 *Lactobacillus buchneri* a montré un effet antimicrobien plus marqué envers la souche de *E. coli* 4198.1 qui n'était plus détectée dès le 5^{ème} jour après la mise en silo, contrairement aux souches de *E. coli* 60.1 et 114.2. Ceci souligne le fait que l'inhibition de la croissance et de la survie de *E. coli* est dépendante des souches considérées.

Lors de l'Etude *in situ* 2, à l'ouverture des mini-silos, les valeurs nutritionnelles obtenues étaient caractéristiques d'un ensilage de très bonne qualité pour des vaches laitières ainsi que des bovins à l'engraissement (INRA, 2010). Le paramètre physico-chimique le plus important pour évaluer la qualité d'un ensilage est une valeur de pH en dessous de 5, ce qui a été observé dans la plupart des mini-silos réalisés. Seul le silo C préalablement inoculé avec la souche *Enterococcus* 11A1FLb21 a présenté des valeurs de pH particulièrement élevées et a été éliminé de l'analyse nutritionnelle. Ceci pourrait être dû à un mauvais scellage du mini-silo entraînant une anaérobiose incomplète et des défauts de fermentation. Des résultats hétérogènes entre les 3 répétitions de divers traitements ont parfois été observés et semblent liés à des facteurs externes comme par exemple des différences de densité de l'ensilage. En effet, les mini-silos ayant été compactés à la main, il est envisageable que l'air ait pu pénétrer plus facilement dans certains d'entre eux, entraînant des variations sur les plans microbiologique et physico-chimique. Cependant, quel que soit le traitement considéré, tous les indicateurs étaient caractéristiques d'un ensilage bien conservé. Cette qualité de l'ensilage a notamment été appréciée *via* les proportions de produits de fermentation obtenus à la fin de la période de stockage (AFSSA, 2004; INRA, 2010). Quelques différences dans les valeurs nutritionnelles ont été constatées à l'ouverture des silos notamment ceux contenant les souches de *Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788, *Lactobacillus plantarum* E09 et *Lactococcus garvieae* M15L. Contrairement aux résultats apportés par d'autres études (Kung & Ranjit, 2001; Weinberg et al., 2002; Kristensen et al., 2010), les silos inoculés avec *Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788 ne sont pas ceux présentant la plus forte production d'acide acétique. Cependant des comparaisons directes ne peuvent être réalisées puisque les espèces lactiques comparées n'étaient pas identiques à celle du présent travail. Les silos traités avec la souche NCIMB 40788 ont montré des taux d'acide propionique plus élevés que les autres. Il est possible que le métabolisme hétérofermentaire de cette souche se soit orienté non pas vers la production d'acide acétique mais plutôt vers la production d'autres composés comme des acides gras à chaînes courtes (acide propionique) ou du méthyle proplène glycol. Les niveaux d'acide acétique observés dans les différents silos étaient caractéristiques d'une fermentation correcte et aucune différence n'a été mise en évidence entre les teneurs en acides organiques issus de la fermentation des bactéries lactiques endogènes ou des inoculants. Les résultats microbiologiques de l'Etude *in situ* 2 ont montré que les silos présentant un pH faible empêchaient l'implantation et la survie des souches de *E. coli* O26ensemencées à un taux 1×10^5 UFC/g d'ensilage de maïs sans cependant aboutir à l'élimination complète des pathogènes. Ces résultats ont été observés dans la plupart des silos au cours des 48 h suivant la contamination immédiatement à l'ouverture. Les silos préalablement inoculés avec la souche de *Leuconostoc mesenteroides* 6A1MLb4 sont les seuls pour lesquels aucune trace de l'antigène O26 n'a pu être détectée par RT-PCR après

enrichissement suggérant que le pathogène ne se trouvait pas dans un état viable non cultivable mais avait au contraire été totalement éliminé de l'ensilage 48 h après la contamination. Cette souche de *Leuconostoc mesenteroides* est le seul inoculant bactérien ayant fait preuve d'un effet protecteur en 48 h envers la survie de *E. coli* en cas de contamination à l'ouverture des silos. Aucun autre inoculant n'a démontré le même effet protecteur. Les niveaux d'acides lactique et acétique étaient similaires dans de nombreux silos, cependant la souche de *Leuconostoc mesenteroides* testée a pu produire d'autres composés empêchant l'implantation de souches de *E. coli* pathogènes dans l'ensilage, comme des acides organiques ou des bactériocines. Cette souche aurait aussi pu produire des AGV non dosés habituellement dans les ensilages tels que des acides valérique ou iso-butyrique et n'ayant donc pas été analysés dans les mini-silos. Par ailleurs, le maïs est une plante riche en composés phénoliques, acide férulique, ou acide p -coumarique notamment. Ces composés sont des antimicrobiens naturels issus des plantes (Mélida et al., 2010). Il a notamment été montré que les composés phénoliques altèrent sévèrement la membrane des cellules de *E. coli* O157:H7 et *E. coli* O111 (Venter et al., 2006; Santiesteban-López et al., 2007). Ces composés auraient pu devenir bio-disponibles via le métabolisme de la souche de *Leuconostoc mesenteroides*, ce qui aurait pu endommager les souches de *E. coli*. En effet, des études ont montré que la capacité de bactéries lactiques appartenant principalement au genre *Lactobacillus*, à dégrader certains composés phénoliques issus du vin notamment, pouvaient induire l'inhibition de la croissance de pathogènes tels que *E. coli* O157:H7 et *S. aureus* notamment (Ozkan et al., 2004; Requena et al., 2010; Tabasco et al., 2011). Des études plus poussées sont maintenant nécessaires pour identifier les mécanismes d'inhibition des souches de *E. coli* O26 dus à *Leuconostoc mesenteroides*.

Le potentiel effet inhibiteur des inoculants bactériens au travers d'une compétition nutritionnelle ou de la production de divers composés, dépend non seulement de l'inoculant testé mais aussi de la souche ciblée. En effet lors des contaminations à l'ouverture, la souche de *E. coli* 4198.1 a été dénombrée fréquemment alors que les souches 60.1 et 114.2 ont été majoritairement détectées après enrichissement. Lors de l'Etude *in situ* 2, les souches de *E. coli* testées ont pu survivre et se développer dans les silos présentant une augmentation de pH. Il est possible que les conditions environnementales des ensilages aient été inadéquates pour induire l'expression de différents mécanismes de résistance, notamment ceux impliqués dans la résistance à l'acidité. Le fait que l'implantation des souches de *E. coli* soit liée à une augmentation du pH, est confirmé par les résultats obtenus après 144 h d'aération. En effet, dans le cas d'une contamination en conditions aérobies, les contaminants ont été retrouvés dans tous les silos. Au cours de la période d'aération, l'air a pénétré dans l'ensilage permettant ainsi aux microorganismes aérobies initialement présents de se développer à nouveau. Il s'en suit une

augmentation du pH de l'ensilage due aux levures et moisissures consommant l'acide lactique (Higginbotham et al., 1998). Ce développement microbien aérobie peut expliquer l'élévation du pH de 4,42 ($\pm 0,14$) à 7,16 ($\pm 1,6$) après 144 h d'exposition à l'air. Une telle période d'aération a aussi pu conduire à l'évaporation de composés antimicrobiens volatils impliqués dans la préservation de l'ensilage.

L'aération de l'ensilage de maïs au cours de l'Etude *in situ* 2 a induit la survie voire la croissance des souches pathogènes de *E. coli* O26 testées. Une dégradation aérobie de l'ensilage représente donc un risque de dissémination de ce pathogène au sein du réservoir animal en cas de contamination. Pedroso et al. (2010), ont observé des résultats similaires en cas de contamination par *E. coli* O157:H7 à l'ouverture des silos. Ces auteurs ont notamment montré que *Lactobacillus buchneri* pouvait être employé comme inoculant bactérien afin de limiter la croissance de *E. coli* O157:H7 sans pour autant atteindre l'élimination totale du pathogène dans l'ensilage.

Des techniques de désilage appropriées sont essentielles pour garantir la qualité nutritionnelle et la sécurité sanitaire des aliments pour bétail. Il est très important de noter que dans l'Etude *in situ* 2, les ensilages ayant été soumis à une dégradation aérobie pendant 144 h étaient visuellement très moisissés et ne pouvaient être consommés par les ruminants. Ces résultats confirment le fait que le front d'avancement de l'ensilage doit être renouvelé assez souvent pour éviter le développement de microorganismes indésirables comme les moisissures ou des souches de *E. coli* pathogènes.

En conclusion, l'Etude *in situ* 1 a montré que des souches de *E. coli* pathogènes appartenant au sérotype O26 pouvaient être éliminées au cours de la période de stockage d'ensilages de maïs correctement menés notamment *via* la production d'acides organiques issus des bactéries lactiques endogènes ou ajoutées. En cas de contamination à l'ouverture des silos, les résultats de l'Etude *in situ* 2 ont montré que les souches de *E. coli* O26 pouvaient être totalement éradiquées au cours de la phase de désilage dans les silos préalablement traités avec la bactérie *Leuconostoc mesenteroides* 6A1MLb4. Cependant aucun effet protecteur n'a pu être mis en évidence après 144 h d'exposition aérobie quels que soient les inoculants bactériens testés.

Au cours de la période de stockage, les différents traitements bactériens utilisés n'ont pas significativement modifié l'évolution des souches de *E. coli* testées en comparaison des silos témoins. Cependant, la souche de *Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788 a montré un pouvoir inhibiteur plus prononcé envers certaines souches de *E. coli*. Les mécanismes d'inhibition mis en

œuvre par les bactéries *Leuconostoc mesenteroides* et *Lactobacillus buchneri* doivent maintenant être étudiés afin d'utiliser cet effet protecteur dans d'autres points de la chaîne alimentaire. De plus leur potentiel inhibiteur doit aussi être testé contre d'autres sérogroupes de *E. coli* pathogènes.

Un des moyens permettant de garantir la sécurité sanitaire des aliments pour animaux pourrait être d'utiliser des inoculants bactériens dans un but de bio-protection. Ceux-ci pourraient limiter l'entrée de souches de *E. coli* pathogènes dans le cycle épidémiologique. Cependant, le respect des bonnes pratiques de fabrication permettant la réalisation d'un ensilage de bonne qualité est un pré-requis indispensable à la mise en place de toute stratégie de bio-protection.

4. Valorisation des résultats obtenus

Les travaux présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'un article publié dans la revue scientifique à comité de lecture internationale « *Applied and Environmental Microbiology* » ainsi que d'un poster présenté lors de 2 congrès internationaux.

4.1 Publication n°1 (Voir annexe 6)

« Fate of *Escherichia coli* O26 in corn silage experimentally inoculated at ensiling, at silo opening, or after aerobic exposure, and protective effect of various bacterial inoculants.”

Lysiane Dunière, Audrey Gleizal, Frédérique Chaucheyras-Durand, Isabelle Chevallier et Delphine Thévenot.

Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(24) 8698-8704

4.2 Poster n°2 (Voir Annexe 7)

« Pathogenic *E. coli* O26 survival in corn silage at two stages of contamination and protective effect of bacterial inoculants”.

Lysiane Dunière, Audrey Gleizal, Frédérique Chaucheyras-Durand, Isabelle Chevallier et Delphine Thévenot.

Poster présenté :

Au congrès international « Autumn Conference- Society for General Microbiology », du 5 au 7 Septembre 2011, University of York, UK.

Au congrès national « Ecosystèmes Microbiens et Bioprotection des Aliments », les 17 et 18 Novembre 2011, ONIRIS, site de la Géraudière, Nantes.

CONCLUSION

Conclusion générale

Les résultats obtenus au cours de la thèse ont permis d'identifier des bactéries lactiques inhibitrices d'une grande variété de souches de STEC *in vitro*, de valider le potentiel inhibiteur de certaines d'entre elles *in situ* ; mais aussi d'apporter des informations supplémentaires sur le danger que représente une contamination par les STEC non O157 en amont du réservoir animal et plus précisément au niveau de l'ensilage. Ce travail pourrait ainsi constituer une piste de stratégie pour limiter le portage sain des STEC par les ruminants et réduire l'entrée de ces pathogènes dans le cycle épidémiologique. Cette partie, *Conclusion générale du travail de thèse*, abordera également les perspectives de recherche pouvant faire suite à ce travail.

1. Identification de bactéries lactiques inhibitrices de diverses souches de STEC

Lors de ce travail de thèse, des bactéries lactiques inhibitrices de la croissance des STEC par production d'acides organiques, ont pu être identifiées. Au cours de cette étude, seuls les 5 sérogroupes de STEC considérés comme pathogènes par l'ANSES (anciennement AFSSA) ont été investigués. En perspectives de ce travail, il serait maintenant important de tester notre collection de bactéries lactiques envers un panel de souches de STEC beaucoup plus large, englobant des sérogroupes isolés de cas humains (notamment le séro groupe O104), et habituellement non recherchés dans les aliments en France ou lors des diverses études de prévalence existantes.

Bien que l'inhibition par les bactéries lactiques ne semble pas être dépendante de l'origine et du séro groupe des souches de STEC testées, 3 groupes de sensibilité ont été identifiés par notre étude. Les différents travaux mis en œuvre n'ont pas permis d'identifier les critères d'appartenance à ces 3 groupes. Des études plus poussées, notamment au niveau de l'observation de la membrane bactérienne de ces souches de STEC, devraient maintenant être envisagées dans le but d'expliquer les différences de comportement observées lors des co-inoculations avec la souche de bactérie lactique *Leuconostoc mesenteroides*. En effet, en fonction des souches de STEC considérées, un effet bactéricide ou bactériostatique a pu être observé. Il n'est pas possible de distinguer l'effet bactériostatique dû uniquement à un phénomène de limitation nutritionnelle du milieu, ou lié à la présence d'une autre molécule. L'effet bactéricide est, quant à lui, particulièrement intéressant puisque la compréhension de ce mécanisme pourrait valider l'utilisation de cette bactérie inhibitrice (et d'autres bactéries démontrant le

même phénomène inhibiteur) en tant que moyen de bio-protection envers les STEC. Le pré-requis indispensable à une telle utilisation est la connaissance du phénomène bactéricide, c'est-à-dire les raisons de l'action ciblée sur certaines souches de STEC ainsi que le mécanisme exact mis en œuvre. Par ailleurs, une étude plus poussée au niveau de l'identification des produits inhibiteurs devrait être réalisée pour permettre l'éventuelle identification d'agents chélatants ou de bactériocines, non identifiées ou produites, dans les conditions de ce travail. L'identification de bactéries lactiques productrices de substances antimicrobiennes autres que des acides organiques serait intéressante. Un possible effet synergique des différentes substances inhibitrices des STEC pourrait alors être visualisé en étudiant le potentiel bio-protecteur de cocktails de bactéries lactiques.

Bien que le sérotype le plus fréquemment retrouvé lors d'épidémies soit *E. coli* O157, de nombreux autres ont été impliqués en clinique humaine. De ce fait, il paraît donc nécessaire de s'intéresser au contrôle des STEC dans son ensemble et non à un sérotype en particulier. Le problème pouvant être lié à l'étude de l'écologie d'un seul sérotype de STEC serait de mettre en place des moyens de limitation spécifiques de ce sérotype qui pourraient éventuellement favoriser la dissémination des autres souches de STEC. Cela pourrait engendrer ainsi une véritable « course à l'armement » entre la dissémination des pathogènes et les moyens disponibles en terme de limitation des dangers. Au niveau de l'environnement de l'élevage, une approche globale de la limitation du portage sain des STEC par les ruminants apparaît donc comme une nécessité. Cette même démarche doit aussi être appliquée aux diverses étapes situées en amont de l'homme dans le cycle épidémiologique, notamment dans le réservoir bovin en lui-même ainsi que dans les aliments. La problématique n'est pas tout à fait similaire concernant la clinique humaine. En effet, le traitement des infections humaines à STEC s'apparente à un traitement curatif ayant pour but la guérison d'une infection liée à un nombre réduit de sérotypes. Au contraire, l'approche préventive a pour objectif de limiter la contamination des animaux par de nombreuses souches de STEC et ainsi de limiter les risques pour l'homme.

Les informations actuellement disponibles sur les divers sérotypes de STEC non O157 sont rares et incomplètes. Ce travail de thèse a permis d'apporter une réelle contribution aux connaissances disponibles sur les interactions entre STEC de différents sérotypes et d'autres microorganismes tels que les bactéries lactiques, dans un but de limitation du portage sain. L'étude de ces interactions constitue un axe de recherche devant être encore développé.

2. Informations sur l'écologie des STEC dans l'ensilage.

Les résultats issus de ces travaux de thèse ont montré que des ensilages correctement menés ne permettaient pas la survie des STEC en cas de contamination avant la mise en silo. Ce n'est que lorsque des défauts de fabrications ont été constatés, que la survie et la croissance de ces pathogènes ont pu être observées dans des ensilages (Fenlon & Wilson, 2000). Enfin, en cas de contaminations des ensilages à l'ouverture des silos, nos résultats ont montré que les souches de *E. coli* O26 testées pouvaient survivre et se développer à la reprise de l'aération.

Actuellement, il n'y a que peu d'informations disponibles concernant le devenir des STEC dans les ensilages. La prévalence de ces pathogènes n'a pas été investiguée dans ce milieu et une étude sur le long terme englobant une grande étendue géographique devrait être envisagée afin de connaître plus précisément le danger associé à ce point particulier du cycle épidémiologique des STEC. Cette étude devrait être menée en s'intéressant aux divers sérogroupes de STEC pouvant être retrouvés et non pas seulement à *E. coli* O157. Il serait alors nécessaire de mettre en place un crible basé sur la détection des gènes *stx* suivi d'un sérotypage ainsi que d'un isolement des souches ainsi détectées. Les résultats issus de ce travail de thèse apportent également des informations sur la manière dont devrait être menée cette étude de prévalence : il semble, en effet, plus pertinent de récolter des données de prévalence dans les situations où les pathogènes ont le plus de possibilité de se développer, c'est-à-dire à l'ouverture des silos.

L'exposition aérobie de l'ensilage induit de nombreuses dégradations, par les moisissures notamment, ainsi que de possibles contaminations par les STEC. Du fait de l'altération de la qualité de l'ensilage (mauvaises odeurs...), les éleveurs ne le considèrent généralement pas comme étant un fourrage comestible pour les animaux et éliminent les parties abimées, et du même coup, les parties contaminées. Les ruminants n'ingérant pas cet ensilage dégradé, ne sont alors pas contaminés par le biais de leur alimentation. Cependant l'ensilage ainsi mis de côté du fait de défauts de conservation, sera très probablement réutilisé en d'autres points de l'élevage notamment par incorporation dans le fumier ou le lisier, et s'intégrera malgré tout aux flux de contaminations pouvant être observés au sein des élevages. En effet, un précédent travail de thèse, mené au laboratoire par Bastien Frémaux, a permis de mettre en évidence le fait que le fumier constituait un réservoir important en STEC pouvant favoriser la dissémination des pathogènes et la contamination des animaux (Frémaux, 2007). Le portage sain des STEC par les ruminants pourrait donc être entretenu directement par l'alimentation, mais aussi de manière indirecte, par le biais de l'élimination des aliments contaminés.

Cette hypothèse plaide donc en faveur d'une approche multi-barrières afin de contrôler la dissémination des STEC en amont du réservoir animal et ainsi limiter le portage asymptomatique des bovins. Le respect des Bonnes Pratiques d'Élevage et Bonnes Pratiques d'Ensilage restent néanmoins des pré-requis indispensables à une bonne gestion des risques.

3. Potentiel bio-protecteur des bactéries lactiques envers les STEC dans l'ensilage

Ce travail de thèse a également permis de valider le potentiel bio-protecteur d'une des bactéries lactiques sélectionnées lors de l'étude *in vitro* (*Leuconostoc mesenteroides* 6A1MLb4), dans les conditions testées *in situ* c'est à dire à l'ouverture des silos. Après aération, la dégradation de l'ensilage est trop importante et l'effet protecteur des bactéries lactiques testées est contrebalancé par le développement des levures et moisissures notamment. Pour cette étude, un temps d'aération de 6 jours avait été respecté, en accord avec la plupart des études microbiologiques et nutritionnelles ayant porté sur l'ensilage. En perspectives de ce travail, il sera intéressant d'évaluer le potentiel bio-protecteur des bactéries lactiques, ainsi que le devenir des souches de STEC, dans l'ensilage subissant une période d'aération plus courte, 2 ou 4 jours notamment. En effet, comme évoqué précédemment, la dégradation avancée de l'ensilage limite son utilisation dans l'alimentation des animaux, cependant une question demeure : Qu'en est-il de la survie des STEC dans un ensilage incomplètement dégradé ?

Par ailleurs, les mini-silos ont été conçus de manière à ce que les conditions au cours du stockage soient proches de celles observées dans un silo fonctionnel de grande taille. Cependant, les résultats obtenus ne peuvent être totalement extrapolés à la réalité. Des modifications au niveau des transferts de chaleur ou encore des différences de densités au sein des silos pourraient être observées et influencer sur l'évolution des populations contaminantes (STEC) ou des inoculants bactériens ajoutés dans un but de bio-protection (bactéries lactiques). Il serait donc intéressant de mener des études en conditions réelles en utilisant des silos de grandes tailles. Cependant, le risque biologique est trop important pour envisager d'ensemencer volontairement des silos utilisés dans les élevages.

4. Utilisation des bactéries lactiques

De nombreuses questions se posent par rapport aux possibles utilisations des bactéries lactiques. Dans le cadre de la bio-préservation des aliments par fermentation, le consommateur perçoit les bactéries lactiques comme un élément « naturel » du produit. La principale raison étant que les processus de fermentation existent depuis des milliers d'années pour certains produits, notamment le fromage qui représente une grande part de notre identité nationale. Certaines bactéries lactiques ont d'ailleurs le statut « QPS » basé, en partie, sur ce critère et regroupant les microorganismes potentiellement utilisables en alimentation humaine et animale (EFSA, 2010).

Le terme de fermentation a été employé tout au long de ce manuscrit dans le sens du concept de bio-préservation. C'est-à-dire qu'il correspond à l'utilisation de microorganismes afin de prolonger la durée de vie d'un produit en termes de qualités nutritionnelle et sanitaire, sans utilisation de traitement thermique ni de conservateur.

Le terme de bio-protection a, quant à lui, été utilisé au cours de ce travail pour désigner le processus permettant de limiter ou d'empêcher la survie de microorganismes indésirables tels que des bactéries pathogènes. La bio-protection s'intéresse à des dangers clairement identifiés et spécifiques à un produit ou un environnement. Les stratégies de bio-protection des aliments font intervenir des microorganismes non présents traditionnellement dans le produit, et l'acceptabilité de la part du consommateur n'est pas naturellement acquise. S'agissant de techniques nouvelles et sur lesquelles la communauté scientifique a peu de recul, les stratégies de bio-protection font l'objet d'un examen intense de la part des gestionnaires de risques, que se soit des organismes officiels comme l'ANSES ou l'EFSA ou qu'il s'agisse des producteurs de ferments eux-mêmes.

Le terme « bio-protection » n'a pas été défini officiellement à l'heure actuelle. S'agit-il uniquement de réduire un niveau de contamination ? De réduire le risque de contamination c'est-à-dire de contrôler les flux de pathogènes ? Ou bien s'agit-il d'exclure totalement le danger en éliminant les pathogènes dans leurs réservoirs ? Cette dernière interrogation soulève la question éthique de savoir dans quelles mesures le risque zéro de contamination peut être atteint et à quel prix. Il est donc nécessaire que les différents acteurs de la santé publique, les gestionnaires du risque ainsi que la communauté scientifique, se penchent sur ces problématiques.

En perspectives de ce travail de thèse, la possible utilisation des bactéries lactiques sélectionnées pourra être étudiée en d'autres points du cycle épidémiologique des STEC. Ces stratégies de bio-protection seront étudiées au sein des élevages, et plus particulièrement au niveau de l'eau destinée aux animaux (action au niveau des abreuvoirs). Elles s'intéresseront aussi au réservoir bovin lui-même, *via* l'utilisation des souches d'intérêt en tant que probiotiques. Enfin, concernant les denrées alimentaires, des essais lors d'ensemencements volontaires de diverses matrices permettront de valider le potentiel bio-protecteur de souches ou de cocktail de souches sélectionnés. Une attention particulière sera portée aux filières de fromages au lait cru et de produits carnés car les données épidémiologiques les désignent comme les principales filières touchées par les contaminations à STEC. Concernant l'utilisation des bactéries lactiques en tant que probiotiques pour l'alimentation humaine, de nombreuses études seront nécessaires avant une éventuelle demande de reconnaissance par les organismes de contrôle.

Il paraît alors plus simple de focaliser les études de bio-protection en amont de l'homme dans le cycle épidémiologique des STEC et de mettre en place des stratégies préventives pour limiter le portage asymptomatique des ruminants.

BIBLIOGRAPHIE

- Aasen, I.M. et al.**, 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(2), p.159-166.
- Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R. & Ammar, M.S.**, 1993. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8), p.2364-2368.
- Abee, T. et al.**, 2011. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: Diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiology*, 28(2), p.199-208.
- Ackers, M.L. et al.**, 1998. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *The Journal of Infectious Diseases*, 177(6), p.1588-1593.
- Adams, M.R.**, 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 68(2-3), p.171-178.
- Adesogan, A. et al.**, 2003. Effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* inoculants, or a chemical additive on the fermentation, aerobic stability, and nutritive value of crimped wheat grains. *Journal of Dairy Science*, 86(5), p.1789-1796.
- Adler, A. & Lew, H.**, 1995. Seasonal-changes of epiphytic microorganisms on manured, npk-fertilized and not fertilized forage. *Bodenkultur*, 45(3), p.223-240.
- AFSCA**, 2009. Règlement (CE) n°2074/2005 de la Commission du 5 décembre 2005. Available at: http://www.favv.be/productionanimale/animaux/ica/bovins/_documents/2009-12-21_OmzendbriefVKIherkauwers_tavdierenartsen_07.12.2009fr.pdf.
- AFSSA**, 2010. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis AFSSA du 15 juillet 2008., France: *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*. Available at: <http://www.anses.fr/Documents/MIC2010sa0031.pdf>.
- AFSSA**, 2009. Avis sur l'augmentation des cas de listériose et le lien éventuel avec l'évolution des modes de production, de préparation et de consommation des aliments, France: *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*. Available at: <http://www.anses.fr/Documents/MIC-Ra-ListerioseAliments.pdf>.
- AFSSA**, 2003. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC), Maisons Alfort: *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*. Available at: <http://www.ladocumentationfrancaise.fr/rapports-publics/054000089/index.shtml> [Consulté avril 20, 2011].
- AFSSA**, 2004. Bonnes pratiques de fabrication de l'ensilage pour une meilleure maîtrise des risques sanitaires, *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*. Available at: <http://www.afssa.fr/Documents/ALAN-Ra-ensilage.pdf> [Consulté juillet 30, 2010].
- AFSSA**, 2002. Recommandations pour la présentation des données permettant l'évaluation de l'innocuité des microorganismes utilisés dans le secteur agro-alimentaire., Maisons Alfort, France: *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*.
- Agreste**, 2010. Enquêtes sur les principales grandes cultures. Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire. *Les dossiers*, (8). Available at: http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/file/dossier8_cultures_panorama.pdf.
- Agreste**, 2008. Superficies cultivées en milliers d'hectares. Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire. *Statistiques agricoles annuelle 2008*. Available at: http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf_R2109D12.pdf.
- Aksu, M.I., kaya, M. & Oz, F.**, 2008. Effect of *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosus* on

- the inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 in pastrima, a dry cured meat product. *Journal of Food Safety*, 28(1), p.47-58.
- Alakomi, H.L. et al.**, 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), p.2001-2005.
- Alexander, A.V. et al.**, 1992. Bovine abortions attributable to *Listeria ivanovii*: four cases (1988-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 200(5), p.711-714.
- Anderson, R C et al.**, 2000. Bactericidal effect of sodium chlorate on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* DT104 in rumen contents in vitro. *Journal of Food Protection*, 63(8), p.1038-1042.
- Anon**, 2000. Guidelines for the control of infection with Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC). Subcommittee of the PHLS Advisory Committee on Gastrointestinal Infections. *Communicable Disease and Public Health / PHLS*, 3(1), p.14-23.
- ANSES**, 2011a. AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'état des connaissances scientifiques et aux informations disponibles permettant de formuler des recommandations, suite à la survenue de plusieurs cas de syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) observés en France en juin 2011, suspectés d'être liés à la consommation de graines germées., Maisons Alfort, France: Anses.
- ANSES**, 2011b. Caractéristiques et sources des *Clostridium botulinum* et des *Clostridium* neurotoxigènes. Available at: <http://www.afssa.fr/Documents/MIC-Fi-Clostridiumbotu.pdf>.
- Antonsson, M., Molin, G. & Ardö, Y.**, 2003. *Lactobacillus* strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2), p.159-169.
- Archibald, F.S. & Fridovich, I.**, 1981. Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 146(3), p.928-936.
- Arriola, K.G., Kim, S.C. & Adesogan, A.T.**, 2011. Effect of applying inoculants with heterolactic or homolactic and heterolactic bacteria on the fermentation and quality of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 94(3), p.1511-1516.
- Arthur, T.M. et al.**, 2009. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 in a beef cattle feedlot and role of high-level shedders in hide contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20), p.6515-6523.
- Ashbell, G. & Weinberg, Z.**, 2006. Silage production and utilization. *Food and Agriculture Organization*.
- Aslim, B, Beyatli, Y. & Yuksekdog, Z.N.**, 2006. Productions and monomer compositions of exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from traditional home-made yoghurts and rawmilk. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(8), p.973-979.
- Aslim, B, Onal, D. & Beyatli, Y.**, 2007. Factors influencing autoaggregation and aggregation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isolated from handmade yogurt. *Journal of Food Protection*, 70(1), p.223-227.
- Avery, S., Walters, L. & Hutchison, M.**, 2005. Fate of *Escherichia coli* O157 and detection of stx phage during fermentation of maize, an animal feedstuff. *Letters in Applied Microbiology*, 40(2), p.99-105.
- Awaisheh, S.S. & Ibrahim, S.A.**, 2009. Screening of antibacterial activity of lactic acid bacteria against different pathogens found in vacuum-packaged meat products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(9), p.1125-1132.

- Axelsson, L.T.**, 1998. Lactic Acid Bacteria: Microbiology and functional aspects. Dans *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*. New York, NY: Salimen S. and von Wright A., p. 1000.
- Azcárate-Peril, M.A., Sikes, M. & Bruno-Bárcena, J.M.**, 2011. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 301(3), p.G401-424.
- Bach, S J et al.**, 2002. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in barley silage: effect of a bacterial inoculant. *Journal of Applied Microbiology*, 93(2), p.288-294.
- Bach, S J, Selinger, L.J., et al.**, 2005. Effect of supplementing corn- or barley-based feedlot diets with canola oil on faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by steers. *Journal of Applied Microbiology*, 98(2), p.464-475.
- Bach, S.J. et al.**, 2003. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* feed supplement on *Escherichia coli* O157:H7 in ruminal fluid *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 104(1-4), p.179-189.
- Bach, Susan J, Stanford, Kim & McAllister, Timothy A**, 2005. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in feces from corn- and barley-fed steers. *FEMS Microbiology Letters*, 252(1), p.25-33.
- Baines, D., Erb, S., Lowe, R., et al.**, 2011. A prebiotic, Celmanax™, decreases *Escherichia coli* O157:H7 colonization of bovine cells and feed-associated cytotoxicity *in vitro*. *BMC Research Notes*, 4, p.110.
- Baines, D., Erb, S., Turkington, K., et al.**, 2011. Mouldy feed, mycotoxins and Shiga toxin - producing *Escherichia coli* colonization associated with Jejunal Hemorrhage Syndrome in beef cattle. *BMC Veterinary Research*, 7, p.24.
- Bari, M.L. et al.**, 2003. Chemical and irradiation treatments for killing *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa, radish, and mung bean seeds. *Journal of Food Protection*, 66(5), p.767-774.
- Barker, J., Humphrey, T.J. & Brown, M.W.**, 1999. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiology Letters*, 173(2), p.291-295.
- Barone V.**, 1997. Anatomie comparée des mammifères domestiques. T3. Splanchnologie vol1. Appareil digestif. Appareil respiratoire. 3ème Ed. Paris, Vigot, 853p.
- Bates, D.M.**, 2010. Fitting linear mixed models in R using lme4 package. *The Newsletter of the R project*, 5, p.27-30.
- Bates, Douglas M. & Watts, D.G.**, 2007. Nonlinear regression analysis and its applications, John Wiley & Sons.
- Baylis, C.L.**, 2009. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *International Journal of Dairy Technology*, 62(3), p.293-307.
- Beatty, D.T. et al.**, 2006. Physiological responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle to prolonged, continuous heat and humidity. *Journal of Animal Science*, 84(4), p.972-985.
- Beck, T.**, 1972. The quantitative and qualitative composition of the lactic acid bacteria flora of silage. *Landwirtschaftliche Forschung*, 27, p.55-63.
- Beganović, J. et al.**, 2011. Improved sauerkraut production with probiotic strain *Lactobacillus plantarum* L4 and *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954. *Journal of Food Science*, 76(2), p.M124-129.
- Beijerinck, M.W.**, 1901. Anhäufungsversuche mit ureumbakterien. Ureumspaltung durch urease und durch katabolismus. *Zentralblatt Für Bakteriologie, Mikrobiologie, Und Hygiene.*, 2(7), p.33-61.
- Belkum, M.J. & Stiles, M.E.**, 2000. Non lantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Natural Product Reports*, 17(4), p.323-335.
- Ben Belgacem, Z. et al.**, 2009. Polyphasic taxonomic studies of lactic acid bacteria associated

- with Tunisian fermented meat based on the heterogeneity of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region. *Archives of Microbiology*, 191(9), p.711-720.
- Benkerroum, N et al.**, 2000. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. *Journal of Applied Microbiology*, 89(6), p.960-968.
- Benthin, S. & Villadsen, J.**, 1995. Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by D- and L-lactic acid: effects on lag phase, growth rate and cell yield. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(6), p.647-654.
- Berard, N.C. et al.**, 2009. Potential to reduce *Escherichia coli* shedding in cattle feces by using sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) forage, tested *in vitro* and *in vivo*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), p.1074-1079.
- Beutin, L et al.**, 2000. Investigation of human infections with verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* (VTEC) belonging to serogroup O118 with evidence for zoonotic transmission. *Epidemiology and Infection*, 125(1), p.47-54.
- Beutin, L et al.**, 1988. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Zentralblatt Für Bakteriologie, Mikrobiologie, Und Hygiene. Series A, Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 267(4), p.576-588.
- Beutin, L et al.**, 2007. Comparative evaluation of the Ridascreen Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. *Journal of Applied Microbiology*, 102(3), p.630-639.
- Bhagwat, A.A. et al.**, 2005. Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains based on acid resistance phenotypes. *Infection and Immunity*, 73(8), p.4993-5003.
- Biro, D. et al.**, 2009. Occurrence of microscopic fungi and mycotoxins in conserved high moisture corn from Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, 16(2), p.227-232.
- Bolduc, D. et al.**, 2004. Severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in health care institutions in Charlottetown, Prince Edward Island, fall, 2002. *Canada Communicable Disease Report = Relevé Des Maladies Transmissibles Au Canada*, 30(9), p.81-88.
- Bolotin, A. et al.**, 2004. Recent genetic transfer between *Lactococcus lactis* and enterobacteria. *Journal of Bacteriology*, 186(19), p.6671-6677.
- Bolton, D J, O'Neill, C.J. & Fanning, S.**, 2011. A Preliminary Study of *Salmonella*, Verocytotoxigenic *Escherichia coli*/*Escherichia coli* O157 and *Campylobacter* on Four Mixed Farms. *Zoonoses and Public Health*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21951421> [Consulté novembre 3, 2011].
- Bosch, X.**, 2000. Spain's *E. coli* outbreak highlights mistakes. *Lancet*, 356(9242), p.1665.
- Boukhors, K. et al.**, 2002. Effect of diet on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) growth and survival in rumen and abomasum fluids. *Veterinary Research*, 33(4), p.405-412.
- Bourgoin, F. et al.**, 1999. Are horizontal transfers involved in the evolution of the *Streptococcus thermophilus* exopolysaccharide synthesis loci? *Gene*, 233(1-2), p.151-161.
- Brashears, M M, Galyean, M L, et al.**, 2003. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. *Journal of Food Protection*, 66(5), p.748-754.
- Brashears, M M, Jaroni, D. & Trimble, J.**, 2003. Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *Journal of Food Protection*, 66(3), p.355-363.
- Bredholt, S., Nesbakken, T. & Holck, A.**, 1999. Protective cultures inhibit growth of *Listeria*

- monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum- and gas-packaged meat. *International Journal of Food Microbiology*, 53(1), p.43-52.
- Brenner, D.J. et al.**, 1972. Polynucleotide sequence divergence among strains of *Escherichia coli* and closely related organisms. *Journal of Bacteriology*, 109(3), p.953-965.
- Brownlie, L.E. & Grau, F.H.**, 1967. Effect of food intake on growth and survival of salmonellas and *Escherichia coli* in the bovine rumen. *Journal of General Microbiology*, 46(1), p.125-134.
- Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E.**, 1975. *Bergey's: Manual of determinative bacteriology*. 8^e éd., baltimore, USA: The Williams & Wilkins Compagny.
- Buchanan, R.L. & Edelson, S.G.**, 1999. pH-dependent stationary-phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. *Journal of Food Protection*, 62(3), p.211-218.
- Buchko, S.J. et al.**, 2000. The effect of different grain diets on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by steers. *Journal of Food Protection*, 63(11), p.1467-1474.
- Buckley, M. & Roberts, R.J.**, 2007. The species concept and microorganisms: the past and present of microbial taxonomy., *American Academy of Microbiology*. Available at: <http://www.envismadrasuniv.org/pdf/The%20past%20and%20present%20of%20microbia%20taxonomy.pdf>.
- Bugarel, M. et al.**, 2011. Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. *BMC Microbiology*, 11, p.142.
- Buncic, S. & Avery, S.M.**, 1997. *Escherichia coli* O157:H7 in healthy dairy cows. *New Zealand Veterinary Journal*, 45(2), p.45-48.
- Burland, V. et al.**, 1998. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Research*, 26(18), p.4196-4204.
- Busse, H.J., Denner, E.B. & Lubitz, W.**, 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology*, 47(1), p.3-38.
- Byczkowski, J.Z. & Gessner, T.**, 1988. Biological role of superoxide ion-radical. *The International Journal of Biochemistry*, 20(6), p.569-580.
- Byrne, C.M. et al.**, 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during silage fermentation. *Journal of Food Protection*, 65(12), p.1854-1860.
- Cai, Yimin, Pang, H., et al.**, 2011. *Lactobacillus nasuensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from silage, and emended description of the genus *Lactobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21724957>.
- Cai, Yimin, Yang, Jinsong, et al.**, 2011. *Lactococcus fujiensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from vegetable matter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(Pt 7), p.1590-1594.
- Calderon, O. et al.**, 2007. Evaluation of the effect of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic culture added to yogurt over *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* populations. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 57(1), p.51-55.
- Callaway, T R et al.**, 2001. *Escherichia coli* O157:H7 becomes resistant to sodium chlorate in pure culture, but not in mixed culture or *in vivo*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), p.427-434.
- Callaway, T R et al.**, 2002. Sodium chlorate supplementation reduces *E. coli* O157:H7 populations in cattle. *Journal of Animal Science*, 80(6), p.1683-1689.

- Callaway, T R et al.**, 2003. Forage feeding to reduce preharvest *Escherichia coli* populations in cattle, a review. *Journal of Dairy Science*, 86(3), p.852-860.
- Callaway, Todd R et al.**, 2009. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years. *Current Issues in Molecular Biology*, 11(2), p.67-79.
- Caplice, E. & Fitzgerald, G.F.**, 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), p.131-149.
- Caprioli, A et al.**, 1997. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 3(4), p.578-579.
- Caprioli, Alfredo et al.**, 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*, 36(3), p.289-311.
- Carpentier, B. & Cerf, Olivier**, 2011. Review--Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), p.1-8.
- Cassels, F.J. & Wolf, M.K.**, 1995. Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(3), p.214-226.
- Castanie-Cornet, M.P. et al.**, 1999. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181(11), p.3525-3535.
- CDC**, 2010. Investigation Update: Multistate outbreak of human *E. coli* O145 infections linked to shredded romaine lettuce from a single processing facility. *Center for Disease Control and Prevention*.
- Cebrián, G. et al.**, 2008. Resistance of *Escherichia coli* grown at different temperatures to various environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology*, 105(1), p.271-278.
- Cebula, T.A., Payne, W.L. & Feng, P.**, 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(1), p.248-250.
- Centers for Disease Control and prevention**, 2005. *Yersinia enterocolitica*. Available at: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/yersinia_g.htm.
- Cernicchiaro, N. et al.**, 2011. Assessment of diagnostic tools for identifying cattle shedding and super-shedding *Escherichia coli* O157:H7 in a longitudinal study of naturally infected feedlot steers in Ohio. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(2), p.239-248.
- Cernicchiaro, N. et al.**, 2010. A randomized controlled trial to assess the impact of dietary energy sources, feed supplements, and the presence of super-shedders on the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle using different diagnostic procedures. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(9), p.1071-1081.
- Chang, J.Y. & Chang, H.C.**, 2011. Growth inhibition of foodborne pathogens by kimchi prepared with bacteriocin-producing starter culture. *Journal of Food Science*, 76(1), p.M72-78.
- Chapman, P.A. et al.**, 1993. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiology and Infection*, 111(3), p.439-447.
- Chase-Topping, M. et al.**, 2008. Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(12), p.904-912.
- Chaucheyras-Durand, F., Faqir, F., Ameilbonne, A., Rozand, Christine & Martin, C.**, 2010. 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3), p.640-647.
- Chaucheyras-Durand, Frédérique et al.**, 2006. Biotic and abiotic factors influencing in vitro growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminant digestive contents. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), p.4136-4142.
- Chauvière, G. et al.**, 1992. Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) from

- human enterocyte-like Caco-2 cells by heat-killed *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Letters*, 70(3), p.213-217.
- Chen, C.C. & Walker, W.A.**, 2011. Clinical applications of probiotics in gastrointestinal disorders in children. *The National Medical Journal of India*, 24(3), p.153-160.
- Chen, Y. et al.**, 2005. Fate of *Escherichia coli* during ensiling of wheat and corn. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), p.5163-5170.
- Chevallier, I.**, 2009. Applications alimentaires: les produits carnés. Dans *Bactéries Lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*. Paris, France: Drider, D. and Prévost, H., p. 403-419.
- China, B. et al.**, 1999. Heterogeneity of the eae genes in attaching/effacing *Escherichia coli* from cattle: comparison with human strains. *Research in Microbiology*, 150(5), p.323-332.
- Chou, L.S. & Weimer, B.**, 1999. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82(1), p.23-31.
- Clancy, M. & Baumgardt, B.**, 1975. Effect of silage extract on voluntary intake, rumen fluid constituents and rumen motility. *Journal of Dairy Science*, 58(5), p.758-758.
- Clancy, M., Wangsness, P. & Baumgardt, B.**, 1977. Effect of conservation method on digestibility, nitrogen balance and intake of alfalfa. *Journal of Dairy Science*, 60(4), p.572-579.
- Claussen, N.H.**, 1903. Etudes sur les bactéries dites sarcines et sur les maladies qu'elles provoquent dans la bière. *CR Travux de Laboratoire Carlsberg*, 6, p.64-83.
- Cleveland, J. et al.**, 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1), p.1-20.
- Cobbold, R. & Desmarchelier, P.**, 2002. Horizontal transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* within groups of dairy calves. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), p.4148-4152.
- Cocaign-Bousquet, M. et al.**, 1996. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70(2-4), p.253-267.
- Coconnier, M.H. et al.**, 1993. Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiology Letters*, 110(3), p.299-305.
- Cogan, T.M. et al.**, 2007. Invited review: Advances in starter cultures and cultured foods. *Journal of Dairy Science*, 90(9), p.4005-4021.
- Coldewey, S.M. et al.**, 2007. Impact of the *rpoS* genotype for acid resistance patterns of pathogenic and probiotic *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, 7, p.21-21.
- Collins, M.D. et al.**, 1989. 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. *The Journal of Applied Bacteriology*, 67(4), p.453-460.
- Confédération Nationale de l'Élevage**, 2009. Charte des Bonnes Pratiques d'Élevage.
- Cookson, S.T. & Nataro, J P.**, 1996. Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 21(6), p.421-434.
- Cornu, M. et al.**, 2011. Modeling microbial competition in food: application to the behavior of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. *Food Microbiology*, 28(4), p.639-647.
- Corrot, G., Champoullion, M. & Clamen, E.**, 1998. Qualité microbiologique des balles rondes enrubbannées. Maitrise des contaminations. *Fourrages*, 156, p.411-429.
- Cotter, P.D., Hill, C. & Ross, R.P.**, 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(10), p.777-788.
- Courtin, M.G. & Spoelstra, S.F.**, 1990. A simulation model of the microbiological and chemical

- changes accompanying the initial stage of aerobic deterioration of silage. *Grass and Forage Science*, 45(2), p.153-165.
- Crampin, M. et al.**, 1999. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with a music festival. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 18(4), p.286-288.
- Craun, G.F., Calderon, R.L. & Craun, M.F.**, 2005. Outbreaks associated with recreational water in the United States. *International Journal of Environmental Health Research*, 15(4), p.243-262.
- Cray, W.C., Jr et al.**, 1998. Effect of dietary stress on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), p.1975-1979.
- Crump, J.A. et al.**, 2002. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *The New England Journal of Medicine*, 347(8), p.555-560.
- Cutter, C.N. & Siragusa, G.R.**, 1995. Treatments with nisin and chelators to reduce *Salmonella* and *Escherichia coli* on beef. *Journal of Food Protection*, 58(9), p.1028-1030.
- Daeschel, M., Andersson, R. & Fleming, H.**, 1987. Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(3), p.357-367.
- Davis, Margaret A et al.**, 2005. *Escherichia coli* O157:H7 in environments of culture-positive cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), p.6816-6822.
- Davis, Margaret A. et al.**, 2003. Feedstuffs as a vehicle of cattle exposure to *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Veterinary Microbiology*, 95(3), p.199-210.
- DebRoy, C. et al.**, 2004. Detection of *Escherichia coli* serogroups O26 and O113 by PCR amplification of the *wzx* and *wzy* genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), p.1830-1832.
- Decludt, B. et al.**, 2000. Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France. The Société de Néphrologie Pédiatrique. *Epidemiology and Infection*, 124(2), p.215-220.
- Delignette-Muller, M.L. et al.**, 2006. Use of Bayesian modelling in risk assessment: Application to growth of *Listeria monocytogenes* and food flora in cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), p.195-208.
- Dellaglio, F. et al.**, 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Dans *Caractéristiques générales des bactéries lactiques*. Uriage, France: deRoissart H. and Luquet F.M., p. 25-116.
- Demarquilly, C., Dulphy, J.-P. & Andrieu, J.-P.**, 1998. Valeurs nutritive et alimentaire des fourrages selon les techniques de conservation: foin, ensilage, enrubannage. *Fourrages*, 155, p.349-369.
- Denny, J., Bhat, M. & Eckmann, K.**, 2008. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with raw milk consumption in the Pacific Northwest. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5(3), p.321-328.
- DeVuyst, L., Callewaert, R. & Crabbe, K.**, 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *MICROBIOLOGY-UK*, 142(4), p.817-827.
- DGAI**, 2010. Résultats du plan de surveillance 2009 de la contamination par *Escherichia coli* STEC/VTEC des fromages au lait cru et des viandes hachées réfrigérées et résultats de l'enquête de prévalence complémentaire réalisée sur les viandes hachées., Paris, France: *Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche*.
- Dickerson, J. et al.**, 1991. Rate and extent of top spoilage losses of alfalfa silage stored in horizontal silos. Dans *Cattlemen's Day*, Kansas State University, Manhattan,: Kansas State

- University. Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, p. 75-78. Available at: <http://krex.k-state.edu/dspace/handle/2097/6405>.
- Diez-Gonzalez, F et al.,** 1998. Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5383), p.1666-1668.
- Dineen, S.S. et al.,** 1998. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy fermentation systems. *Journal of Food Protection*, 61(12), p.1602-1608.
- Dong, T. & Schellhorn, H.E.,** 2010. Role of RpoS in virulence of pathogens. *Infection and Immunity*, 78(3), p.887-897.
- Donnenberg, M.S. et al.,** 1993. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment *in vitro* and in a porcine model. *The Journal of Clinical Investigation*, 92(3), p.1418-1424.
- Doyle, M P,** 1991. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 12(4), p.289-301.
- Drackley, J.K., Donkin, S.S. & Reynolds, C.K.,** 2006. Major advances in fundamental dairy cattle nutrition. *Journal of Dairy Science*, 89(4), p.1324-1336.
- Drider, D. & Prévost, H.,** 2009. *Bactéries Lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles Economica.*, Paris, France.
- Driehuis, Elferink & Spoelstra,** 1999. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *Journal of Applied Microbiology*, 87(4), p.583-594.
- Driehuis, F. & Oude Elferink, S.J.,** 2000. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *The Veterinary Quarterly*, 22(4), p.212-216.
- Driehuis, F. et al.,** 2008. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in The Netherlands. *Food Additives and Contaminants*, 1(1), p.41-50.
- Drosinos, E.H. et al.,** 2005. Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Journal of Applied Microbiology*, 99(6), p.1314-1323.
- Duffy, G,** 2003. Verocytotoxic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *Journal of Applied Microbiology*, 94 Suppl, p.94S-103S.
- Duncan, S.H. et al.,** 2004. Effects of esculin and esculetin on the survival of *Escherichia coli* O157 in human faecal slurries, continuous-flow simulations of the rumen and colon and in calves. *The British Journal of Nutrition*, 91(5), p.749-755.
- Duniere, L. et al.,** 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. *Applied and Environmental Microbiology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21984243>.
- Durso, L.M., Bono, J.L. & Keen, James E,** 2005. Molecular serotyping of *Escherichia coli* O26:H11. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), p.4941-4944.
- Dyet, K.H. et al.,** 2010. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in New Zealand using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *Epidemiology and Infection*, p.1-8.
- Earnshaw, R.G.,** 1992. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. Dans *The lactic acid bacteria in health and disease*. Elsevier, London, p. 211-232.
- EFSA,** 2007. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA Journal*, 587, p.1-16.
- EFSA,** 2006. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food, adopted on 4 April 2006. *The EFSA Journal*, 365, p.1-56.
- EFSA,** 2010. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents

- intentionally added to food and feed (2010 update). *EFSA Journal*, 8(12), p.1944.
- EFSA**, 2011. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Europe: Taking Stock. *EFSA Journal*, 9(10), p.2390.
- EFSA**, 2009. The use and mode of action of bacteriophages in food production. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *EFSA Journal*, 1076, p.1-26.
- Elam, N.A. et al.**, 2003. Effects of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (strains NP45 and NP51) and *Propionibacterium freudenreichii* on performance, carcass, and intestinal characteristics, and *Escherichia coli* strain O157 shedding of finishing beef steers. *Journal of Animal Science*, 81(11), p.2686-2698.
- Ellis-Iversen, J. et al.**, 2008. Farm practices to control *E. coli* O157 in young cattle--a randomised controlled trial. *Veterinary Research*, 39(1), p.3.
- el-Ziney, M.G. & Debevere, J.M.**, 1998. The effect of Reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese. *Journal of Food Protection*, 61(10), p.1275-1280.
- Ennahar, S.**, 2009. Applications alimentaires: les produits végétaux. Dans *Bactéries Lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*. Paris, France: Drider, D. and Prévost, H., p. 441-458.
- Espié, E., Grimont, F. et al.**, 2006. O148 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreak: microbiological investigation as a useful complement to epidemiological investigation. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12(10), p.992-998.
- Espié, E. et al.**, 2005. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2005. *Institut de Veille Sanitaire, Institut Pasteur*. Available at: http://www.invs.sante.fr/surveillance/shu/shu_2005.pdf [Consulté avril 4, 2011].
- Espié, E., Mariani-Kurkdian, P., et al.**, 2006. Shigatoxin Producing *Escherichia coli* O26 Infection and Unpasteurised Cows Cheese, France, 2005. Dans 6th International Symposium on Shiga-toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections. Melbourne, Australia.
- Espié, E., Vaillant, V. et al.**, 2006. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiology and Infection*, 134(1), p.143-146.
- Euzéby, J.P.**, 2011. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Lactobacillus*. Available at: <http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html> [Consulté novembre 23, 2011].
- Evans, J. et al.**, 2000. Evidence of persisting serum antibodies to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide and Verocytotoxin in members of rural communities in England. *European Journal of Epidemiology*, 16(10), p.885-889.
- Faith, N.G. et al.**, 1996. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), p.1519-1525.
- Feng, L. et al.**, 2005. Structural and genetic characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 O antigen and development of an O145 serogroup-specific PCR assay. *Journal of Bacteriology*, 187(2), p.758-764.
- Fenlon, D.R.**, 1985. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *The Journal of Applied Bacteriology*, 59(6), p.537-543.
- Fenlon, D.R. et al.**, 2000. The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Symposium Series (Society for Applied Microbiology)*, (29), p.149S-156S.
- Fenlon, DR & Wilson, J.**, 2000. Growth of *Escherichia coli* O157 in poorly fermented laboratory silage: a possible environmental dimension in the epidemiology of *E. coli* O157. *Letters in Applied Microbiology*, 30(2), p.118-121.

- Ferens, W.A. & Hovde, Carolyn J**, 2011. *Escherichia coli* O157:H7: Animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(4), p.465-487.
- Filya, I.**, 2003. The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), p.1080-1086.
- Filya, I. & Sucu, E.**, 2007. The effect of bacterial inoculants and a chemical preservatives on the fermentation and aerobic stability of whole crop cereal silages. *Asian australian journal of animal sciences*, 20(3), p.378-384.
- Filya, I., Sucu, E. & Karabulut, A.**, 2006. The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of maize silage. *Journal of Applied Microbiology*, 101(6), p.1216-1223.
- Filya, I., Sucu, E. & Karabulut, A.**, 2004. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. *Journal of Applied Microbiology*, 97(4), p.818-826.
- Fink-Gremmels, J.**, 2008. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 25(2), p.172-180.
- Foucaud, C., Hemme, D. & Desmazeaud, M.**, 2001. Peptide utilization by *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Letters in Applied Microbiology*, 32(1), p.20-25.
- Fox, E. et al.**, 2009. *Listeria monocytogenes* in the Irish Dairy Farm Environment. *Journal of Food Protection*, 72(7), p.1450-1456.
- Frank, C. et al.**, 2011. Epidemic Profile of Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany. *The New England Journal of Medicine*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21696328> [Consulté novembre 1, 2011].
- Frank, J.F.**, 2001. Microbial attachment to food and food contact surfaces. *Advances in Food and Nutrition Research*, 43, p.319-370.
- Franz, E. et al.**, 2011. *E. coli* O157 strain variability in manure-amended soil survival in relation to strain origin, virulence profile and carbon nutrition profile. *Applied and Environmental Microbiology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21908630> [Consulté novembre 3, 2011].
- Fratamico, P.M. et al.**, 2005. DNA sequence of the *Escherichia coli* O103 O antigen gene cluster and detection of enterohemorrhagic *E. coli* O103 by PCR amplification of the *wzx* and *wzy* genes. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(6), p.515-522.
- Frémaux, B.**, 2007. Écologie des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les effluents d'élevages bovins et le sol. Doctorat d'Université. Lyon: Claude Bernard Lyon1. Available at: http://tel.archives-ouvertes.fr/index.php?halsid=1g7ldv552a5n4qofgmtgb310b6&view_this_doc=tel-00200118&version=1 [Consulté décembre 9, 2011].
- Fremaux, B., Delignette-Muller, M.L., et al.**, 2007. Growth and survival of non-O157:H7 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), p.89-99.
- Fremaux, B. et al.**, 2010. Survival and spread of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in alpine pasture grasslands. *Journal of Applied Microbiology*, 108(4), p.1332-1343.
- Fremaux, B., Prigent-Combaret, C., et al.**, 2007. Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in cow slurry. *Letters in Applied Microbiology*, 45(1), p.55-61.
- Fremaux, B. et al.**, 2008. Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in various manure-amended soil types. *Journal of Applied Microbiology*, 104(1), p.296-304.

- Fu, C.J. et al.**, 2003. Pre-harvest factors influencing the acid resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7. *Journal of Animal Science*, 81(4), p.1080-1087.
- Fukushima, H., Hoshina, K. & Gomyoda, M.**, 1999. Long-term survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), p.5177-5181.
- Fuller, R. & Gibson, G.R.**, 1997. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement*, 222, p.28-31.
- Gagliardi, J V & Karns, J S**, 2000. Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), p.877-883.
- Gagliardi, Joel V & Karns, Jeffrey S**, 2002. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on plant roots. *Environmental Microbiology*, 4(2), p.89-96.
- Galvez, A. et al.**, 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1-2), p.51-70.
- García, P. et al.**, 2010. Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology*, 141(3), p.151-155.
- Garrity, G.M. & Holt, J.G.**, 2001. Taxonomic Outline of the Archaea and Bacteria. Dans *The Archae and the deeply branching and phototrophic bacteria*. Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer, New York: Boone DR, Castenholr RW, p. 155-166.
- Garvie, E.I.**, 1969. Lactic dehydrogenases of strains of the genus *Leuconostoc*. *Journal of General Microbiology*, 58(1), p.85-94.
- Garvie, E.I.**, 1894. Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the *Leuconostocs* from other lactic acidbacteria. Dans *Methods in Microbiology*. NY, USA: T. Bergan, p. 149-178.
- Gautam, R. et al.**, 2011. Modeling the effect of seasonal variation in ambient temperature on the transmission dynamics of a pathogen with a free-living stage: example of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. *Preventive Veterinary Medicine*, 102(1), p.10-21.
- German, B. et al.**, 1999. The development of functional foods: lessons from the gut. *Trends in Biotechnology*, 17(12), p.492-499.
- Girardin, H. et al.**, 2005. Behaviour of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(2), p.287-295.
- Glass, K.A. et al.**, 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8), p.2513-2516.
- Gollop, N., Zakin, V. & Weinberg, Z.G.**, 2005. Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *Journal of Applied Microbiology*, 98(3), p.662-666.
- Gopal, P.K. et al.**, 2001. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 67(3), p.207-216.
- Gouet, P. & Chevallier, R.**, 1966. The evolution of gram negative microflora in direct harvested and wilted alfalfa silages. *Proceedings of the 10th International Grassland Congress*, p.533-536.
- Gouet, P., Girardeau, J.P. & Riou, Y.**, 1977. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by defined lactic microflora in gnotobiotic silages of lucerne, fescue, ryegrass and maize-influence of dry-matter and temperature. *Animal Feed Science and Technology*, 2(4), p.297-305.
- Grant, M., Eklund, C. & Shields, S.**, 1995. Monitoring dairy silage for 5 bacterial groups with

- potential for human pathogenesis. *Journal of Food Protection*, 58(8), p.879-883.
- Griffin, P M & Tauxe, R.V.**, 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic Reviews*, 13, p.60-98.
- Grimont, P.A.**, 1987. Taxonomie des *Escherichia coli*. *Médecine et Maladies Infectieuses*, p.6-10.
- Guarner, F & Schaafsma, G.**, 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39(3), p.237-238.
- Guh, A. et al.**, 2010. Outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with raw milk, Connecticut, 2008. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 51(12), p.1411-1417.
- Gyles, C.L.**, 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science*, 85(13 Suppl), p.E45-62.
- Haeghebaert, S. et al.**, 2003. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France, 2001. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, (20), p.89-91.
- Hancock, D. et al.**, 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *International Journal of Food Microbiology*, 66(1-2), p.71-78.
- Hancock, D D et al.**, 1998. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. *Preventive Veterinary Medicine*, 35(1), p.11-19.
- Harmon, B. et al.**, 1999. Fecal shedding and rumen proliferation of *E. coli* O157:H7 in calves: an experimental model. Dans *Escherichia coli O157 in farm animals*. Oxon, UK: CS Stewart and HJ Flint.
- Hassan, L., Mohammed, H.O. & McDonough, P.L.**, 2001. Farm-management and milking practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in New York state dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 51(1-2), p.63-73.
- Hauri, A. et al.**, 2011. Secondary transmissions during the outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104 in Hesse, Germany, 2011. *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 16(31). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21871215> [Consulté novembre 3, 2011].
- Helander, I.M., von Wright, A. & Mattila-Sandholm, T.-M.**, 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 8(5), p.146-150.
- Hereu, A. et al.**, 2011. High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21411167> [Consulté octobre 25, 2011].
- Heron, S., J.E, Wilkinson, J., F & Duffus, C., M**, 1993. Enterobacteria associated with grass and silages. *JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY*, 75(1), p.13-17.
- Heuvelink, A.**, 2000. *Verocytotoxin-producing Escherichia coli in humans and the food chain*. PhD. Netherlands: Utrecht. Available at: http://repository.ubn.ru.nl/bitstream/2066/18828/1/18828_veroescoi.pdf [Consulté juillet 25, 2011].
- Higginbotham, G. et al.**, 1998. Effects of inoculants containing propionic acid bacteria on fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 81(8), p.2185-2192.
- Himathongkham, S. et al.**, 1999. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in cow manure and cow manure slurry. *FEMS Microbiology Letters*, 178(2), p.251-257.

- Hirshfield, I.N., Terzulli, S. & O'Byrne, C.,** 2003. Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria. *Science Progress*, 86(Pt 4), p.245-269.
- Holzappel, W.H. et al.,** 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 Suppl), p.365S-373S.
- Holzappel, W.H. et al.,** 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), p.85-101.
- Holzer, M. et al.,** 2003. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends in Biotechnology*, 21(6), p.282-287.
- Hovde, C J et al.,** 1999. Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157:H7 acid resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), p.3233-3235.
- Hrudey, S.E. et al.,** 2003. A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 47(3), p.7-14.
- Hu, W. et al.,** 2009. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. *Journal of Dairy Science*, 92(8), p.3907-3914.
- Huang, L., Forsberg, C.W. & Gibbins, L.N.,** 1986. Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutylicum* intracellular pH and cellular distribution of fermentation products. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(6), p.1230-1234.
- Hugas, M.,** 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*, 49, Supplement 1(0), p.S139-S150.
- Hungate, R.E.,** 1966. The rumen and its microbes. Dans *The rumen bacteria*. New York, NY.
- Hussein, H S & Sakuma, T.,** 2005. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *Journal of Dairy Science*, 88(2), p.450-465.
- Hussein, H S,** 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *Journal of Animal Science*, 85(13 Suppl), p.E63-72.
- Hussein, Hussein S & Bollinger, L.M.,** 2005. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *Journal of Food Protection*, 68(10), p.2224-2241.
- Hyytiä-Trees, E. et al.,** 2006. Second generation subtyping: a proposed PulseNet protocol for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157). *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(1), p.118-131.
- Ihekweazu, C. et al.,** 2006. Outbreak of *E. coli* O157 infection in the south west of the UK: risks from streams crossing seaside beaches. *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 11(4), p.128-130.
- Imamovic, L. et al.,** 2010. Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by real-time quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(17), p.5693-5701.
- INRA,** 2010. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux – Valeurs des aliments. Available at: http://www.inra.fr/toute_l_actu/vient_de_paraitre/alimentation_des_bovins_ovins_et_caprins_besoins_des_animaux_valeurs_des_aliments [Consulté mai 10, 2011].
- Interbev,** 2005. Liste des agents d'ensilage autorisés dans le cadre de la loi sur le contrôle des produits antiparasitaires à usage agricole et des produits assimilés. Situation au 1er Mai 2005., Paris, France: *Institut de l'Elevage*.
- InVS,** 2011. Cas groupés de syndrome hémolytique et urémique (SHU) Nord, juin 2011 - Point au 8 juillet 2011. *Actualités de l'InVS*.

- Irvin, A.D.**, 1969. The inhibition of *Listeria monocytogenes* by an organism, resembling *Bacillus mycoides*, present in normal silage. *Research in Veterinary Science*, 10(1), p.106-108.
- Islam, M. et al.**, 2004. Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Journal of Food Protection*, 67(7), p.1365-1370.
- Ismaili, A. et al.**, 1995. Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 63(9), p.3316-3326.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. & Ray, B.**, 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological and Molecular Biology Reviews*, 59(2), p.171-200.
- Jacob, M E, Fox, J.T., et al.**, 2008. Effects of dried distillers' grain on fecal prevalence and growth of *Escherichia coli* O157 in batch culture fermentations from cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), p.38-43.
- Jacob, M E et al.**, 2010. Inclusion of dried or wet distillers' grains at different levels in diets of feedlot cattle affects fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), p.7238-7242.
- Jacob, M E, Parsons, G.L., et al.**, 2008. Feeding supplemental dried distiller's grains increases faecal shedding of *Escherichia coli* O157 in experimentally inoculated calves. *Zoonoses and Public Health*, 55(3), p.125-132.
- Jacob, Megan E, Callaway, Todd R & Nagaraja, T G**, 2009. Dietary interactions and interventions affecting *Escherichia coli* O157 colonization and shedding in cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7), p.785-792.
- Jambor, V.**, 2000. The effect of biological preservatives, treatment and different levels of dry biomass on proteolysis and content of biogenic amines in alfalfa silage. *Czech Journal of animal Science*, 45, p.185-188.
- Jamet, E.**, 2009. Les bactéries lactiques: une composante de l'écosystème microbien des fromages. Dans *Bactéries Lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*. Paris, France: Drider, D. and Prévost, H., p. 319-348.
- Jard, G. et al.**, 2011. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21770849> [Consulté août 25, 2011].
- Jarvis, K.G. & Kaper, J B**, 1996. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infection and Immunity*, 64(11), p.4826-4829.
- Jatkauskas, J. & Vrotniakiene, V.**, 2009. The influence of application of a biological additive on the fermentation and nutritive value of lucerne silage. *Zemdirbyste-Agriculture*, 96(4), p.197-208.
- Jay, J.M.**, 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(3), p.525-532.
- Jenkins, C. et al.**, 2008. *Escherichia coli* serogroup O26--a new look at an old adversary. *Journal of Applied Microbiology*, 104(1), p.14-25.
- Jerse, A.E., Gicquelais, K.G. & Kaper, J B**, 1991. Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 59(11), p.3869-3875.
- Jiang, X., Morgan, J. & Doyle, Michael P**, 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), p.2605-2609.
- Jin, T., Zhang, H. & Boyd, G.**, 2010. Incorporation of preservatives in polylactic acid films for

- inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and extending microbiological shelf life of strawberry puree. *Journal of Food Protection*, 73(5), p.812-818.
- Jofré, A., Garriga, M. & Aymerich, T.**, 2007. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham through active packaging with natural antimicrobials and high-pressure processing. *Journal of Food Protection*, 70(11), p.2498-2502.
- Johansson, M. et al.**, 2005. Potential risks when spreading anaerobic digestion residues on grass silage crops - survival of bacteria, moulds and viruses. *Grass and forage science*, 60(2), p.175-185.
- Johnson, A.L., McAdams, S.C. & Whitlock, R.H.**, 2010. Type A botulism in horses in the United States: a review of the past ten years (1998-2008). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 22(2), p.165-173.
- Johnson, R. et al.**, 1996. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 59(10), p.1112-1122.
- Jokela, B. & Russelle, M.**, 2003. Perennial forages benefit soils, other crops, and water quality in important ways. Available at: www.ars.usda.gov/sp2UserFiles/Place/36553000/pdf/s/19%20perennial%20forage%20importance_for%20print.pdf.
- Jokinen, C.C. et al.**, 2010. The occurrence and sources of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in the Salmon River, British Columbia, Canada. *Journal of Water and Health*, 8(2), p.374-386.
- Jonsson, A. & Pahlow, G.**, 1984. Systematic classification and biochemical characterization of yeast growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* culture. *Animal Research and Development*, 20, p.7-22.
- Jonsson, M.E. et al.**, 2001. Persistence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in calves kept on pasture and in calves kept indoors during the summer months in a Swedish dairy herd. *International Journal of Food Microbiology*, 66(1-2), p.55-61.
- Kabadjova, P. et al.**, 2002. Differentiation of closely related *Carnobacterium* food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), p.5358-5366.
- Kaper, James B., Nataro, James P. & Mobley, H.L.T.**, 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Micro*, 2(2), p.123-140.
- van de Kar, N.C. et al.**, 1996. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in hemolytic uremic syndrome in part of western Europe. *European Journal of Pediatrics*, 155(7), p.592-595.
- Karch, H et al.**, 1995. Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(6), p.1602-1605.
- Karmali, M A, Petric, M. & Bielaszewska, M**, 1999. Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F assay) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxins) in *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(2), p.396-399.
- Karmali, M A et al.**, 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet*, 1(8325), p.619-620.
- Karmali, Mohamed A., Gannon, V. & Sargeant, Jan M.**, 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), p.360-370.
- Kashket, E.**, 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance.

- FEMS Microbiology Reviews*, 46(3), p.233-244.
- Kazmierczak, M.J., Wiedmann, Martin & Boor, Kathryn J**, 2005. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 69(4), p.527-543.
- Keenan, T.W. & Bills, D.D.**, 1968. Metabolism of volatile compounds by lactic starter culture microorganisms. A Review1. *Journal of Dairy Science*, 51(10), p.1561-1567.
- Keles, G. & Demirci, U.**, 2011. The effect of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria on conservation characteristics of baled triticale-Hungarian vetch silage and lamb performance. *Animal Feed Science and Technology*, 164(1-2), p.21-28.
- Khare, S. et al.**, 2010. Vaccination with attenuated *Salmonella enterica* Dublin expressing *E. coli* O157:H7 outer membrane protein Intimin induces transient reduction of fecal shedding of *E. coli* O157:H7 in cattle. *BMC Veterinary Research*, 6, p.35.
- Kim, Y., Oh, S. & Kim, S.H.**, 2009. Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2), p.324-329.
- King, L. et al.**, 2009. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2009, *Institut de Veille Sanitaire*. Available at: http://www.invs.sante.fr/surveillance/shu/shu_2009.pdf.
- King, L.A.**, 2010. Family outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O123:H-, France, 2009. *Emerging Infectious Diseases*, 16. Available at: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/9/10-0472_article.htm [Consulté novembre 1, 2011].
- King, T. et al.**, 2010. Transcriptomic analysis of *Escherichia coli* O157:H7 and K-12 cultures exposed to inorganic and organic acids in stationary phase reveals acidulant- and strain-specific acid tolerance responses. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19), p.6514-6528.
- Klaenhammer, T R**, 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3), p.337-349.
- Klaenhammer, T R**, 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), p.39-85.
- Klein, G. et al.**, 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), p.103-125.
- Kleinschmit, D.H. & Kung Jr, L.**, 2006a. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. *Journal of Dairy Science*, 89(10), p.4005-4013.
- Kleinschmit, D.H. & Kung Jr, L.**, 2006b. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 89(10), p.3999-4004.
- Klijn, A., Mercenier, A. & Arigoni, F.**, 2005. Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), p.491-509.
- Knicky, A. & Lingvall, R.**, 2001. Possibilities to avoid growth of clostridia and/or fungi in wilted silage by use of organic and inorganic salts. Dans *19th International Grassland Congress*. Proceedings of the XIX international grassland congress: grassland ecosystems: an outlook into the 21st century. Sao Pedro, Brazil: Gomide, JA; Mattos, WRS; DaSilva, SC, p. 788-789.
- Kong, S. & Davison, A.J.**, 1981. The relative effectiveness of .OH, H₂O₂, O₂⁻, and reducing free radicals in causing damage to biomembranes. A study of radiation damage to erythrocyte ghosts using selective free radical scavengers. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 640(1), p.313-325.
- Konno, T., Yatsuyanagi, J. & Saito, S.**, 2011. Application of a multilocus variable number of

- tandem repeats analysis to regional outbreak surveillance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 64(1), p.63-65.
- Konowalchuk, J., Speirs, J.I. & Stavric, S.**, 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 18(3), p.775-779.
- Kovacs, M.J. et al.**, 1990. Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *The American Journal of Medicine*, 88(2), p.177-179.
- Kristensen, N. et al.**, 2010. Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. *Journal of Dairy Science*, 93(8), p.3764-3774.
- Křízek, M.**, 1993. Biogenic amines in silage. 2. The dynamics of the formation of biogenic amines in silage. *Archiv Für Tierernährung*, 43(2), p.179-187.
- Kroulik, J., Burkey, L. & Wiseman, H.**, 1955. The microbial population on the green plant and of the cut forage prior to ensiling. *Journal of Dairy Science*, 38, p.256-262.
- Kudva, I.T., Blanch, K. & Hovde, C J.**, 1998. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), p.3166-3174.
- Kuhnert, P. et al.**, 2005. Prevalence and risk-factor analysis of Shiga toxigenic *Escherichia coli* in faecal samples of organically and conventionally farmed dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, 109(1-2), p.37-45.
- Kuipers, O.P., Buist, G. & Kok, J.**, 2000. Current strategies for improving food bacteria. *Research in Microbiology*, 151(10), p.815-822.
- Kumar, C.G. & Anand, S.K.**, 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1-2), p.9-27.
- Kung Jr., L. et al.**, 2007. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of ground and whole high-moisture corn 1. *Journal of Dairy Science*, 90(5), p.2309-2314.
- Kung, L. & Ranjit, N.**, 2001. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*, 84(5), p.1149-1155.
- Lapointe, G.**, 2009. Métabolisme des bactéries lactiques: la production d'exopolysaccharides. Dans *Bactéries Lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*. Paris, France: Drider, D. and Prévost, H., p. 73-98.
- Lauková, A. & Czikková, S.**, 1998. Inhibition effect of enterocin CCM 4231 in the rumen fluid environment. *Letters in Applied Microbiology*, 26(3), p.215-218.
- Lea, N., Lord, J.M. & Roberts, L.M.**, 1999. Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin-1. *Microbiology (Reading, England)*, 145 (Pt 5), p.999-1004.
- Leblond-Bourget, N. & Guédon, G.**, 2009. Génétique, génomes et transcriptome. Organisation et évolution des génomes des bactéries lactiques agroalimentaires. Dans *Bactéries Lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*. Paris, France: Drider, D. and Prévost, H., p. 199-214.
- Lee, K.Y., Wahl, R. & Barbu, E.**, 1956. Contenu en bases puriques et pyrimidiques des acides désoxyribonucléiques des bactéries. *Annales de l'Institut Pasteur*, 91, p.212-224.
- LeGall, A. & Chénais, F.**, 2005. Le point sur l'enilage de maïs pour les vaches laitières. Available at: http://www.inst-elevage.asso.fr/spip.php?page=article_espace&id_espace=931&id_article=7954.
- Legarto, J.**, 2006a. Liste des conservateurs d'ensilage acides homologués au 26/3/2006.

- Available at: http://www.inst-elevage.asso.fr/spip.php?page=article_espace&id_espace=931&id_article=10123 [Consulté septembre 28, 2011].
- Legarto, J.**, 2006b. Liste des conservateurs d'ensilage biologiques homologués au 26/3/2006. Available at: http://www.inst-elevage.asso.fr/spip.php?page=article_espace&id_espace=931&id_article=10123 [Consulté septembre 28, 2011].
- Legarto, J.**, 2006c. Liste des conservateurs d'ensilage homologués au 26/3/2006. Available at: http://www.inst-elevage.asso.fr/spip.php?page=article_espace&id_espace=931&id_article=10123 [Consulté septembre 28, 2011].
- Leistner, L.**, 1995. Stable and safe fermented sausages world-wide. Dans *Fermented meats*. England: Campbell-Platt, G., Cook, P.E., p. 160-175.
- LeJeune, J T, Besser, T E & Hancock, D D**, 2001. Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), p.3053-3057.
- LeJeune, J T, Besser, T E, Merrill, N.L., et al.**, 2001. Livestock drinking water microbiology and the factors influencing the quality of drinking water offered to cattle. *Journal of Dairy Science*, 84(8), p.1856-1862.
- Lema, M., Williams, L. & Rao, D.R.**, 2001. Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. *Small Ruminant Research: The Journal of the International Goat Association*, 39(1), p.31-39.
- Lerman, Y. et al.**, 1992. A cluster of cases of *Escherichia coli* O157 infection in a day-care center in a communal settlement (Kibbutz) in Israel. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(2), p.520-521.
- Leroy, F. & De Vuyst, L.**, 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), p.67-78.
- Letort, C. & Juillard, V.**, 2001. Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), p.1023-1029.
- Levine, M.M.**, 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *The Journal of Infectious Diseases*, 155(3), p.377-389.
- Li, Y. & Nishino, N.**, 2011. Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Applied Microbiology*, 110(6), p.1561-1570.
- Lin, J. et al.**, 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), p.3094-3100.
- Lindgren, S.E. & Dobrogosz, W.J.**, 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 7(1-2), p.149-163.
- Lindstedt, B.-A. et al.**, 2007. Study of polymorphic variable-number of tandem repeats loci in the ECOR collection and in a set of pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* isolates for use in a genotyping assay. *Journal of Microbiological Methods*, 69(1), p.197-205.
- Lindström, Miia et al.**, 2010. *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(4), p.281-304.
- Lingaas, F. & Tveit, B.**, 1992. Etiology of acetoneemia in Norwegian cattle. 2. Effect of butyric acid, valeric acid, and putrescine. *Journal of Dairy Science*, 75(9), p.2433-2439.
- Lingwood, C.A. et al.**, 1987. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli*

- produced verotoxin in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(18), p.8834-8839.
- Lister, J.**, 1873. A further contribution to the natural history of bacteria and the germ theory of fermentative changes. *Quarterly Journal of Microscopy Sciences*, 13, p.380-408.
- Løbersli, I., Haugum, K. & Lindstedt, B.-A.**, Rapid and high resolution genotyping of all *Escherichia coli* serotypes using 10 genomic repeat-containing loci. *Journal of Microbiological Methods*, (0). Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701211003915> [Consulté novembre 20, 2011].
- Loirat, C. et al.**, 1992. Syndrome Hémolytique et Urémique de l'enfant: aspects cliniques, étiologiques, éléments du pronostic et résultats thérapeutiques. Flammarion-Médecine-Sciences., Paris, France.
- Londero, A. et al.**, 2011. Inhibitory activity of cheese whey fermented with kefir grains. *Journal of Food Protection*, 74(1), p.94-100.
- Lopez, E.L. et al.**, 1989. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *The Journal of Infectious Diseases*, 160(3), p.469-475.
- Loubiere, P. & Cocaign-Bousquet, M.**, 2009. Métabolisme des bactéries lactiques: devenir du carbone. Dans *Bactéries Lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*. Paris, France: Drider, D. and Prévost, H., p. 29-50.
- Low, J.C. & Donachie, W.**, 1997. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Veterinary Journal*, 153(1), p.9-29.
- Low, J Christopher et al.**, 2005. Rectal carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in slaughtered cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), p.93-97.
- Lowe, R.M.S. et al.**, 2010. Factors influencing the persistence of *Escherichia coli* O157:H7 lineages in feces from cattle fed grain versus grass hay diets. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(8), p.667-675.
- Lynn, T.V. et al.**, 1998. The occurrence and replication of *Escherichia coli* in cattle feeds. *Journal of Dairy Science*, 81(4), p.1102-1108.
- Madic, J et al.**, 2010. Simplex and multiplex real-time PCR assays for the detection of flagellar (H-antigen) *fliC* alleles and intimin (*eae*) variants associated with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*, 109(5), p.1696-1705.
- Mahr, K., Hillen, W. & Titgemeyer, F.**, 2000. Carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*: analysis of the *ccpA* region. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), p.277-283.
- Mailles, A. et al.**, 2006. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection linked to consumption of ground beef, France, 2005. Dans 6th International Symposium on Shigatoxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections. Melbourne, Australia.
- Mainil, J.G. & Daube, G.**, 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), p.1332-1344.
- Mak, P.P., Ingham, B.H. & Ingham, S.C.**, 2001. Validation of apple cider pasteurization treatments against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 64(11), p.1679-1689.
- Makarova, K. et al.**, 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), p.15611-15616.
- Makras, L. & De Vuyst, Luc**, 2006. The *in vitro* inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *International Dairy Journal*, 16(9), p.1049-1057.

- de Man, J.C., Rogosa, M. & Sharpe, M.E.**, 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 23(1), p.130-135.
- Marcinakova, M. et al.**, 2008. A new probiotic and bacteriocin-producing strain of *Enterococcus faecium* EF9296 and its use in grass ensiling. *Czech Journal of Animal Science*, 53(8), p.336-345.
- Martin, S.A. & Nisbet, David J.**, 1992. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 75, p.1736-1744.
- Masschalck, B., Van Houdt, R. & Michiels, C.W.**, 2001. High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), p.325-332.
- Matthews, L et al.**, 2006. Super-shedding cattle and the transmission dynamics of *Escherichia coli* O157. *Epidemiology and Infection*, 134(1), p.131-142.
- Maule, A.**, 2000. Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. *Symposium Series (Society for Applied Microbiology)*, (29), p.71S-78S.
- Mäyrä-Mäkinen, A. & Bigret, M.**, 1993. Lactic acid bacteria. Dans *Industrial use and production of lactic acid bacteria*. New York, NY: Salminen, S.; von Wright, A., p. 65-96.
- McAllister, T. et al.**, 2011. Review: The use of direct feed microbials to mitigate pathogens and enhance production in cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, 91(2), p.193-211.
- McDonald, P., Henderson, A., R & Heron, S., J.E.**, 1991. The biochemistry of silage. Dans *The biochemistry of silage*. Marlow. Marlow: Chalcombe Publications.
- McEniry, J. et al.**, 2010. Assessing the impact of various ensilage factors on the fermentation of grass silage using conventional culture and bacterial community analysis techniques. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), p.1584-1593.
- McGee, P. et al.**, 2002. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in farm water: its role as a vector in the transmission of the organism within herds. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), p.706-713.
- Mélida, H. et al.**, 2010. The phenolic profile of maize primary cell wall changes in cellulose-deficient cell cultures. *Phytochemistry*, 71(14-15), p.1684-1689.
- Meyer-Broseta, S. et al.**, 2001. Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157:H7. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203(4), p.347-361.
- Michel, P. et al.**, 1999. Temporal and geographical distributions of reported cases of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Ontario. *Epidemiology and Infection*, 122(2), p.193-200.
- Michino, H. et al.**, 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *American Journal of Epidemiology*, 150(8), p.787-796.
- Middlehoven, W.J. & VanBaalén, A.H.M.**, 1988. Development of the yeast flora of whole crop maize during ensiling and during subsequent aerobiosis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 42(3), p.199-207.
- Miko, A. et al.**, 2010. Evaluation of multiple-locus variable number of tandem-repeats analysis (MLVA) as a method for identification of clonal groups among enteropathogenic, enterohaemorrhagic and avirulent *Escherichia coli* O26 strains. *FEMS Microbiology Letters*, 303(2), p.137-146.
- Mills, S. et al.**, 2006. Plasmids of lactococci - genetic accessories or genetic necessities? *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), p.243-273.
- Milne, L.M. et al.**, 1999. *Escherichia coli* O157 incident associated with a farm open to members of the public. *Communicable Disease and Public Health / PHLS*, 2(1), p.22-26.

- Monaghan, A. et al.**, 2011. Serotypes and virulence profiles of non-O157 Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) from bovine farms. *Applied and Environmental Microbiology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22003024> [Consulté novembre 3, 2011].
- Monday, S.R., Beisaw, A. & Feng, P.C.H.**, 2007. Identification of Shiga toxigenic *Escherichia coli* seropathotypes A and B by multiplex PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 21(4), p.308-311.
- Montel, M.C. et al.**, 1996. Biochemical activities of *Micrococcaceae* and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiology*, 13(6), p.489-499.
- Montet, M.P. et al.**, 2009. Fate of acid-resistant and non-acid resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in experimentally contaminated French fermented raw meat sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 129(3), p.264-270.
- Moreira, C.N. et al.**, 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Veterinary Microbiology*, 93(3), p.179-183.
- Morgavi, D.P. & Riley, R., T.**, 2007. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3-4), p.201-212.
- Moxley, Rodney A et al.**, 2009. *Escherichia coli* O157:H7 vaccine dose-effect in feedlot cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7), p.879-884.
- Muck, R.**, 1988. Factors influencing silage quality and their implications for management. *Journal of Dairy Science*, 71(11), p.2992-3002.
- Mufandaedza, J. et al.**, 2006. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1), p.147-152.
- Muto, T. et al.**, 2008. Outbreaks of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections among children with animal contact at a dairy farm in Yokohama City, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 61(2), p.161-162.
- Myllykoski, J et al.**, 2009. Type C bovine botulism outbreak due to carcass contaminated non-acidified silage. *Epidemiology and Infection*, 137(2), p.284-293.
- Naghmouchi, K., et al.**, 2001. Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*. 162(2), p.99-107.
- Nam, H.M. et al.**, 2005. Detection of *Campylobacter jejuni* in dairy farm environmental samples using SYBR Green real-time polymerase chain reaction. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2(2), p.160-168.
- Nataro, J P & Kaper, J B.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), p.142-201.
- Naylor, S.W., Gally, D.L. & Low, J Christopher**, 2005. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 295(6-7), p.419-441.
- Naylor, S.W. et al.**, 2003. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infection and Immunity*, 71(3), p.1505-1512.
- Nicholson, F.A., Groves, S.J. & Chambers, B.J.**, 2005. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology*, 96(2), p.135-143.
- Niderkorn, V., Boudra, H. & Morgavi, D.P.**, 2006. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), p.849-856.
- Niderkorn, V. et al.**, 2007. Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an *in vitro* simulated corn silage model. *Food Additives and Contaminants*, 24(4), p.406-415.

- Nishino, N. et al.**, 2007. Biogenic amine production in grass, maize and total mixed ration silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Applied Microbiology*, 103(2), p.325-332.
- Niu, Y.D. et al.**, 2009. Host range and lytic capability of four bacteriophages against bovine and clinical human isolates of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), p.646-656.
- Nkosi, B.D. et al.**, 2010. Effects of homofermentative and heterofermentative bacterial silage inoculants on potato hash silage fermentation and digestibility in rams. *Animal Feed Science and Technology*, 157(3-4), p.195-200.
- Nkosi, B.D. et al.**, 2009. Effects of ensiling whole crop maize with bacterial inoculants on the fermentation, aerobic stability, and growth performance of lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 154(3-4), p.193-203.
- Normand, J. et al.**, 2005. L'alimentation des bovins et des ovins et la qualité des viandes, France: *Institut de l'Elevage*.
- O'Brien, A.D. et al.**, 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*, 146(6), p.763-769.
- O'Brien, S.J., Adak, G.K. & Gilham, C.**, 2001. Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 7(6), p.1049-1051.
- O'Kiely, P., Byrne, C. & Bolton, D.**, 2001. Survival of *E. coli* O157:H7 added to grass at ensiling and its influence on silage fermentation. Dans *19th International Grassland Congress*. proceedings of the XIX international grassland congress- Grassland ecosystems: an outlook into the 21st century. Sao Pedro, Brazil: Gomide, JA; Mattos, WRS; DaSilva, SC, p. 792-793.
- Ogden, I D et al.**, 2002. Long-term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp. *Letters in Applied Microbiology*, 34(2), p.100-104.
- Ohya, T., Marubashi, T. & Ito, H.**, 2000. Significance of fecal volatile fatty acids in shedding of *Escherichia coli* O157 from calves: experimental infection and preliminary use of a probiotic product. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 62(11), p.1151-1155.
- Okafor, C.C. et al.**, 2011. Descriptive epidemiology of bovine tuberculosis in michigan (1975-2010): lessons learned. *Veterinary Medicine International*, 2011, p.874924.
- Orsi, R. et al.**, 2000. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *Journal of Stored Products Research*, 36(1), p.75-87.
- Ortolani, M.B.T. et al.**, 2010. Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Spp., and *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(2), p.175-180.
- Ostling, C.E. & Lindgren, S.E.**, 1993. Inhibition of enterobacteria and *Listeria* growth by lactic, acetic and formic acids. *The Journal of Applied Bacteriology*, 75(1), p.18-24.
- Ozkan, G. et al.**, 2004. Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(14), p.1807-1811.
- Palmer, M.V.**, 2007. Tuberculosis: a reemerging disease at the interface of domestic animals and wildlife. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 315, p.195-215.
- Papathomopoulou, K. & Kotzekidou, P.**, 2009. Inactivation of verocytotoxigenic *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* co-cultured with *Lactobacillus sakei* in a simulated meat fermentation medium. *Journal of Food Safety*, 29(3), p.331-347.

- Paton, A. & Paton, J.**, 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(2), p.598-602.
- Paton, A.W. et al.**, 1996. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(7), p.1622-1627.
- Pearce, M C et al.**, 2004. Temporal shedding patterns and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, O145, and O157 in a cohort of beef calves and their dams. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), p.1708-1716.
- Pedroso, A. et al.**, 2010. Control of *Escherichia coli* O157:H7 in corn silage with or without various inoculants: Efficacy and mode of action. *Journal of Dairy Science*, 93(3), p.1098-1104.
- Pereira, C.I. et al.**, 2009. Bacterial dynamics in model cheese systems, aiming at safety and quality of Portuguese-style traditional ewe's cheeses. *Journal of Food Protection*, 72(11), p.2243-2251.
- Peterson, R.E., Klopfenstein, T J, Moxley, R A, Erickson, G E, Hinkley, S., Bretschneider, G., et al.**, 2007. Effect of a vaccine product containing type III secreted proteins on the probability of *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding and mucosal colonization in feedlot cattle. *Journal of Food Protection*, 70(11), p.2568-2577.
- Peterson, R.E., Klopfenstein, T J, Moxley, R A, Erickson, G E, Hinkley, S., Rogan, D, et al.**, 2007. Efficacy of dose regimen and observation of herd immunity from a vaccine against *Escherichia coli* O157:H7 for feedlot cattle. *Journal of Food Protection*, 70(11), p.2561-2567.
- Peterson, R.E., Klopfenstein, T J, Erickson, G E, et al.**, 2007. Effect of *Lactobacillus acidophilus* strain NP51 on *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding and finishing performance in beef feedlot cattle. *Journal of Food Protection*, 70(2), p.287-291.
- Pfeiler, E.A. & Klaenhammer, Todd R.**, 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*, 15(12), p.546-553.
- Phuntsok, T. et al.**, 1998. Biogenic amines in silage, apparent postruminal passage, and the relationship between biogenic amines and digestive function and intake by steers. *Journal of Dairy Science*, 81, p.2193-2203.
- Pitt, R. & Sniffen, C.**, 1985. Agriculture Engineering. *Ext. Bulletin*, 452.
- Plot, B.**, 2008. Taxonomy of lactic acid bacteria. Dans *Les bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*. Sciences et Techniques Agroalimentaires. Paris, France: Corrieu G., Luquet F.M., p. 1_106.
- Plym, F. & Wierup, M.**, 2006. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, 25(2), p.541-554.
- Pommerville, J.**, 2011. *Alcamo's fundamentals of microbiology - 9th ed* Jones and Bartlett Publishers., United States of America. Available at: http://books.google.com/books?id=RJNQwQB8IXIC&pg=PA538&dq=fungal+growth&hl=en&ei=AwNSTpbfCe_54QSo_tmTBQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=3&ved=0CDIQ6AEwAg#v=onepage&q=fungal%20growth&f=false [Consulté août 22, 2011].
- Priest, F.G. & Barker, M.**, 2010. Gram-negative bacteria associated with brewery yeasts: reclassification of *Obesumbacterium proteus* biogroup 2 as *Shimwellia pseudoproteus* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Escherichia blattae* to *Shimwellia blattae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(4), p.828 -833.
- Purwin, C. et al.**, 2006. Silage quality: microbial health promoting and production aspects. *Medycyna Weterynaryjna*, 62(8), p.865-869.

- Quilliam, R.S. et al.**, 2011. Seroprevalence and risk factors associated with *Escherichia coli* O157 in a farming population. *Zoonoses and Public Health*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21884032> [Consulté novembre 2, 2011].
- R Development Core Team & R foundation for statistical computing.**, 2011. *R: A language and environment for statistical computing.*, Vienna, Austria. Available at: <http://www.R-project.org>.
- La Ragione, R M et al.**, 2005. Colonization of 8-week-old conventionally reared goats by *Escherichia coli* O157: H7 after oral inoculation. *Journal of Medical Microbiology*, 54(Pt 5), p.485-492.
- La Ragione, R M et al.**, 2006. Influence of colostrum deprivation and concurrent *Cryptosporidium parvum* infection on the colonization and persistence of *Escherichia coli* O157: H7 in young lambs. *Journal of Medical Microbiology*, 55(Pt 7), p.819-828.
- La Ragione, Roberto M et al.**, 2009. *Escherichia coli* O157:H7 colonization in small domestic ruminants. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), p.394-410.
- Rammer, C. & Lingvall, P.**, 1997. Influence of farmyard manure on the quality of grass silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(1), p.133-140.
- Rammer, C. et al.**, 1994. Ensiling of manured crops - Effects on fermentation. *Grass and forage science*, 49(3), p.343-351.
- Rangel, J.M. et al.**, 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases*, 11(4), p.603-609.
- Rasmussen, M.A. et al.**, 1993. Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 114(1), p.79-84.
- Rattanachaikunsopon, P. & Phumkhachorn, P.**, 2010. Synergistic antimicrobial effect of nisin and p-cymene on *Salmonella enterica* serovar *Typhi* *in vitro* and on ready-to-eat food. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(3), p.520-524.
- van Reenen, C.A. & Dicks, L.M.T.**, 2011. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Archives of Microbiology*, 193(3), p.157-168.
- Reich, L. & Kung, M.**, 2010. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Animal Feed Science and Technology*, 159(3-4), p.105-109.
- Reid, G. et al.**, 2010. Responders and non-responders to probiotic interventions: how can we improve the odds? *Gut Microbes*, 1(3), p.200-204.
- Reida, P. et al.**, 1994. An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. *Zentralblatt Für Bakteriologie: International Journal of Medical Microbiology*, 281(4), p.534-543.
- Reilly, L. & Courtenay, O.**, 2007. Husbandry practices, badger sett density and habitat composition as risk factors for transient and persistent bovine tuberculosis on UK cattle farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 80(2-3), p.129-142.
- Requena, T. et al.**, 2010. Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), p.332-344.
- Ribot, E.M. et al.**, 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(1), p.59-67.
- Richard, H. & Foster, John W.**, 2004. *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *Journal of*

- Bacteriology*, 186(18), p.6032-6041.
- Riley, L.W. et al.**, 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *The New England Journal of Medicine*, 308(12), p.681-685.
- Rivas, L. et al.**, 2010. *In vivo* and *ex vivo* evaluations of bacteriophages e11/2 and e4/1c for use in the control of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), p.7210-7216.
- Roberts, C.L. et al.**, 1995. The role of heightened surveillance in an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiology and Infection*, 115(3), p.447-454.
- Rodriguez, E, Calzada, J., et al.**, 2005. Antimicrobial activity of pediocin producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal*, 15(1), p.51-57.
- Rodriguez, Eva, Arques, Juan L, et al.**, 2005. Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in raw-milk cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), p.3399-3404.
- Roe, A.J. et al.**, 2002. Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 7), p.2215-2222.
- Rogosa, M.**, 1970. Characters used in the classification of lactobacilli. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 20, p.519-533.
- Roigé, M.B. et al.**, 2009. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Revista Iberoamericana De Micología: Órgano De La Asociación Española De Especialistas En Micología*, 26(4), p.233-237.
- Rosenbach, F.J.**, 1884. *Microorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen.*, Wiesbaden: J.F. Bergmann.
- Rossi, F. & Dellaglio, F.**, 2007. Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of microbial indicators. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), p.1707-1715.
- Rouse, S. & van Sinderen, D.**, 2008. Bioprotective potential of lactic acid bacteria in malting and brewing. *Journal of Food Protection*, 71(8), p.1724-1733.
- Ruas-Madiedo, P. & de los Reyes-Gavilán, C.G.**, 2005. Invited Review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 88(3), p.843-856.
- Rugbjerg, H., Nielsen, E.M. & Andersen, J.S.**, 2003. Risk factors associated with faecal shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in eight known-infected Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 58(3-4), p.101-113.
- Russell, J.B. & Rychlik, J.L.**, 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5519), p.1119-1122.
- Russell, J.B., Diez-Gonzalez, F. & Jarvis, G.N.**, 2000. Invited Review: Effects of diet shifts on *Escherichia coli* in cattle. *Journal of Dairy Science*, 83, p.863-873.
- Russo, T.A. & Johnson, J.R.**, 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), p.1753-1754.
- de Sablet, T. et al.**, 2009. Human microbiota-secreted factors inhibit Shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity*, 77(2), p.783-790.
- Santisteban-López, A., Palou, E. & López-Malo, A.**, 2007. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a(w) and pH. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), p.486-497.
- Schamberger, G.P. et al.**, 2004. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in cattle by

- addition of colicin E7-producing *E. coli* to feed. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), p.6053-6060.
- Schillinger, U. & Lucke, F.K.**, 1990. Lactic acid bacteria as protective cultures in meat products. *Fleischwirtschaft*, 70(11), p.1296-1299.
- Schleifer, K.H. et al.**, 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 6, p.183-195.
- Schmidt, R.J. & Kung Jr., L.**, 2010. The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silages made at different locations. *Journal of Dairy Science*, 93(4), p.1616-1624.
- Schocken-Iturrino, R. et al.**, 2005. Chemical and microbiological changes of Tifton 85 grass silage after opening of the silos. *Revista Brasileira de Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science*, 34(2), p.464-471.
- Schoder, D. et al.**, 2011. Important vectors for *Listeria monocytogenes* transmission at farm dairies manufacturing fresh sheep and goat cheese from raw milk. *Journal of Food Protection*, 74(6), p.919-924.
- Schüller, S., Frankel, Gad & Phillips, A.D.**, 2004. Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. *Cellular Microbiology*, 6(3), p.289-301.
- Schwartz, D.C. et al.**, 1983. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 47 Pt 1, p.189-195.
- Scott, L. et al.**, 2006. A comparison of the survival in feces and water of *Escherichia coli* O157:H7 grown under laboratory conditions or obtained from cattle feces. *Journal of Food Protection*, 69(1), p.6-11.
- Scudamore, K. & Livesey, C.**, 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(1), p.1-17.
- Selwet, M.**, 2004. Influence of formic acid on bacterial growth during the ensilage of grass-legume mixtures. *Medycyna Weterynaryjna*, 60(7), p.763-765.
- Shah, N.P.**, 2007. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17(11), p.1262-1277.
- Shere, J.A., Bartlett, K.J. & Kaspar, C.W.**, 1998. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), p.1390-1399.
- Sherman, J.M.**, 1937. The Streptococci. *Bacteriological Reviews*, 1(1), p.3-97.
- Siezen, R.J. et al.**, 2005. Complete sequences of four plasmids of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 reveal extensive adaptation to the dairy environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), p.8371-8382.
- Silla Santos, M.H.**, 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2-3), p.213-231.
- Silvestro, L. et al.**, 2004. Asymptomatic carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in farm workers in Northern Italy. *Epidemiology and Infection*, 132(5), p.915-919.
- Smith, D. et al.**, 2001. Ecological relationships between the prevalence of cattle shedding *Escherichia coli* O157:H7 and characteristics of the cattle or conditions of the feedlot pen. *Journal of Food Protection*, 64(12), p.1899-1903.
- Smith, David R et al.**, 2009. A randomized longitudinal trial to test the effect of regional vaccination within a cattle feedyard on *Escherichia coli* O157:H7 rectal colonization, fecal shedding, and hide contamination. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7), p.885-892.

- Snead, M.C. et al.**, 1980. The effectiveness of chlorine residuals in inactivation of bacteria and viruses introduced by post treatment contamination. *Water Research*, 14(5), p.403-408.
- Snedeker, K.G., Campbell, M. & Sargeant, J M**, 2011. A systematic review of vaccinations to reduce the shedding of *Escherichia coli* O157 in the faeces of domestic ruminants. *Zoonoses and Public Health*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824378> [Consulté novembre 2, 2011].
- Sobrino-Lopez, A. & Marti-n-Belloso, O.**, 2008. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, 18(4), p.329-343.
- Söderström, A., Lindberg, A. & Andersson, Y.**, 2005. EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August-September 2005. *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 10(9), p.E050922.1.
- Sofos, J.N. & Geornaras, I.**, 2010. Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science*, 86(1), p.2-14.
- Soloaga, A. et al.**, 1999. Insertion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Molecular Microbiology*, 31(4), p.1013-1024.
- Spoelstra, S.F.**, 1985. Nitrate in silage. *Grass and forage science*, 40(1), p.1-11.
- Stanford, K, Bach, S J, et al.**, 2010. Effect of rumen protozoa on *Escherichia coli* O157:H7 in the rumen and feces of specifically faunated sheep. *Journal of Food Protection*, 73(12), p.2197-2202.
- Stanford, K, McAllister, T A, et al.**, 2010. Oral delivery systems for encapsulated bacteriophages targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *Journal of Food Protection*, 73(7), p.1304-1312.
- Stanford, K et al.**, 2005. Monitoring *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated and naturally colonized feedlot cattle and their environment. *Journal of Food Protection*, 68(1), p.26-33.
- Steidlová, S. & Kalac, P.**, 2002. Levels of biogenic amines in maize silages. *Animal Feed Science and Technology*, 102(1-4), p.197-205.
- Steidlová, S. & Kalac, P.**, 2004. The effects of lactic acid bacteria inoculants and formic acid on the formation of biogenic amines in grass silages. *Archives of Animal Nutrition*, 58(3), p.245-254.
- Steidlová, S. & Kalac, P.**, 2003. The effects of using lactic acid bacteria inoculants in maize silage on the formation of biogenic amines. *Archiv Für Tierernährung*, 57(5), p.359-368.
- Steinkraus, K.H.**, 1983. Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, cereals and legumes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49(3), p.337-348.
- Stenutz, R., Weintraub, A. & Widmalm, G.**, 2006. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), p.382-403.
- Stephens, T.P. et al.**, 2007. Reduction of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* in feces and on hides of feedlot cattle using various doses of a direct-fed microbial. *Journal of Food Protection*, 70(10), p.2386-2391.
- Stiles, M.E. & Holzapfel, W.H.**, 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), p.1-29.
- Storm, I.M.L.D. et al.**, 2010. Dynamics in the microbiology of maize silage during whole-season storage. *Journal of Applied Microbiology*, 109(3), p.1017-1026.
- Strachan, N.J., Fenlon, D.R. & Ogden, I D**, 2001. Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157. *FEMS Microbiology Letters*, 203(1), p.69-73.

- Strachan, Norval J C et al., 2006. *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *International Journal of Food Microbiology*, 112(2), p.129-137.
- Strockbine, N.A. et al.**, 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infection and Immunity*, 53(1), p.135-140.
- Sugiyama, A. et al.**, 2005. An outbreak of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in a nursery school in Mie Prefecture. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 58(6), p.398-400.
- Sun, Y. et al.**, 2011. Kinetic study for Fe(NO₃)₃ catalyzed hemicellulose hydrolysis of different corn stover silages. *Bioresource Technology*, 102(3), p.2936-2942.
- Swyers, K.L. et al.**, 2008. Effects of direct-fed microbial supplementation on digestibility and fermentation end-products in horses fed low- and high-starch concentrates. *Journal of Animal Science*, 86(10), p.2596-2608.
- Swyers, K.L. et al.**, 2011. Naturally colonized beef cattle populations fed combinations of yeast culture and an ionophore in finishing diets containing dried distiller's grains with solubles had similar fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 74(6), p.912-918.
- Tabacco, E. et al.**, 2009. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. *Journal of Applied Microbiology*, 107(5), p.1632-1641.
- Tabasco, R. et al.**, 2011. Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: resistance and metabolism. *Food Microbiology*, 28(7), p.1345-1352.
- Tagg, J. & McGiven, A.**, 1971. Assay System for Bacteriocins. *Applied Microbiology*, 21(5), p.943-&.
- Takada, A. et al.**, 2007. RNase E is required for induction of the glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(1), p.158-164.
- Tanous, C. et al.**, 2006. Glutamate dehydrogenase activity can be transmitted naturally to *Lactococcus lactis* strains to stimulate amino acid conversion to aroma compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), p.1402-1409.
- Tarr, P.I., Gordon, C.A. & Chandler, W.L.**, 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet*, 365(9464), p.1073-1086.
- Te Giffel, M.C. et al.**, 2002. Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), p.625-630.
- Teunis, P., Takumi, K. & Shinagawa, K.**, 2004. Dose response for infection by *Escherichia coli* O157:H7 from outbreak data. *Risk Analysis: An Official Publication of the Society for Risk Analysis*, 24(2), p.401-407.
- Thiolet, J.M. et al.**, 2007. Prévalence des infections nosocomiales, France, 2006. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, p.51-52.
- Thompson, J. & Gentry-Weeks, C.R.**, 1994. Métabolisme des bactéries lactiques. Dans *Bactéries Lactiques*. Uriage, France: De Roissart H., Luquet F.M., p. 239-290.
- Thomson, Daniel U et al.**, 2009. Use of a siderophore receptor and porin proteins-based vaccine to control the burden of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7), p.871-877.
- Tilden, J., Jr et al.**, 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *American Journal of Public Health*, 86(8), p.1142-1145.
- Tkalcic, Suzana et al.**, 2003. Fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in weaned calves following treatment with probiotic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 66(7),

- p.1184-1189.
- Toldrá, F.**, 2002. *Research advances in the quality of meat and meat products*, Trivandrum India: Research Signpost.
- Travers, M.-A. et al.**, 2011. Probiotics for the control of parasites: an overview. *Journal of Parasitology Research*, 2011, p.610769.
- Trias, R. et al.**, 2008. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 11(4), p.231-236.
- Tsai, Y., Cheng, P. & Pan, T.**, 2010. Immunomodulating Activity of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 - Infected Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(21), p.11265-11272.
- Tsegaye, M. & Ashenafi, M.**, 2005. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the processing and storage of Ergo and Ayib, traditional Ethiopian dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 103(1), p.11-21.
- Tsenkovskii, L.**, 1878. Gel formation in sugar beet solutions. *Proc. Soc. Sci. Nat. Imper. Univ. Karkov*, 12, p.137-167.
- Uhlich, G.A., Rogers, D.P. & Mosier, D.A.**, 2010. *Escherichia coli* serotype O157:H7 retention on solid surfaces and peroxide resistance is enhanced by dual-strain biofilm formation. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(8), p.935-943.
- Undersander, D.**, 2010. Alfalfa management. Available at: http://www.soils.wisc.edu/extension/materials/CCA_Alfalfa_Mgmt.pdf.
- VanOs, M., VanVuuren, A. & Spoelstra, S.**, 1997. Mechanisms of adaptation in sheep to overcome silage intake depression induced by biogenic amines. *British Journal of Nutrition*, 77(3), p.399-415.
- VanTieghem, P.**, 1878. Sur la gomme de sucrerie (*Leuconostoc mesenteroides*). *Annales des Sciences Naturelles Botanique*, 7, p.180-203.
- Venter, P. et al.**, 2006. The influence of sanitizers on the lipopolysaccharide composition of *Escherichia coli* O111. *International Journal of Food Microbiology*, 111(3), p.221-227.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F. & Debevere, J.**, 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 96(2), p.149-164.
- Vernozy-Rozand, C. & Montet, M.P.**, 2001. *Escherichia coli* O157:H7., Paris, France.
- Vilar, M. et al.**, 2007. Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 90(11), p.5083-5088.
- Vilte, D.A. et al.**, 2011. Reduced faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle following systemic vaccination with γ -intimin C₂₈₀ and EspB proteins. *Vaccine*, 29(23), p.3962-3968.
- Vimont, A. et al.**, 2006. Modeling and predicting the simultaneous growth of *Escherichia coli* O157: H7 and ground beef background microflora for various enrichment protocols. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), p.261-268.
- Vissers, M. et al.**, 2006. Improving farm management by modeling the contamination of farm tank milk with butyric acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 89(3), p.850-858.
- Vissers, M.M.M., Driehuis, F., et al.**, 2007. Minimizing the level of butyric acid bacteria spores in farm tank milk. *Journal of Dairy Science*, 90(7), p.3278-3285.
- Vissers, M.M.M., Te Giffel, M.C., et al.**, 2007. Minimizing the level of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk. *Journal of Dairy Science*, 90(7), p.3286-3293.
- Wachtel, M.R., Whitehand, L.C. & Mandrell, R.E.**, 2002. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *Journal of Food*

- Protection*, 65(1), p.18-25.
- Wagner, C. & Hensel, M.**, 2011. Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 715, p.17-34.
- Walker, J.K. et al.**, 1994. *Listeria innocua* isolated from a case of ovine meningoencephalitis. *Veterinary Microbiology*, 42(2-3), p.245-253.
- Wang, G. & Doyle, M P**, 1998. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *Journal of Food Protection*, 61(6), p.662-667.
- Wang, G., Zhao, T & Doyle, M P**, 1996. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), p.2567-2570.
- Weinberg, Z. et al.**, 2002. Ensiling whole-crop wheat and corn in large containers with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28(1), p.7-11.
- Weinberg, Z. et al.**, 2011. Preservation of total mixed rations for dairy cows in bales wrapped with polyethylene stretch film – A commercial scale experiment. *Animal Feed Science and Technology*, 164(1-2), p.125-129.
- Weinberg, Z.G. & Ashbell, G.**, 2003. Engineering aspects of ensiling. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), p.181-188.
- Weinberg, Z.G. et al.**, 2004. The effect of sewage irrigation on safety and hygiene of forage crops and silage. *Animal Feed Science and Technology*, 116(3-4), p.271-280.
- Wells, J.E., Berry, E.D. & Varel, V.H.**, 2005. Effects of common forage phenolic acids on *Escherichia coli* O157:H7 viability in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), p.7974-7979.
- Wendel, A.M. et al.**, 2009. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with consumption of packaged spinach, August-September 2006: the Wisconsin investigation. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 48(8), p.1079-1086.
- Wiedmann, M**, 2003. ADSA Foundation Scholar Award--An integrated science-based approach to dairy food safety: *Listeria monocytogenes* as a model system. *Journal of Dairy Science*, 86(6), p.1865-1875.
- Wieler, L.H. et al.**, 1998. Virulence properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(6), p.1604-1607.
- Wileman, B.W. et al.**, 2011. *Escherichia coli* O157:H7 shedding in vaccinated beef calves born to cows vaccinated prepartum with *Escherichia coli* O157:H7 SRP vaccine. *Journal of Food Protection*, 74(10), p.1599-1604.
- Wilkins, R., J, Syrjala-Qvist, L. & Bolsen, K.**, 1999. The future role of silage in sustainable animal production. Dans Proceedings of the 12th international silage conference. Uppsala, Sweden: T. Pauly, p. 23-40.
- Wilkinson, J.M. & Toivonen, M.I.**, 2003. *World silage: a survey of forage conservation around the world*, Chalcombe.
- Williams, A Prysor et al.**, 2006. Earthworms as vectors of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and vermicomposts. *FEMS Microbiology Ecology*, 58(1), p.54-64.
- Wilson, J.B. et al.**, 1992. Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. *Epidemiology and Infection*, 108(3), p.423-439.
- Wilson, J.B. et al.**, 1998. Risk factors for infection with verocytotoxigenic *Escherichia coli* in cattle on Ontario dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 34(2-3), p.227-236.
- Wood, J.C., McKendrick, I J & Gettinby, G.**, 2006. Assessing the efficacy of within-animal

- control strategies against *E. coli* O157: a simulation study. *Preventive Veterinary Medicine*, 74(2-3), p.194-211.
- World Health Organization**, 2001. WHO | Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, a joint FAO/WHO expert consultation. Cordoba, Argentina, 1 - 4 October 2001. Available at: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/ [Consulté juillet 18, 2011].
- Yaakoubi, K. et al.**, 2009. Development of a multiwell antagonistic activity assay for the detection of bacteriocin production by lactic acid bacteria. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 17(1), p.32-45.
- Yang, C.-H. et al.**, 2001. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), p.3889 -3894.
- Yang, H.E., Yang, W.Z., et al.**, 2010. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminal or fecal contents incubated with corn or wheat dried distillers' grains with solubles. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(11), p.890-895.
- Yang, J, Cao, Y., et al.**, 2010. Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. *Journal of Dairy Science*, 93(7), p.3136-3145.
- Yang, JJ et al.**, 2009. Antibacterial action of selenium-enriched probiotics against pathogenic *Escherichia coli*. *Digestive Diseases and Sciences*, 54(2), p.246-254.
- Yimin Cai**, 1999. Identification and characterization of *Enterococcus* species isolated from forage crops and their influence on silage fermentation. *Journal of Dairy Science*, 82(11), p.2466-2471.
- Yoon, J.I., Bajpai, V.K. & Kang, S.C.**, 2011. Synergistic effect of nisin and cone essential oil of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu against *Listeria monocytogenes* in milk samples. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(1), p.109-114.
- Younts-Dahl, S M et al.**, 2004. Dietary supplementation with *Lactobacillus*- and *Propionibacterium*-based direct-fed microbials and prevalence of *Escherichia coli* O157 in beef feedlot cattle and on hides at harvest. *Journal of Food Protection*, 67(5), p.889-893.
- Younts-Dahl, Spring M et al.**, 2005. Reduction of *Escherichia coli* O157 in finishing beef cattle by various doses of *Lactobacillus acidophilus* in direct-fed microbials. *Journal of Food Protection*, 68(1), p.6-10.
- Yuksekdag, Z. & Aslim, Belma**, 2010. Assessment of potential probiotic- and starter properties of *Pediococcus* spp. isolated from Turkish-type fermented sausages (sucuk). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), p.161-168.
- Yuksekdag, Z., Beyath, Y. & Aslim, B**, 2004. Metabolic activities of *Lactobacillus* spp. strains isolated from kefir. *Die Nahrung*, 48(3), p.218-220.
- Yvon, M.**, 2006. Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, 61(2), p.88-96.
- Zadik, P.M., Chapman, P.A. & Siddons, C.A.**, 1993. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Journal of Medical Microbiology*, 39(2), p.155-158.
- Zago, M. et al.**, 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28(5), p.1033-1040.
- Zebeli, Q. et al.**, 2009. Maize silage particle length modulates feeding patterns and milk composition in loose-housed lactating Holstein cows. *Livestock Science*, 124(1-3), p.33-40.
- Zhang, G.J. et al.**, 2000. Influence of membrane physical state on the lysosomal proton permeability. *The Journal of Membrane Biology*, 175(1), p.53-62.

- Zhang, J., Kawamoto, H. & Cai, YM,** 2010. Relationships between the addition rates of cellulase or glucose and silage fermentation at different temperatures. *Animal Science Journal*, 81(3), p.325-330.
- Zhang, X.-H. et al.,** 2011. Subcutaneous and intranasal immunization with Stx2B-Tir-Stx1B-Zot reduces colonization and shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *Vaccine*, 29(22), p.3923-3929.
- Zhao, T et al.,** 1998. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(3), p.641-647.
- Zhao, T, Doyle, M P & Besser, R.E.,** 1993. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8), p.2526-2530.
- Zhao, Tong et al.,** 2003. Pathogenicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves and evaluation of fecal shedding by treatment with probiotic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 66(6), p.924-930.
- Zimmerhackl, L.-B. et al.,** 2010. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: Bacteriology and Clinical Presentation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 36(6), p.586-593.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Publication soumise à “Animal Feed Science and Technology”

« Silage processing and strategies to limit degradation due to undesirable microorganisms ».

Lysiane Dunière, Julien Sindou, Frédérique Chaucheyras-Durand, Isabelle Chevallier, et
Delphine Thévenot.

Silage processing and strategies to limit degradation due to undesirable microorganisms.

L. DUNIERE¹, J. SINDOU², F. CHAUCHEYRAS-DURAND^{2,3}, I. CHEVALLIER⁴ AND D. THEVENOT-SERGENTET^{1,5}.

1 Université de Lyon, VetAgro Sup, Unité de Recherche CALITYSS, Marcy l'Étoile, France

2 Lallemand Animal Nutrition, Blagnac, France

3 Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité de Microbiologie UR 454, Centre de Recherche de Clermont-Ferrand/Theix, Saint-Genès-Champanelle, France

4 Clermont Université VetAgro Sup, Unité de Recherche CALITYSS, Lempdes, France

5 Université de Lyon, VetAgro Sup, Laboratoire LMAP/LNR STEC, Université Lyon I, Marcy l'Étoile, France

Running headline: Microorganisms in silage processing.

Correspondence: Lysiane Dunière. Tel: +33 4 78 87 26 85; Fax: +33 4 78 87 26 69; Email: l.dunier@vetagro-sup.fr; Mailing address: Lysiane Dunière, VetAgro Sup, Unité CALITYSS/Equipe EMSA, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Étoile FRANCE.

Keywords: Silage, anaerobiosis, organic acids, Lactic acid bacteria, pathogenic microorganisms, spoilage microorganisms, Good Manufacturing practices, silage additives.

Summary

Accessibility to forage with high nutritional value all along the year is a physiological priority for ruminants and an economical priority for farmers. Ensiling is a preservation method of moist crops based on organic acids production by lactic acid bacteria under anaerobic conditions. However, silage could be a vector for undesirable microorganisms impairing crops preservation and animal performance or both animal and human health.

Major issues in silage processing are due to defaults in the Good Manufacturing Practices (GMP). In order to enhance silage preservation and guarantee the quality of this animal feed, silage additives such as chemical, enzymatic or bacterial agents could be employed.

The purpose of the present manuscript is to review existing information on microflora involved in silage processing, both desirable and undesirable microorganisms, and possible techniques, through GMP or silage additives, to limit silage degradation and economical and sanitary impact on animals and humans.

Introduction

The livestock sector is one of the fastest growing segments of the agricultural economy, particularly in the developing world. As demand for meat and dairy products continues to increase, questions arise as to how this demand will be met and by whom. Free disposal of a permanent forage base is a physiological priority for ruminants and an economical priority for farmers. Around the world, cereals productions are seasonal and a surplus of production is

available during the harvesting season whereas a deficit in crops availability is observed during winter.

Ensiling is a crops preservation method based on natural lactic acid fermentation under anaerobic conditions (Gollop et al. 2005). Very different plant material can be used for ensiling: grass, clover, alfalfa, barley, maize, wheat, sorghum (Ashbell & Weinberg 2006) and various wet material coming from food industry and referred as “by-products” such as apple pomace, beet pulp, brewer’s mash (AFSSA 2004). The primary objective of ensiling is to keep forages available all along the year for utilization as the main source of feed with high nutritional value for ruminants, thus improving the economic and environmental sustainability of production systems. The most important crops for ensiling are whole crop corn, alfalfa and various grasses (Weinberg & Ashbell 2003).

Corn silage is one of the most widely used components of dairy cow rations due to its high nutritional value. In France, corn silage is consumed by about 80 % of dairy cows during the year (AFSSA 2004) and it is extensively used for US herds (Jokela & Russelle 2003). In Denmark, the production of maize for silage has increased more than 70 % from 1990 to 2008, and is equal or larger than the production of grass silage (Storm et al. 2010). Over the world, maize silage may constitute 50–75 % of the diet (Driehuis et al. 2008) for a dairy cow consuming approximately 26 kg dry matter per day (Drackley et al. 2006).

The ensiling process involves many steps which should be timed and controlled carefully, in order to ensure successful ensiling with minimal economical losses and sanitary risks. Evaluation of the economical impact is difficult to realize as it involves lots of aspects in terms of cost for veterinary and medical care, losses of raw matter and decrease of yield production. Even if humans, animals and their pathogens have coexisted for millennia, recent sanitary risks are emerging owing to the combination of rapid structural changes in the livestock sector, geographic clustering of intensive livestock production facilities near urban population centers and the movement of animals, people and pathogens between intensive and traditional production systems. Animal and human health could thus be threatened through direct diseases or asymptomatic pathogenic carriage. Microbial contaminations can occur at a number of stages during farm-to-fork processing and interventions at the beginning of the food chain and especially in feedstuff are an ongoing area of interest in reduction of several risks. Due to the more and more extensive use of silage around the world, it is necessary to ensure realization of good final quality silages.

The purpose of the present manuscript is to review up to date information on microbial communities in silage, with a focus on corn silage, and possible techniques to limit silage degradation and economical and sanitary impact on both animals and humans.

I. Silage processing and role of different bacterial groups

The ensiling process is defined as following steps: harvesting the crops at the optimal stage of maturity, chopping, loading into a silo, compaction and sealing to exclude air, storing and finally unloading for animal feeding. Processing steps could be linked to biochemical and microbiological events divided in four parts: aerobic step, fermentation step, storage and unloading stages (Ashbell & Weinberg 2006).

Optimum harvesting period varies across crops, in order to obtain the best nutritive value for the herds. Forage maize should be harvested when plant material reaches 30 to 35 % of DM (Ashbell and Weinberg 2006). The bacterial flora of field grown maize is mainly composed of the following microorganisms: *Paenibacillus*, *Flavobacteriaceae*, *Sphingomonas*, *Exiguobacterium*, *Rhizobiaceae*, *Acetobacter* and *Buchnera* (Kadivar & Stapleton 2003). The low number of Lactic Acid Bacteria (LAB) detected in fresh herbage may be the consequence of their viable but not culturable state in response to adverse environmental conditions or inappropriate detection methods. Once plant material has been chopped and compacted into silos, important physico-chemical and microbial changes occur during storage.

The first step of ensiling process is due to the enzymatic activity of intact plant cells and is called residual respiration. These cells consume the oxygen entrapped in silage and use carbohydrates such as glucose and fructose (Shao et al. 2005). Moreover, plant cells and turgor collapse induce heat release (AFSSA 2004) which could be detrimental for LAB development. Early consumption of carbohydrates is detrimental for the following anaerobic lactic acid fermentation, which is the major effect of silage preservation. At the same time, aerobic microflora develop until oxygen has been entirely consumed or acidification is sufficient enough to stop their metabolism. The initial microbial activity is mostly due to epiphytic aerobic flora such as *Enterobacteria*, yeasts and molds. *Erwinia herbicola* and *Rahnella aquitilis* often dominate the fresh crop, but after ensiling these species are rapidly superseded by other species such as *Hafnia alvei*, *Escherichia coli*, and *Serratia fonticola* (Heron et al. 1993). Facultative anaerobic bacteria such as streptococci and *Leuconostoc* carry out a heterolactic fermentation which contributes to slightly decrease pH silage (Holzer et al. 2003).

This silage progressive acidification promotes the development of acid tolerant LAB species such as *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri* (Holzer et al. 2003), which convert water-soluble carbohydrates (WSC) mainly into lactic acid. It is the fermentation phase which starts when the ensiled mass has become anaerobic and lasts usually for several days to weeks. During this period, different groups of facultative aerobic or anaerobic microorganisms naturally found in plants compete for available nutrients. In well-processed silage, LAB dominate the fermentation allowing silage preservation through rapid achievement of a low pH. In case of long aerobic phase or slow acidification, microbial communities in silage will be dominated by clostridies, yeasts, molds and pathogenic microorganisms potentially incorporated (Driehuis & Oude Elferink 2000).

LAB typically associated with silage belong to the genera *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Enterococcus* (McDonald et al. 1991). Among LAB, some are known to be obligate homofermentative and could produce more than 90 % lactic acid from WSC but are unable to ferment pentoses. Facultative heterofermentative LAB could produce acetic acid, ethanol, hydrogen and carbon dioxide in addition to lactic acid. Obligate heterofermentative species could ferment both hexoses and pentoses to the same end-product of fermentation (Driehuis & Oude Elferink 2000). LAB are characterized by their acid tolerance and final pH value reaches 3.8 at the end of maize silages fermentation stage (Weinberg & Ashbell 2003).

(Parvin et al. 2010) have compared bacterial communities in silages at different processing steps and observed an evolution of the whole corn silage bacterial communities from *Enterobacter* to *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* and *Lactococcus lactis* after 30 days of ensiling. These authors have shown few shifts in bacterial communities in case of bacterial inoculants addition. (Li & Nishino 2011) did not observed any alteration in the initial bacterial communities in whole corn silage with or without bacterial inoculants after 54 days of ensiling. Results of this study also shown an evolution in bacterial communities: *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus parvulus*, *Weissella confusa* and *Klebsiella pneumoniae* were found in both the pre-ensiled crop and the silage, whereas *Weissella paramesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus lactis* were seen exclusively after ensiling.

During the storage period, the silage is sealed and no air penetrates. This stage usually lasts several months and as long as the pH is sufficiently low and anaerobiosis preserved, few changes occur. Numbers of LAB and other viable microorganisms decline over time, except for some specialized species such as *Lactobacillus buchneri* with continues to be active at low population densities (Driehuis et al. 1999). Some acid tolerant microorganisms can survive this storage period in an almost inactive state such as acid tolerant yeasts (Storm et al. 2010) or as spores such as butyric acid bacteria (Vissers et al. 2006). Moreover, it has been shown that homofermentative lactobacilli such as *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* tend to predominate in well-preserved silages, but these are invariably replaced by heterofermentative varieties such as *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri* in terminal stage of ensiling. It has been suggested that these changes were due to the high tolerance of heterofermentative species to one of their products: acetate (Beck 1972).

The fourth phase is the unloading phase for animal feeding. At this time, silos are opened and air ingress into the silage depending on the density and porosity of the plant material and the rate of silage removal. This is causing the restart of aerobic microorganisms' development initially present in silage and a pH increase (Driehuis & Oude Elferink 2000). Figure 1 summarizes the theoretical evolution of the main physico-chemical values and microbial populations in well-processed silage.

II. Undesirable microorganisms

Ensiling could be a vector for several undesirable microorganisms which could impair silage preservation and affect animal performance or both animal and human health. Microorganisms responsible for silage degradation are considered as spoilage microorganisms. They induce mainly economical losses. Those involved in animal and human diseases are considered as pathogenic microorganisms. This section presents the main undesirable microorganisms found in silage and their repercussions on animals and humans.

II-1 Yeasts and molds

Among undesirable microorganisms found in silage, yeasts are considered to be the most important group as they are involved in aerobic spoilage either during the aerobic phase at the beginning of ensiling or during the unloading phase (Driehuis & Oude Elferink 2000). They are facultative anaerobic eukaryotic microorganisms and *Candida* sp. are the species most frequently found at the periphery of silo (AFSSA 2004). A mathematical model of aerobic deterioration initiated by yeasts in grass and whole-crop maize silages has been developed and validated by Courtin & Spoelstra (1990). Moreover, yeasts are acid tolerant and during the unloading phase, silage oxygenation restarts their organic acids (succinic, citric or lactic acids) metabolism pathways inducing a pH increase and allowing the growth of less acid tolerant microorganisms. The amylase activity of epiphytic yeasts present in silage allows them to convert WSC into alcohols and CO₂. Ethanol is known to be toxic for liver and other alcohols impair silage quality and lead to decrease in feed intake (AFSSA 2004).

Although good processing silage could be considered as an anaerobic mass of plant material, about sixty species of fungi have been isolated from different kinds of silages, depending on the crops used, the season and the temperature (AFSSA 2004). Indeed, fungi are strictly aerobic microorganisms and they could only be found in the oxic zones such as silo periphery or near to the unloading face. The fungi identified in 195 maize silage samples in a Brazilian study showed that *Fusarium* sp. were the most frequent molds, followed by *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichosporon* sp., and *Cladosporium* sp. (Orsi et al. 2000).

Fungi are able to produce many secondary metabolites including mycotoxins which remain in silage even after fungal disappearance. *Penicillium* (70 %), *Fusarium* (47 %) and *Aspergillus* (34 %) are the most frequent mycotoxins producing fungi isolated from corn silage (Roigé et al. 2009). *Fusarium* sp. is able to produce more than 20 mycotoxins, mainly deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN) or fumonisin (FB) (Niderkorn et al. 2007).

A chronic exposure to low levels of mycotoxins typically gives non-specific symptoms such as impaired immune system and increased infections or metabolic and hormonal imbalances (Morgavi & Riley 2007). The transfer of toxins to dairy and meat products is a potential risk for humans (Fink-Gremmels 2008). Compared to other animals, ruminants are more protected against many mycotoxins due to the biotransformation capacity of certain rumen microorganisms. For example, ochratoxin A produced by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* is degraded to the less toxic compound ochratoxin α (EFSA 2006).

Yeasts and molds are thus responsible of silage degradations and potential negative effect on animal and human health.

II-2 Bacteria

Undesirable bacteria currently found in silage are more frequently associated with short-term diseases than with silage degradation. A pathology onset in human or animal could be due to a direct interaction between bacteria and their host (*Listeria monocytogenes* contamination for example) or the production of a toxic compound (as toxins or biogenic amines).

Butyric Acid Bacteria (BAB) found in silage are coming from soil accidentally integrated with plant material during the silo filling. They are able to convert lactic acid into butyric acid, hydrogen, and carbon dioxide at a relatively low pH. Important growth of BAB can therefore induce a pH increase and growth of less acid tolerant spoilage microorganisms. Grass and corn silage are the most important vectors of BAB transmission to animals (Vissers, Driehuis, et al. 2007) BAB found in silages are especially represented by endospore-forming bacteria of the genera *Clostridium*, especially *C. tyrobutyricum* and *C. butyricum* (Driehuis & Oude Elferink 2000), and *Bacillus* (Vissers, Te Giffel, et al. 2007). Bacterial spores have been found to survive the passage through the gastrointestinal tract of the dairy cow (Te Giffel et al. 2002). *Bacillus cereus* is an important spoilage microorganism in pasteurized milk and milk products and can lead to food poisoning (Abee et al. 2011). The occurrence of *Clostridium* in milk could lead to off-flavors and excessive gas formation, a defect known as late-blowing. *C. botulinum* is known to produce an extremely pathogenic toxin frequently resulting in death of animals and humans. Multiplication of *C. botulinum* and toxin production in poor making silages and in the gastrointestinal tract of cattle with botulism have been reported, thus contamination of the farm environment and raw milk, and further transmission through the dairy chain, are possible (Lindström et al. 2010). In United States, a ten-year study by Johnson et al. (2010) has identified eight outbreaks of type-A botulism in horses. The origin of infection was confirmed to be hay or silage in six out of eight outbreaks. *C. botulinum* has limited acid tolerance and in general it is considered that animals are at risk when feeding on anaerobically stored silage at a pH > 5.5, or on acidified silage accidentally containing animal carcasses from rodents for example, which may support growth and toxin production (Johnson et al. 2010; Myllykoski et al. 2009).

Listeria species can be found in various environments including water, grass, silage, decomposing organic matter, soil and feces (Hassan et al. 2001). The principal source of infection for ruminants is spoiled silage (Wiedmann 2003). Although *L. innocua* or *L. ivanovii* have been recorded as cause of animal diseases (Alexander et al. 1992; Walker et al. 1994), *L. monocytogenes* is the main species responsible for listeriosis in a variety of animals including humans (AFSSA 2009). There are several clinical manifestations for listeriosis such as encephalitis, abortion or septicemia which could lead to death (Low & Donachie 1997). It has been shown that presence of *L. monocytogenes* in silage, feces or both increases the risk of presence in milk and therefore transmission to human (Fox et al. 2009; Schoder et al. 2011). Depending on the location, high contamination levels above than 10^7 CFU.g⁻¹ of silage have been observed (AFSSA 2004). *L. monocytogenes* has been found in 6 % of grass and corn silage samples and it has been shown that when the pH was above 4.5, the risk of presence of *Listeria* sp. increases (Vilar et al. 2007). In a Brazilian study, the occurrence of *Listeria* sp. was observed in 65.6 % of grass silage samples at the opening of the silos and, among these 10 % of these were *Listeria monocytogenes* (Schocken-Iturrino et al. 2005). In addition to pH value, growth and survival of the pathogen in silage is depending on the degree of anaerobiosis (Brugère-Picoux 2008).

Ruminants are considered to be the main reservoir of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) (Hussein 2007) These STEC strains have been recognized as food borne pathogens (INVS 2007) and human infections are frequently acquired through the ingestion of contaminated food or water or through direct contact with contaminated animals or their environment (Karmali et al. 2010). Animal feed, such as silages, have been proposed as a vehicle for the spread of pathogenic *E. coli* within farm livestock (Davis et al. 2003). STEC contamination in silage could occur *via* shedding or through fertilization of fields with manure or irrigation water; however no data are available about STEC prevalence in silage. Several studies have shown that *E. coli* O157:H7 does not survive under a good fermentation process in various crops silages (Avery et al. 2005; Bach et al. 2002; Byrne et al. 2002). Nevertheless, an important characteristic of STEC physiology is their ability to resist to low pH and survive in fermented environment, compared to commensal strains (Lin, Smith, et al. 1996). Poor silage management has thus been shown to be a factor in *E. coli* O157 survival (Fenlon et al. 2000; Fenlon & Wilson 2000). *E. coli* were detected in substantial numbers in decaying part of silage including top and shoulders undergoing aerobic deterioration (Chen et al. 2005). At ensiling, insufficient anaerobiosis could delay the establishment of lactic acid fermentation in silage leading to a slow pH decrease and increasing the survival of pathogenic *E. coli* (AFSSA 2004; Chen et al. 2005). At opening, air penetrates into the silage resulting also in an important pH increase allowing STEC survival (Pedroso et al. 2010; Espiè et al. 2005).

Other microbial species which are frequently found in silage are still considered as pathogenic for animal and humans and should be searched in farm environments to limit cattle contaminations. Bovine Tuberculosis (bTB) is a contagious, debilitating disease caused by the bacterium *Mycobacterium bovis*. *M. bovis* is not the primary causative agent of human tuberculosis, which is actually due to *M. tuberculosis*, but humans are susceptible to bovine tuberculosis. Among domestic animals, cattle are the primary reservoir of *M. bovis* and although wildlife and domestic cattle commonly do not come in close physical contact with each other, transmission of the pathogen has occurred over the years (Palmer 2007). Eradication program of bTB exist and have been proved to be highly effective in controlling the disease in US since 1917. However, bTB infections began to reemerge since 1998 among cattle herds due to presence of the pathogen in the wildlife reservoir (Okafor et al. 2011). Cattle husbandry and farm management practices may contribute to increased risk of herd breakdown. More precisely, Reilly & Courtenay (2007) have shown an increase in bovine tuberculosis outbreaks on farms that feed maize silage, grass silage or molasses to cattle.

Grant et al. (1995) have monitored the presence of *Yersinia enterocolitica* in silage over a 20-month period. Out of 46 total silage samples, 6.5 % were positive and the presence of pathogens was associated with elevated pH in silage samples. *Yersinia enterocolitica* infection causes the yersiniosis, [zoonotic](#) disease occurring in humans as well as a wide array of animals such as cattle, deers, pigs, and birds (Centers for Disease Control and prevention 2005). Occasional presence in silage of *Campylobacter* sp., an important food borne pathogen, has also been reported (Nam et al. 2005). The Belgium federal agency for food chain security: (AFSCA 2009) has established a list of pathogenic microorganisms which should be monitored in animals before slaughtering. Among them, *Salmonella*, responsible

for severe diarrhea, is frequently found in cattle herd (Plym & Wierup 2006). However, no data is available for assessing their presence in silage.

Biogenic amines (BA) are produced by amino acids decarboxylation by enzymes of several LAB such as *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* or *Pediococcus* species (Křízek 1993), and species of many genera potentially present in silage such as *Clostridia*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Escherichia* and *Pseudomonas* (Silla Santos 1996). The main biogenic amines found in silage are putrescine, cadaverine and tyramine, derived from arginine, lysine and tyrosine respectively. Other BA could also be detected in silage at lower levels such as tryptamine, histamine, spermidine and spermine. They are produced by tryptophane, histidine and arginine decarboxylation. Negative effects of BA on animal health have been reported (Phuntsok et al. 1998). BA notably decrease silage palatability, reduce the Dry Matter Intake (DMI) and cattle performance (Lingaas & Tveit 1992; Krizek 1995). However, VanOs et al. (1997) have shown that sheep adapted to silage with high BA level are prevented from amines accumulation in rumen by an increase of the amine degrading capacity of rumen microbes. Formation of BA has been affected by several factors such as temperature, quickness of pH decrease during the initial stage of fermentation and oxygen access. Steidlová & Kalac (2002) have determined values of BA in 51 maize silages sample. BA composition was 145 mg/kg of tyramine, 136 mg/kg of putrescine, 96.2 mg/kg of cadaverine, 37.9 mg/kg of spermidine, 3 mg/kg of histamine, 2.8 mg/kg of spermine and 2.5 mg/kg of tryptamin. However, authors have observed that wide variations occurred depending on the year considered.

III. Strategies to limit silage degradation and economical and sanitary impact

Silage degradation leads to economical issues. Impaired feed intake, linked to silage inappetence or physiological disorders, decrease animal performance in terms of body weight gain and increase feeding cost for farmers who have to extend the daily intake or complete it with other feedstuff. Currently, no measure could be applied on spoiled silage and the feed has to be eliminated. Moreover, silage degradation leads to sanitary risks, as it could represents a vector transmitting pathogenic agents to animal and humans.

Major issues in silage processing are due to defaults in the quality and maturity of the plant material ensiled, in the rapid establishment of anaerobiosis necessary for a strong silage acidification, and in the control of contamination by pathogenic or spoilage microorganisms. Whereas silages characterized by a strong acidification with predominance of LAB in microbial populations, presents harmful conditions for the growth and survival of different pathogens and spoilage microorganisms. Most of them could not stand the acidic environment characteristic of good silage processing.

To meet the economic and health risks associated with silage degradation, innovative strategies in silage processing and respect of Good Manufacturing Practices are required.

Preventive interventions could be performed all along the ensiling process, from pre-ensiling to opening and aerobic steps. The following section discusses the different possibilities to prevent pathogenic contamination and silage spoilage.

III-1 Limitation of pathogen introduction

In order to avoid silage degradations, pathogen entry in this ecosystem should be limited as much as possible. Pre-ensiling GMP interventions are intuitive and preventive actions such as limiting crops degradation by fungi and molds at the field level or waiting some times between manure or slurry application and harvest. Indeed, a delay of at least four weeks should be respected between manure spreading and harvesting in order to limit presence of butyric bacteria in silage (Adler & Lew 1995; Johansson et al. 2005). This preventive measure could also be applied for limiting the presence of other pathogens such as *Listeria*, *Clostridium* or *E. coli* (Rammer et al. 1994; Rammer & Lingvall 1997; Girardin et al. 2005). To limit the risk of telluric microorganisms' incorporation in silage, mix of dirt and soil with the crop should be avoid by adjusting the harvester to the appropriate height. Growth conditions and choice of the harvesting period have also an important impact. It has been proved that high dry matter concentration (> 50 % DM) in the raw material due to late harvesting makes silage more susceptible to self-heating and infestations with toxin-producing fungi (Purwin et al. 2006). Moreover, in case of late harvesting, carbohydrate contents in raw plant material lower and the nutritive value of silage decrease (Ashbell & Weinberg 2006; AFSSA 2004).

Pathogens introduction in silage could also happen through silos and agricultural equipments. Cleaning before filling should clearly reduce contamination through soil or manure incorporation. Correct sealing of the silos is also essential to limit contact with small animals, potential vector of many pathogens, such as rodent or birds. Finally, elimination of feeding refusal before each ration avoids animal ingestion of spoiled silage and further health issues.

III-2 Promoting the anaerobiosis establishment

A quick anaerobiosis establishment limits effluent production and promotes LAB development leading to acidification. Filling should be as fast as possible in order to quickly exclude air from the crop. Effluents are the result of plant respiration and activity of aerobic microorganisms. The volume of effluent may vary considerably depending on DM content, silo type, degree of consolidation, chopping length, bruising of the plants and presence of acidic additives. Effluents induce losses in DM and carbohydrates and the dilution of silage additive.

Any product incorporated at ensiling and supposed to promote silage processing is considered as silage additive. According to the list of silages additives approved by the French Ministry of Agriculture in 2006 (Legarto 2006a; Legarto 2006c; Legarto 2006b), they are assigned to chemical, enzymatic or microbial categories. Moreover, effluent may cause environmental problems and pollution of water sources due to its very high Biochemical Oxygen Demand (BOD) value (up to 50,000 mgO₂.l⁻¹) (Weinberg & Ashbell 2003). To prevent effluent production, it is recommended to harvest the crops at an adequate DM content (30–40 % DM) and in cases of low DM crops (wet grasses and legumes primarily), to wilt them in the field.

Anaerobiosis could establish quickly when the silage particles are small, inducing an easiest compaction in the silo. However, a too short particles size is linked to excessive effluents (Demarquilly et al. 1998), and it has been proved that length chopping influences the

conservation and digestibility of the silage. Indeed, too short particles imply loss of silage fibrous roughage properties necessary for good rumen functions and could result in acidosis (Zebeli et al. 2009). Optimal chopping length for grasses ranges between 4 and 6 cm. Maize silage for dairy cows is recommended to contain less than 1 % of big particles (> 2 cm), 8 to 12 % of medium particles from 1 to 2 cm and less than 50 % of very short particles (< 6 mm) (LeGall & Chénais 2005).

III-3 Promoting the acidification

The main effect of silage preservation is acidification, which depends on anaerobiosis, promoting LAB fermentation, and also on the buffering capacity and DM of the crop. It has been proved that soil incorporation in silage increases its buffering capacity (AFSSA 2004). If the DM content is too low and the buffering capacity of the plants is high, aerobic microorganisms active at the beginning of ensiling may reduce the quantity of hexoses and pentoses available for LAB fermentation. Silage acidification is delayed and secondary fermentation by clostridia occurs during which lactic acid is converted to weaker butyric acid, followed by pH increase and further spoilage.

Mineral acids such as sulfuric and chlorhydric acids were first used to promote silage acidification and limit pathogenic microorganism growth. Due to the harmfulness for both farmers and the animals, organic acids were preferred. Lactic, acetic and formic acids have been proved to inhibit the growth of enterobacteria and *L. monocytogenes* (Ostling & Lindgren 1993). More precisely, formic acid increases the initial rate of decline of enterobacteria present in grass silage and is effective on the reduction of *E. coli* O157:H7 (O'Kiely et al. 2001). Besides, formic acid is considered as an efficient treatment for Biogenic Amines (BA) level decrease in grass and alfalfa silages (VanOs et al. 1997; Steidlová & Kalac 2004; Jambor 2000).

Rapid acidification could also be obtained by addition of carbohydrate or enzyme supplementation. Crops such as alfalfa contain few WSC (< 11-12 % DM). Lactic acid fermentation is thus threatened and addition of carbohydrates such as molasses or whey could be necessary to enhance LAB fermentation. Carbohydrate supplementation is often performed with LAB inoculation to ensure the fermentation process. Added molasses represents 0.5 kg and whey 0.75 kg of carbohydrates of DM in silage (AFSSA 2004). Cellulolytic and hemicellulolytic enzymes such as cellulase could convert cellulose and hemicelluloses of plant cells into fermentable sugars (Zhang et al. 2010). Different treatment approaches could also be used to hydrolyze cellulose (sulfuric acid, alkaline...) and $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ was proved to be an efficient catalyst for hemicellulose hydrolysis in corn stover silage (Sun et al. 2011).

In addition to chemical and enzymatic silage additives, bacterial inoculants are also commonly used for silage preservation. The addition of bacterial inoculants to silage is intended to ensure faster accumulation of organic acids during the ensiling period. The main organic acid produced by epiphytic LAB or silage additives is lactic acid, responsible of the rapid pH decrease. In most commercially available inoculants, homofermentative lactic acid bacteria have been used because they are fast and efficient producers of lactic acid. The most common homofermentative inoculant is *Lactobacillus plantarum*. Other *Lactobacillus* or

Pediococcus species may be employed and *Enterococcus faecium* is also frequently used (Li & Nishino 2011; Nkosi et al. 2010). Table 1 summarizes studies performed with different bacterial additives to improve silage preservation in terms of fermentation and DM losses, aerobic stability, and pathogens inhibition.

III-4 Limitation of air ingress

A healthy crop at ensiling should remain so from the silo filling and the storage period to the distribution. To reach this goal, contamination associated with the introduction of air into the silage should be avoided. Sealing of bunker and stack silos for extended periods of time is usually done with plastic sheeting, usually polyethylene (Weinberg et al. 2011). The film should resist to physical damages caused by birds or rodents and UV.

Ensiling is a competition between the anaerobic and aerobic processes, and at silo opening, air can enter the forage mass, triggering the silage degradation (McEniry et al. 2010). Silo capacity should be determined according to feeding needs (herd size and rations), and the dimensions should be calculated to remove an adequate depth of silage from the silo face daily to minimize silage exposure to air. A clean cut of silage front limits the temperature rise (AFSSA 2004).

III-5 Improving the aerobic stability

Aerobic stability could be reach by addition of several silage additives. Among chemical additives, formic acid have been proved to enhance the aerobic stability of the whole-crop wheat, sorghum and maize silages by causing more extensive heterolactic fermentation with high levels of acetic and propionic acids in silages (Kung & Ranjit 2001). Silage additives containing partially neutralized acids as salts (nitrites, sulfates) and associated with formol-based preservatives also exist. Rate of silage aerobic deterioration was proved to be slowest in crimped grains treated with an additive treatment containing a mixture of ammonium formate, propionate, ethyl benzoate, and benzoate (Adesogan et al. 2003).

Bacterial additives are extensively used to preserve aerobic stability of opened silos. Although homofermentative bacteria are considered as effective inoculants for silage storage, several authors have shown that lactic acid could be used as substrate by lactate-assimilating yeasts in case of insufficient anaerobiosis resulting in silage spoilage (Weinberg et al. 1993; Filya et al. 2004). Heterolactic fermentation is therefore preferred in order to improve aerobic stability of silage at unloading. The heterofermentative bacterial species *Lactobacillus buchneri* has been proved to increase aerobic stability and reduce fermentation losses in numerous studies (Adesogan et al. 2003; Filya et al. 2006; Kleinschmit & Kung Jr 2006a; Kleinschmit & Kung Jr 2006b; Nkosi et al. 2009). Preservative effect is due to the increase in acetic acid, propionic acid and free amino acids concentrations (Filya & Sucu 2007), production of antimicrobial substances such as 1-propanol (Driehuis et al. 1999), 1,2-propanediol (Hu et al. 2009; Schmidt & Kung Jr. 2010), propyl acetate, 2-butanol and propylene glycol (Holzer et al. 2003). The effect is a decrease in WSC (Keles & Demirci 2011) through the greater number of LAB observed in silage (Kung Jr. et al. 2007). Proportionally, lactic acid concentration is lowered. All these changes lead to a pH decrease (Arriola et al. 2011) and reduction of yeasts

and molds survival and growth inhibition (Filya et al. 2006). These studies have been made about several kinds of silage as maize, wheat, sorghum, grass and barley silages. Other species have been studied for their ability to improve aerobic stability of silages (Table 1).

III-6 Inhibition of undesirable microorganisms

To ensure silage quality, several additives inhibiting undesirable microorganisms are commonly added to the ensiled mass. Sodium nitrite in combination with hexamine effectively prevented clostridia growth as well as sodium benzoate restricted yeast growth (Knicky & Lingvall 2001). The use of calcium formiate, sodium benzoate and sodium nitrite have also resulted in high hygienic quality of corn silages and significantly reduced the concentration of zearalenone, deoxynivalenol and total ochratoxins and fumonisins (Biro et al. 2009).

Bacterial inoculants have also been studied to limit pathogens development as shown in Table 1. It is known that in addition to organic acids, silage inoculants also produce others substances which could have an antimicrobial potential: H₂O₂, ethanol, diacetyl, exopolysaccharides (Fuller & Gibson 1997; Keenan & Bills 1968; Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilán 2005) or antibacterial peptides such as bacteriocins (Klaenhammer 1988). However, most of current studies were not focusing on the exact antimicrobial mechanism of the bacterial additive tested.

The effects of bacterial inoculants have been studied on the formation of BA in silage. It has been proved that *Lactobacillus casei* significantly lower the BA concentration in wilted festulolium, maize silage and mixed rations whereas the protective effect of *Lactobacillus buchneri* may vary depending on the plant material used (Nishino et al. 2007).

Identification of LAB able to neutralize fusariotoxins thanks to the formation of stable complexes between toxins and LAB cells from acidified corn infusion have been realized by (Niderkorn et al. 2006). Jard et al. (2011), have updated the knowledge about mycotoxin removal, from prevention to detoxification by adsorption or biotransformation.

Contrary to yeasts and fungi, few studies were focusing on effect of bacterial inoculants on pathogens inhibition such as *Listeria*, (Gouet et al. 1977; Irvin 1969), *Clostridium* (Tabacco et al. 2009) or pathogenic *E. coli* (Bach et al. 2002; Espiè et al. 2005; Pedroso et al. 2010). According to these authors, treatment with *Pediococcus pentosaceus* and *Propionibacterium jensenii* hasten elimination of *E. coli* O157:H7 in barley silage whereas additions of *Lactobacillus buchneri* or *Enterococcus faecium* prevent *E. coli* O157:H7 or *E. coli* O26 growth in maize silage at opening respectively. However, GMP are still the primarily way to control presence and growth of any pathogens inside silage (AFSSA 2004).

Conclusion

Ensiling is a preservative method of moist crops conservation which guarantees animal feed availability all along the year. Silage processing is based on lactic acid fermentation under anaerobiosis and allows preservation of sanitary and nutritive qualities of the crops. However, spoilage microorganisms could be found in silage inducing degradation and losses of important economical impact. In addition of these microorganisms, silage could be a vector of

pathogenic microorganisms threatening both animal and human health. In feedstuff, and especially silage, safety control should be reached to limit animal diseases and subsequent human transmission, primarily through food chain contamination.

Methods aiming to guide microbial communities' evolution inside the silage exist but need to be developed further. Respect of GMP and use of different categories of additives result in optimal fermentation and preservation of the silage, with a good maintenance of high nutritional value of the forage.

References

- Abee, T. et al., 2011. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: Diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiology*, 28(2), p.199-208.
- Adesogan, A. et al., 2003. Effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* inoculants, or a chemical additive on the fermentation, aerobic stability, and nutritive value of crimped wheat grains. *Journal of Dairy Science*, 86(5), p.1789-1796.
- Adler, A. & Lew, H., 1995. Seasonal-changes of epiphytic microorganisms on manured, NPK-fertilized and not fertilized forage. *Bodenkultur*, 45(3), p.223-240.
- AFSCA, 2009. Règlement (CE) n°2074/2005 de la Commission du 5 décembre 2005. Available at: http://www.favv.be/productionanimale/animaux/ica/bovins/_documents/2009-12-21_OmzendbriefVKIherkauwers_tavdierenartsen_07.12.2009fr.pdf.
- AFSSA, 2009. Avis sur l'augmentation des cas de listériose et le lien éventuel avec l'évolution des modes de production, de préparation et de consommation des aliments, France: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments AFSSA. Available at: <http://www.anses.fr/Documents/MIC-Ra-ListerioseAliments.pdf>.
- AFSSA, 2004. Bonnes pratiques de fabrication de l'ensilage pour une meilleure maîtrise des risques sanitaires, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments AFSSA. Available at: <http://www.afssa.fr/Documents/ALAN-Ra-ensilage.pdf>
- Alexander, A.V. et al., 1992. Bovine abortions attributable to *Listeria ivanovii*: four cases (1988-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 200(5), p.711-714.
- Arriola, K.G., Kim, S.C. & Adesogan, A.T., 2011. Effect of applying inoculants with heterolactic or homolactic and heterolactic bacteria on the fermentation and quality of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 94(3), p.1511-1516.
- Ashbell, G. & Weinberg, Z., 2006. Silage production and utilization. *Food and Agriculture Organization*.
- Avery, S., Walters, L. & Hutchison, M., 2005. Fate of *Escherichia coli* O157 and detection of stx phage during fermentation of maize, an animal feedstuff. *Letters in Applied Microbiology*, 40(2), p.99-105.
- Bach, S.J. et al., 2002. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in barley silage: effect of a bacterial inoculant. *Journal of Applied Microbiology*, 93(2), p.288-294.
- Beck, T., 1972. The quantitative and qualitative composition of the lactic acid bacteria flora of silage. *Landwirtschaftliche Forschung*, 27, p.55-63.
- Biro, D. et al., 2009. Occurrence of microscopic fungi and mycotoxins in conserved high moisture corn from Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, 16(2), p.227-232.

- Brugère-Picoux, J., 2008. Ovine listeriosis. *Small Ruminant Research*, 76(1-2), p.12-20.
- Byrne, C.M. et al., 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during silage fermentation. *Journal of Food Protection*, 65(12), p.1854-1860.
- Centers for Disease Control and prevention, 2005. *Yersinia enterocolitica*. Available at: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/yersinia_g.htm.
- Chen, Y. et al., 2005. Fate of *Escherichia coli* during ensiling of wheat and corn. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), p.5163-5170.
- Courtin, M.G. & Spoelstra, S.F., 1990. A simulation model of the microbiological and chemical changes accompanying the initial stage of aerobic deterioration of silage. *Grass and Forage Science*, 45(2), p.153-165.
- Davis, M.A. et al., 2003. Feedstuffs as a vehicle of cattle exposure to *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Veterinary Microbiology*, 95(3), p.199-210.
- Demarquilly, C., Dulphy, J.-P. & Andrieu, J.-P., 1998. Valeurs nutritive et alimentaire des fourrages selon les techniques de conservation: foin, ensilage, enrubannage. *Fourrages*, 155, p.349-369.
- Drackley, J.K., Donkin, S.S. & Reynolds, C.K., 2006. Major advances in fundamental dairy cattle nutrition. *Journal of Dairy Science*, 89(4), p.1324-1336.
- Driehuis, Elferink & Spoelstra, 1999. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *Journal of Applied Microbiology*, 87(4), p.583-594.
- Driehuis, F. & Oude Elferink, S.J., 2000. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *The Veterinary Quarterly*, 22(4), p.212-216.
- Driehuis, F. et al., 2008. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in The Netherlands. *Food Additives and Contaminants*, 1(1), p.41-50.
- EFSA, 2006. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food, adopted on 4 April 2006. *The EFSA Journal*, 365, p.1-56.
- Espiè, E. et al., 2005. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2005. *Institut de Veille Sanitaire, Institut Pasteur*. Available at: http://www.invs.sante.fr/surveillance/shu/shu_2005.pdf [Consulté avril 4, 2011].
- Fenlon, D. & Wilson, J., 2000. Growth of *Escherichia coli* O157 in poorly fermented laboratory silage: a possible environmental dimension in the epidemiology of *E. coli* O157. *Letters in Applied Microbiology*, 30(2), p.118-121.
- Fenlon, D.R. et al., 2000. The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Symposium Series (Society for Applied Microbiology)*, (29), p.149S-156S.

- Filya, I., 2003. The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), p.1080-1086.
- Filya, I. & Sucu, E., 2007. The effect of bacterial inoculants and a chemical preservatives on the fermentation and aerobic stability of whole crop cereal silages. *Asian australian journal of animal sciences*, 20(3), p.378-384.
- Filya, I., Sucu, E. & Karabulut, A., 2006. The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of maize silage. *Journal of Applied Microbiology*, 101(6), p.1216-1223.
- Filya, I., Sucu, E. & Karabulut, A., 2004. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. *Journal of Applied Microbiology*, 97(4), p.818-826.
- Fink-Gremmels, J., 2008. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 25(2), p.172-180.
- Fox, E. et al., 2009. *Listeria monocytogenes* in the Irish Dairy Farm Environment. *Journal of Food Protection*, 72(7), p.1450-1456.
- Fuller, R. & Gibson, G.R., 1997. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement*, 222, p.28-31.
- Girardin, H. et al., 2005. Behaviour of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(2), p.287-295.
- Gollop, N., Zakin, V. & Weinberg, Z.G., 2005. Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *Journal of Applied Microbiology*, 98(3), p.662-666.
- Gouet, P., Girardeau, J.P. & Riou, Y., 1977. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by defined lactic microflora in gnotobiotic silages of lucerne, fescue, ryegrass and maize-influence of dry-matter and temperature. *Animal Feed Science and Technology*, 2(4), p.297-305.
- Grant, M., Eklund, C. & Shields, S., 1995. Monitoring dairy silage for 5 bacterial groups with potential for human pathogenesis. *Journal of Food Protection*, 58(8), p.879-883.
- Hassan, L., Mohammed, H.O. & McDonough, P.L., 2001. Farm-management and milking practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in New York state dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 51(1-2), p.63-73.
- Heron, S., J.E, Wilkinson, J., F & Duffus, C., M, 1993. Enterobacteria associated with grass and silages. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(1), p.13-17.

- Higginbotham, G. et al., 1998. Effects of inoculants containing propionic acid bacteria on fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 81(8), p.2185-2192.
- Holzer, M. et al., 2003. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends in Biotechnology*, 21(6), p.282-287.
- Hu, W. et al., 2009. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. *Journal of Dairy Science*, 92(8), p.3907-3914.
- Hussein, H.S., 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *Journal of Animal Science*, 85(13 Suppl), p.E63-72.
- INVS, 2007. Epidémie d'infections à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines non O157 liée à la consommation de camembert au lait cru, Nord-Ouest de la France, Octobre-Décembre 2005. *Rapport d'investigation rédigé par L'Institut de veille sanitaire, 2007*, p.13.
- Irvin, A.D., 1969. The inhibition of *Listeria monocytogenes* by an organism, resembling *Bacillus mycoides*, present in normal silage. *Research in Veterinary Science*, 10(1), p.106-108.
- Jambor, V., 2000. The effect of biological preservatives, treatment and different levels of dry biomass on proteolysis and content of biogenic amines in alfalfa silage. *Czech Journal of Animal Science*, 45, p.185-188.
- Jard, G. et al., 2011. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21770849> [Consulté août 25, 2011].
- Jatkauskas, J. & Vrotniakiene, V., 2009. The influence of application of a biological additive on the fermentation and nutritive value of lucerne silage. *Zemdirbyste Agriculture*, 96(4), p.197-208.
- Johansson, M. et al., 2005. Potential risks when spreading anaerobic digestion residues on grass silage crops - survival of bacteria, moulds and viruses. *Grass and forage science*, 60(2), p.175-185.
- Johnson, A.L., McAdams, S.C. & Whitlock, R.H., 2010. Type A botulism in horses in the United States: a review of the past ten years (1998-2008). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 22(2), p.165-173.
- Jokela, B. & Russelle, M., 2003. Perennial forages benefit soils, other crops, and water quality in important ways. Available at: www.ars.usda.gov/sp2UserFiles/Place/36553000/pdf/s/19%20perennial%20forage%20importance_for%20print.pdf.
- Kadivar, H. & Stapleton, A.E., 2003. Ultraviolet radiation alters maize phyllosphere bacterial diversity. *Microbial Ecology*, 45(4), p.353-361.

- Karmali, M.A., Gannon, V. & Sargeant, J.M., 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), p.360-370.
- Keenan, T.W. & Bills, D.D., 1968. Metabolism of volatile compounds by lactic starter culture microorganisms. A Review1. *Journal of Dairy Science*, 51(10), p.1561-1567.
- Keles, G. & Demirci, U., 2011. The effect of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria on conservation characteristics of baled triticale-Hungarian vetch silage and lamb performance. *Animal Feed Science and Technology*, 164(1-2), p.21-28.
- Klaenhammer, T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3), p.337-349.
- Kleinschmit, D.H. & Kung Jr, L., 2006a. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. *Journal of Dairy Science*, 89(10), p.4005-4013.
- Kleinschmit, D.H. & Kung Jr, L., 2006b. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 89(10), p.3999-4004.
- Knicky, A. & Lingvall, R., 2001. Possibilities to avoid growth of clostridia and/or fungi in wilted silage by use of organic and inorganic salts. Dans *19th International Grassland Congress*. Proceedings of the XIX international grassland congress: grassland ecosystems: an outlook into the 21st century. Sao Pedro, Brazil: Gomide, JA; Mattos, WRS; DaSilva, SC, p. 788-789. Available at: http://apps.webofknowledge.com.gate1.inist.fr/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=5&SID=1Co5NGedN3cbe4JL8Gc&page=1&doc=5.
- Krizek, M., 1995. Possible ways of affecting biogenic-amine content in silages. *Veterinarni Medicina*, 40(4), p.111-115.
- Krizek, M., 1993. Biogenic amines in silage. 2. The dynamics of the formation of biogenic amines in silage. *Archiv Für Tierernährung*, 43(2), p.179-187.
- Kung Jr., L. et al., 2007. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of ground and whole high-moisture corn 1. *Journal of Dairy Science*, 90(5), p.2309-2314.
- Kung, L. & Ranjit, N., 2001. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*, 84(5), p.1149-1155.
- LeGall, A. & Chénais, F., 2005. Le point sur l'ensilage de maïs pour les vaches laitières. Available at: http://www.inst-elevage.asso.fr/spip.php?page=article_espace&id_espace=931&id_article=7954.
- Legarto, J., 2006a. Liste des conservateurs d'ensilage acides homologués au 26/3/2006. Available at: http://www.inst-elevage.asso.fr/spip.php?page=article_espace&id_espace=931&id_article=10123

- Legarto, J., 2006b. Liste des conservateurs d'ensilage biologiques homologués au 26/3/2006. Available at: http://www.inst-elevage.asso.fr/spip.php?page=article_espace&id_espace=931&id_article=10123.
- Legarto, J., 2006c. Liste des conservateurs d'ensilage homologués au 26/3/2006. Available at: http://www.inst-elevage.asso.fr/spip.php?page=article_espace&id_espace=931&id_article=10123.
- Li, Y. & Nishino, N., 2011. Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Applied Microbiology*, 110(6), p.1561-1570.
- Li, Y.B. & Nishino, N., 2011. Effects of inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability and microbial communities in whole crop corn silage. *Grassland Science*, 57(4), p.184-191.
- Lin, J. et al., 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), p.3094-3100.
- Lindström, Miia et al., 2010. *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(4), p.281-304.
- Lingaas, F. & Tveit, B., 1992. Etiology of acetonemia in Norwegian cattle. 2. Effect of butyric acid, valeric acid, and putrescine. *Journal of Dairy Science*, 75(9), p.2433-2439.
- Low, J.C. & Donachie, W., 1997. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Veterinary Journal*, 153(1), p.9-29.
- Marcinakova, M. et al., 2008. A new probiotic and bacteriocin-producing strain of *Enterococcus faecium* EF9296 and its use in grass ensiling. *Czech Journal of Animal Science*, 53(8), p.336-345.
- McDonald, P., Henderson, A., R & Heron, S., J,E, 1991. The biochemistry of silage. Dans *The biochemistry of silage*. Marlow. Marlow: Chalcombe Publications.
- McEniry, J. et al., 2010. Assessing the impact of various ensilage factors on the fermentation of grass silage using conventional culture and bacterial community analysis techniques. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), p.1584-1593.
- Morgavi, D.P. & Riley, R., T, 2007. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3-4), p.201-212.
- Myllykoski, J et al., 2009. Type C bovine botulism outbreak due to carcass contaminated non-acidified silage. *Epidemiology and Infection*, 137(2), p.284-293.
- Nam, H.M. et al., 2005. Detection of *Campylobacter jejuni* in dairy farm environmental samples using SYBR Green real-time polymerase chain reaction. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2(2), p.160-168.
- Niderkorn, V., Boudra, H. & Morgavi, D.P., 2006. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), p.849-856.

- Niderkorn, V. et al., 2007. Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an *in vitro* simulated corn silage model. *Food Additives and Contaminants*, 24(4), p.406-415.
- Nishino, N. et al., 2007. Biogenic amine production in grass, maize and total mixed ration silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Applied Microbiology*, 103(2), p.325-332.
- Nkosi, B.D. et al., 2010. Effects of homofermentative and heterofermentative bacterial silage inoculants on potato hash silage fermentation and digestibility in rams. *Animal Feed Science and Technology*, 157(3-4), p.195-200.
- Nkosi, B.D. et al., 2009. Effects of ensiling whole crop maize with bacterial inoculants on the fermentation, aerobic stability, and growth performance of lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 154(3-4), p.193-203.
- O'Kiely, P., Byrne, C. & Bolton, D., 2001. Survival of *E. coli* O157 H7 added to grass at ensiling and its influence on silage fermentation. Dans *19th International Grassland Congress*. proceedings of the XIX international grassland congress- Grassland ecosystems: an outlook into the 21st century. Sao Pedro, Brazil: Gomide, JA; Mattos, WRS; DaSilva, SC, p. 792-793.
- Okafor, C.C. et al., 2011. Descriptive epidemiology of bovine tuberculosis in Michigan (1975-2010): lessons learned. *Veterinary Medicine International*, 2011, p.874924.
- Orsi, R. et al., 2000. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *Journal of Stored Products Research*, 36(1), p.75-87.
- Ostling, C.E. & Lindgren, S.E., 1993. Inhibition of enterobacteria and *Listeria* growth by lactic, acetic and formic acids. *The Journal of Applied Bacteriology*, 75(1), p.18-24.
- Palmer, M.V., 2007. Tuberculosis: a reemerging disease at the interface of domestic animals and wildlife. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 315, p.195-215.
- Parvin, S. et al., 2010. Effects of inoculation with lactic acid bacteria on the bacterial communities of Italian ryegrass, whole crop maize, guinea grass and rhodes grass silages. *Animal Feed Science and Technology*, 160(3-4), p.160-166.
- Pedroso, A. et al., 2010. Control of *Escherichia coli* O157:H7 in corn silage with or without various inoculants: Efficacy and mode of action. *Journal of Dairy Science*, 93(3), p.1098-1104.
- Phuntsok, T. et al., 1998. Biogenic amines in silage, apparent postruminal passage, and the relationship between biogenic amines and digestive function and intake by steers. *Journal of Dairy Science*, 81, p.2193-2203.
- Pitt, R. & Sniffen, C., 1985. Agriculture Engineering. *Ext. Bulletin*, 452.
- Plym, F. & Wierup, M., 2006. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, 25(2), p.541-554.

- Purwin, C. et al., 2006. Silage quality: microbial health promoting and production aspects. *Medycyna Weterynaryjna*, 62(8), p.865-869.
- Rammer, C. & Lingvall, P., 1997. Influence of farmyard manure on the quality of grass silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(1), p.133-140.
- Rammer, C. et al., 1994. Ensiling of manured crops - effects on fermentation. *Grass and forage science*, 49(3), p.343-351.
- Reich, L. & Kung, M., 2010. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Animal Feed Science and Technology*, 159(3-4), p.105-109.
- Reilly, L. & Courtenay, O., 2007. Husbandry practices, badger sett density and habitat composition as risk factors for transient and persistent bovine tuberculosis on UK cattle farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 80(2-3), p.129-142.
- Roigé, M.B. et al., 2009. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Revista Iberoamericana De Micología: Órgano De La Asociación Española De Especialistas En Micología*, 26(4), p.233-237.
- Ruas-Madiedo, P. & de los Reyes-Gavilán, C.G., 2005. Invited Review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 88(3), p.843-856.
- Schmidt, R.J. & Kung Jr., L., 2010. The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silages made at different locations. *Journal of Dairy Science*, 93(4), p.1616-1624.
- Schocken-Iturrino, R. et al., 2005. Chemical and microbiological changes of Tifton 85 grass silage after opening of the silos. *Revista Brasileira de Zootecnia. Brazilian Journal of Animal Science*, 34(2), p.464-471.
- Schoder, D. et al., 2011. Important vectors for *Listeria monocytogenes* transmission at farm dairies manufacturing fresh sheep and goat cheese from raw milk. *Journal of Food Protection*, 74(6), p.919-924.
- Shao, T. et al., 2005. Comparison of fermentation characteristics of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) and guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) during the early stage of ensiling. *Asian australian journal of animal sciences*, 18(12), p.1727-1734.
- Silla Santos, M.H., 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2-3), p.213-231.
- Steidlová, S. & Kalac, P., 2002. Levels of biogenic amines in maize silages. *Animal Feed Science and Technology*, 102(1-4), p.197-205.
- Steidlová, S. & Kalac, P., 2004. The effects of lactic acid bacteria inoculants and formic acid on the formation of biogenic amines in grass silages. *Archives of Animal Nutrition*, 58(3), p.245-254.

- Steidlová, S. & Kalac, P., 2003. The effects of using lactic acid bacteria inoculants in maize silage on the formation of biogenic amines. *Archiv Für Tierernährung*, 57(5), p.359-368.
- Storm, I.M.L.D. et al., 2010. Dynamics in the microbiology of maize silage during whole-season storage. *Journal of Applied Microbiology*, 109(3), p.1017-1026.
- Sun, Y. et al., 2011. Kinetic study for Fe(NO₃)₃ catalyzed hemicellulose hydrolysis of different corn stover silages. *Bioresource Technology*, 102(3), p.2936-2942.
- Tabacco, E. et al., 2009. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. *Journal of Applied Microbiology*, 107(5), p.1632-1641.
- Te Giffel, M.C. et al., 2002. Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), p.625-630.
- VanOs, M., VanVuuren, A. & Spoelstra, S., 1997. Mechanisms of adaptation in sheep to overcome silage intake depression induced by biogenic amines. *British Journal of Nutrition*, 77(3), p.399-415.
- Vilar, M. et al., 2007. Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 90(11), p.5083-5088.
- Vissers, M. et al., 2006. Improving farm management by modeling the contamination of farm tank milk with butyric acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 89(3), p.850-858.
- Vissers, M.M.M., Driehuis, F., et al., 2007. Minimizing the level of butyric acid bacteria spores in farm tank milk. *Journal of Dairy Science*, 90(7), p.3278-3285.
- Vissers, M.M.M., Te Giffel, M.C., et al., 2007. Minimizing the level of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk. *Journal of Dairy Science*, 90(7), p.3286-3293.
- Walker, J.K. et al., 1994. *Listeria innocua* isolated from a case of ovine meningoencephalitis. *Veterinary Microbiology*, 42(2-3), p.245-253.
- Weinberg, Z. et al., 1993. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6), p.512-518.
- Weinberg, Z. et al., 2011. Preservation of total mixed rations for dairy cows in bales wrapped with polyethylene stretch film – A commercial scale experiment. *Animal Feed Science and Technology*, 164(1-2), p.125-129.
- Weinberg, Z.G. & Ashbell, G., 2003. Engineering aspects of ensiling. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), p.181-188.
- Wiedmann, M., 2003. ADSA Foundation Scholar Award--An integrated science-based approach to dairy food safety: *Listeria monocytogenes* as a model system. *Journal of Dairy Science*, 86(6), p.1865-1875.
- Yimin Cai, 1999. Identification and characterization of *Enterococcus* species isolated from forage crops and their influence on silage fermentation. *Journal of Dairy Science*, 82(11), p.2466-2471.

- Zebeli, Q. et al., 2009. Maize silage particle length modulates feeding patterns and milk composition in loose-housed lactating Holstein cows. *Livestock Science*, 124(1-3), p.33-40.
- Zhang, J., Kawamoto, H. & Cai, Y., 2010. Relationships between the addition rates of cellulase or glucose and silage fermentation at different temperatures. *Animal Science Journal*, 81(3), p.325-330.

Table 1: Effect of different bacterial inoculants studied for silage preservation, except *Lactobacillus buchneri* alone*.

Bacterial additive	Effect on silage preservation	Physico-chemical and microbial effect	Reference
Mix of <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> and <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Reduce fermentation losses	Strong pH decrease Lactic acid concentration increase Butyric acid concentration decrease Proteolysis of plant proteins reduction	Jatkauskas & Vrotniakiene (2009)
Mix of <i>Enterococcus hirae</i> and <i>Lactobacillus casei</i> or <i>Lactobacillus plantarum</i>		Strong pH decrease, Butyric acid decrease	Yimin Cai (1999)
Mix of <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , and enzymes	Lower dry matter losses	Strong pH decrease, Lactic acid concentration increase	Kung & Ranjit (2001)
Mix of <i>Lactobacillus buchneri</i> and <i>Lactobacillus plantarum</i>		Acetic acid concentration increase Yeast activity inhibition Strong pH decrease	Filya 2003; Reich & Kung (2010) Filya (2003)
Mix of <i>Pediococcus cerevisiae</i> and <i>Propionibacterium acidipropionici</i>		Temperature raise at opening deceleration	Higginbotham, Mueller, et al. (1998)
Mix of <i>Pediococcus pentosaceus</i> and <i>Lactobacillus buchneri</i>	Improve aerobic stability	Acetic acid concentration increase	Kleinschmit & Kung Jr (2006a); Schmidt & Kung Jr. (2010); Reich & Kung (2010)
Mix of <i>Lactobacillus buchneri</i> and <i>Pediococcus acidilactici</i>		Acetic acid and 1-2,propanediol concentrations increase	Reich & Kung (2010)
<i>Propionibacterium Acidipropionici</i>		Yeast development inhibition Temperature raise at opening deceleration Acetic and propionic acid	Higginbotham, Mueller, et al. (1998); Filya et al. (2004);

		concentration increase CO ₂ production decrease	Filya & Sucu (2007)
<i>Enterococcus faecium</i>	Limit pathogenic microorganisms establishment	Lactic acid bacteria number increase <i>E. coli</i> , <i>Enterobacteriae</i> , staphylococci and <i>Bacillus</i> -like bacteria reduction <i>Listeria</i> and moulds number reduction pH decrease Lactic acid concentration increase Acetic acid concentration decrease	Marcinakova et al. (2008)
<i>Lactobacillus</i> sp, <i>Enterococcus</i> sp. and <i>Streptococcus</i> sp.	Limit mycotoxin concentration	Zearalenone into α -zearalenol biotransformation Deoxynivalenol, zearalenone and fumonisin binding up	Niderkorn et al. (2007)
<i>Lactobacillus plantarum</i> alone or in combination with <i>Lactobacillus</i> <i>casei</i> , <i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> and <i>Pediococcus</i> <i>pentosaceus</i>	Decrease biogenic amines contents	Tyramine, cadaverine, putrescine concentrations decrease	Steidlová & Kalac (2004); Steidlová & Kalac (2003)

*Studies about the effects of *Lactobacillus buchneri* inoculant alone were previously discussed in the text.

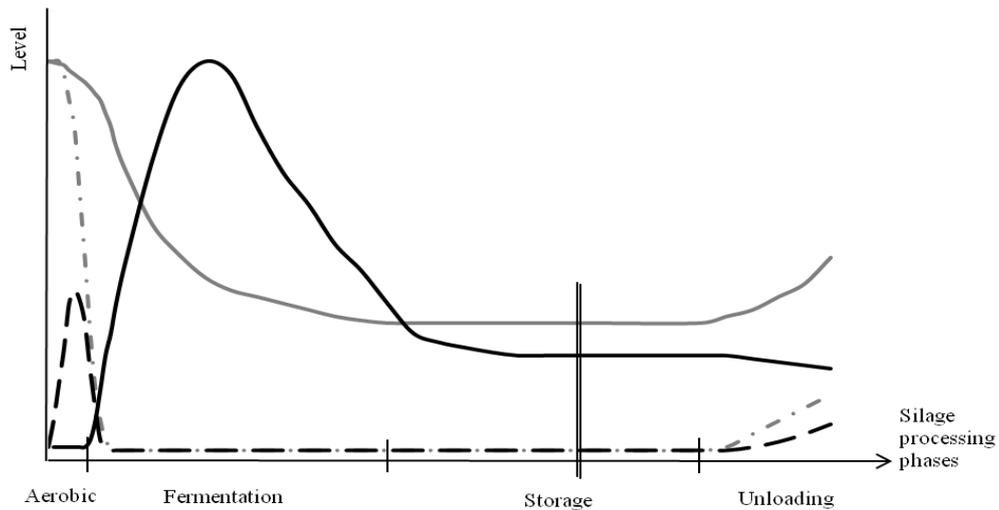


Figure 1: Theoretical changes in oxygen contents, pH values and different microbial populations at different steps of silage processing, from (Pitt & Sniffen 1985). Black lines represent microbial changes with complete line for LAB and dotted line for Enterobacteria and yeasts. Grey lines represent physico-chemical parameters changes with complete line for pH and dotted line for oxygen content.

**ANNEXE 2 : Publication prochainement soumise à “Applied and Environmental
Microbiology”**

« Study of Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) growth inhibition *in vitro* by Lactic Acid Bacteria
and characterization of the inhibition mechanism. »

Lysiane Dunière, Marie-Laure Delignette-Muller, Frédérique Chaucheyras-Durand, Isabelle
Chevallier et Delphine Thévenot.

**STUDY OF SHIGA TOXIN-PRODUCING *E. COLI* (STEC) GROWTH INHIBITION
IN VITRO BY LACTIC ACID BACTERIA AND CHARACTERIZATION OF THE
INHIBITION MECHANISM.**

LYSIANE DUNIERE¹, MARIE-LAURE DELIGNETTE-MULLER², FREDERIQUE CHAUCHEYRAS-DURAND^{3,4}, ISABELLE CHEVALLIER⁵ AND DELPHINE THEVENOT-SERGENTET^{1,6}.

Université de Lyon, VetAgro Sup, Unité de Recherche CALITYSS, 69280 Marcy l'étoile, France¹, and Université Lyon 1, CNRS, UMR5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622, Villeurbanne, France² and Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité de Microbiologie UR 454, Centre de Recherche de Clermont-Ferrand/Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France³, and Lallemand Animal Nutrition, 19 rue des Briquetiers, 31702 Blagnac, France⁴ and Clermont Université VetAgro Sup, Unité de Recherche CALITYSS, 89 avenue de l'Europe, 63370 Lempdes, France⁵ and Université de Lyon, VetAgro Sup, Laboratoire LMAP/LNR STEC, Université Lyon 1, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France⁶,

Running title: STEC growth inhibition *in vitro*

Corresponding author: Lysiane Dunière. Tel: +33 4 78 87 26 85 ; Fax : +33 4 78 87 26 69 ;

Email: l.dunier@vetagro-sup.fr ; Mailing address: Lysiane Dunière, VetAgro Sup, Unité CALITYSS/Equipe EMSA, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile FRANCE.

Abstract

Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) have been recognized as food borne pathogens and several serotypes have been responsible for human diseases. Lactic Acid Bacteria (LAB) are commonly used as natural preservative through the production of antimicrobial substances. The aim of this work was to study STEC growth inhibition by LAB *in vitro* in order to develop possible applications to control the risk of STEC transmission to human at different points of the epidemiological cycle.

A screening for antagonistic activity of 268 LAB strains was performed against 36 STEC strains from different origins and serogroups. Statistical analysis has shown the inhibition variations were mostly LAB and STEC strains dependent. Although sensitivity groups of inhibition could be determined for STEC strains, variations were not significantly depending of their origins or serogroups. The only mechanism of STEC growth inhibition identified was LAB organic acids production. Some co-inoculations of STEC strains and an inhibiting LAB strain reflected the presence of a bactericidal compound produced by LAB during the stationary phase. These observations could be partially linked to the STEC strains sensitivity group previously defined.

Introduction

Escherichia coli are ubiquitous members of the gastrointestinal microflora of many animals, including humans (25). However, some *E. coli* strains such as Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) have been recognized as food borne pathogens (56). Cattle are considered as the main STEC reservoir (17). STEC infections in humans are frequently acquired through the ingestion of contaminated food or water or through direct contact with contaminated animals (40). STEC infections in humans represent a major health concern due to the risks of developing serious complications (32, 64) such as hemolytic and uremic syndrome (HUS), leading cause of acute renal failure in children (63). More than 100 serotypes of STEC have been associated with human diseases (39). According to the French Agency of Food Safety (ANSES), STEC strains belonging to one of the 5 following serotypes: O157:H7, O26:H11, O145:H28, O103:H2 and O111:H8 are considered as major pathogenic *E. coli* (2). STEC strains are characterized by production of one or more types of cytotoxins causing tissue damage in humans and animals and encoded by *stx* genes (53). Studies have shown that *E. coli* O26 could easily arise from *stx*-negative to *stx*-positive strains and vice-versa (9, 37). Strains lacking *stx* genes could still be considered as pathogenic (35, 50). Otherwise, pathogenic *Escherichia coli* strains have shown the ability to resist low pH and survive in fermented environment or in human gastrointestinal tract (45). The low infectious dose associated with human STEC infection is attributed to this acid-resistant characteristic (30). Three mechanisms could protect *E. coli* cells against pH 2 to 2.5. These acid resistant systems could be oxidative, glutamate-dependent or arginine-dependent (44). Acid resistance allow STEC strains to survive in a variety of environments such as ruminal contents (8), farm environment (31, 47), or fermented food (35, 64).

To limit the risk of STEC transmission to human, several strategies have been developed from farm to fork in addition to Good Farming Practices. For example, modification of the animal diet before slaughtering (12), feed complementation (67) or vaccines have been tested to limit asymptomatic carriage in cattle (60). Physical treatments such as pasteurization, pulsed electric fields or high pressure have also been employed to guaranty the food safety (23, 71). One possible way to control the pathogen at different points of the epidemiological cycle is the utilization of other bacteria able to inhibit STEC growth and survival or the expression of their virulence. Lactic Acid Bacteria (LAB) are ubiquitous bacteria found in various environments, especially fermented food or vegetables (3, 58), and in the gut of many animals, including human intestinal tract (28, 49, 72). Most of LAB strains have the GRAS status (Generally recognized as safe) and are traditionally used as natural biopreservatives or probiotics: “live microorganisms which when administrated in adequate amounts confer a health benefit on the host” (73). The term “LAB” encompasses a large amount of heterogeneous bacteria (68). They are especially characterized by their fermentative metabolism: homo-fermentative bacteria are known to produce essentially lactic acid whereas heterofermentative bacteria produce other organic acids such as acetic acid and propionic acid. Non dissociated organic acids are able to pass through the bacterial membrane and could lead to cellular death of other microorganisms (34, 57). Lactic acid and short-chain aliphatic acids are proved to inhibit the growth of pathogenic or spoilage microorganisms (10, 33).

LAB fermentations also result in others substances which could have an antimicrobial potential: H₂O₂, ethanol, diacetyl, exopolysaccharides (28, 42, 59) or antibacterial peptides such as bacteriocins (43). LAB could therefore inhibit growth of a lot of other bacteria generally closely related but not only. Studies have been made on potential of LAB strains to inhibit pathogenic *E. coli* growth or survival either *in vitro* (29) or in experimental matrices: in rumen model (18), in dairy products (46, 55) , in silage (54), in meat (3)...

However, these studies have been often interested in O157:H7 serotype and little is known about LAB inhibition against other STEC serotype potentially responsible of human diseases. Our objective was to select LAB strains able to inhibit *in vitro* the growth of a wide range of STEC strains. To reach this aim, a screening of inhibiting LAB strains was performed with an agar spot test and the study of the inhibition mechanism was realized through the identification of the inhibiting products with a multiwell antagonistic assay and through competitions between an inhibiting LAB strain and several STEC strains.

Material and method

LAB strains:

A total of 268 strains of Lactic Acid Bacteria belonging to several taxons were tested: *Enterococcus* (81), *Lactobacillus* (85), *Lactococcus* (3), *Leuconostoc* (3), *Pediococcus* (3), *Propionibacterium* (1), *Vagococcus* (8) and 84 non-determined strains. Twenty-five bacterial strains were obtained from Lallemand collection (Lallemand SAS, Blagnac, France). The 243 other strains were obtained from Research Unit CALITYSS collection (VetAgro Sup, Lempdes, France). For long term conservation the isolates were stored at -80 °C in 30 % glycerol.

STEC strains:

The 36 strains used belong to LMAP VetAgro Sup, French National Reference Laboratory of *E. coli* collection (Table 1). Virulence profiles of these strains were characterized by PCR (Table 2) and the strains were tested for their ability to survive an acid stress using the glutamate-dependent system according to Takada *et al.*, protocol (62). All strains were kept in cryo beads (Technical services, CL, Heywood, Lancashire, UK) and maintained at -80 °C.

Screening of antagonistic activity:

Data

To limit the number of experiments, screening was realized in two steps. A first selection was performed with 268 LAB strains tested against 7 STEC strains. These STEC strains were chosen randomly in the 5 serogroups, corresponding to screening step number 1 in the Table 1. Then, the selected LAB strains were tested against the 29 other STEC strains, corresponding to screening step number 2 in Table 1, to confirm the inhibition against a larger number of STEC strains. For detection of antagonistic activity, an agar spot test adapted from Tagg and McGiven protocol was performed (61). To allow simultaneous growth of STEC and

LAB strains a mixed medium composed of 50% (v/v) of de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (20) and BHI was used. Additional Vitro agar (Kalys, Saint Ismier, France) was added to reach final concentration of 7.5 g/l. The final MRS/BHI medium composition was 35.5 g/l of MRS agar (BD Difco, Sparks, USA), 18.5 g/l of BHI broth and 3.5 g/l of Vitro agar qsp 1 l of deionized water. STEC strains were grown into 10 ml Brain Heart Infusion broth (BHI) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) by incubation at 37 °C for 24 h and LAB strains were grown in MRS broth (Biokar diagnostic, Beauvais, France) for 24 h at 30 °C. One thousand colonies forming units of STEC strain per milliliter were mixed with 20 ml of molten MRS/BHI agar and plated onto Petri dish. Once the agar layer has hardened, 10 µl of LAB strains tested for production of inhibitor activity were spotted onto the surface of the agar plates, allowed to dry and incubated for 48 h at 30 °C. This allowed STEC and LAB colonies to develop. The plates were then checked for inhibition zone and the width of the clear zone around the colonies of the producer strain was recorded. Agar spot tests were performed in triplicate and a LAB strain was considered as effective inhibitor in a screening part when the inhibition zone was superior or equal to 2 mm for the 3 repeats of each STEC strain tested. This selection criterion was chosen according to the observed data in order to select around 20 LAB strains.

Statistical analysis

Screening data consist in the recorded inhibition zone (mm) around the 36 STEC strain co-inoculated with each selected LAB strain, with 3 replications. STEC strains were characterized by two fixed factors, the serogroup (O157, O26, O103, O111 or O145) and the origin (environment, feces, meat, cheese, milk or unknown). In order to test the impact of these two factors on the mean inhibition zone, a linear mixed-effects model was fitted to data, taking into account these two fixed factors and the two crossed random factors, STEC strain (36 modalities) (Table 1) and LAB strain (23 modalities). The fitting of the model and the F-tests used to test the significance of each fixed-effect term were performed using the lme4 R package (5).

Identification of the inhibiting products:

The final effective 6 LAB strains were further investigated for their antimicrobial compounds production against STEC strains, as described by Yaacoubi *et al.*, (74). Three STEC strains were randomly chosen for each sensitivity group defined as a result of the statistical study on screening data. STEC strains chosen were A08, C08 and E08 for group A; 76.6, 6352 and 10d for group B and 116.1, 60.1 and 435 for group C. This multiwell antagonistic assay protocol allows the identification of inhibition mechanisms linked to organic acids, hydrogen peroxide or some antimicrobial peptide production. Acetic acid and D and L-lactic acid were determined using enzymatic kit (R-Biopharm®). Briefly, LAB were grown in 10 ml of MSR broth for 24 h at 30 °C. Cultures were placed in a water bath at 80 °C for 15 minutes to stop enzymatic reactions. Supernatants were then diluted in TS broth and assays were performed according to manufacturer recommendations. Concentrations were measured in total lactic acid (g/l) and acetic acid (g/l).

Identification of the type of interaction through co-inoculations

Data

The same 9 STEC strains than those used for the previous identification of inhibition mechanisms were grown in 10 ml of BHI by incubation at 37 °C for 24 h. Cells were adjusted to an optical density of 0.8 at 600 nm with Densimat® (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) to achieve 1×10^8 CFU/ml in the suspension and were then diluted in TS broth. The LAB strain (6A1MLb4) showing the widest mean inhibition zone against all STEC tested was used for co-inoculations. This LAB strain was grown in MRS broth by incubation at 30 °C during 24 h and the same dilution protocol was applied. STEC and LAB strains were co-inoculated at final inocula around 2×10^1 CFU/ml and 1×10^4 CFU/ml respectively in 50 ml of MRS/BHI broth prepared in the same way than MRS/BHI agar, using 50 % (v/v) MRS broth and BHI broth. Pure culture of LAB and STEC strains were carried out during the same time. Numeration of STEC and LAB strains co-inoculated or alone were performed at 0, 4, 6, 8, 10, 24, 30, 34 and 48 h. For each sampling time, the number of viable cells of LAB and STEC were determined by plating 100 µl of appropriate dilutions of samples onto MRS agar and ColiID® agar plates (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) with spiral plating (WASP Spiral plating, AES Laboratory, Bruz, France). STEC strains were incubated 24 h at 37 °C and LAB strains were incubated 24 h at 30 °C. Numerations were carried out with an automatic colony counter EC2 easy count 2 (AES Laboratory, Bruz, France) in order to obtain LAB and STEC strains growth data for each competition.

Statistical analysis

A total of 9 STEC strains were co-inoculated with the LAB 6A1MLb4, corresponding to 9 kinetics of simultaneous growth. In addition, all strains were grown in pure culture to represent a growth positive control. A global model (Model 1) was used to describe simultaneous growth of LAB and STEC strains for each of the 9 co-cultures:

$$\left\{ \begin{array}{l} y_{\text{LAB}}(t) = \begin{cases} y_{0, \text{LAB}} + \frac{\mu_{\text{max, LAB}}}{\ln(10)} \times t & \text{if } t < t_{\text{max}} \\ y_{0, \text{LAB}} + \frac{\mu_{\text{max, LAB}}}{\ln(10)} \times t_{\text{max}} & \text{if } t \geq t_{\text{max}} \end{cases} \\ y_{\text{STEC}}(t) = \begin{cases} y_{0, \text{STEC}} + \frac{\mu_{\text{max, STEC}}}{\ln(10)} \times t & \text{if } t < t_{\text{max}} \\ y_{0, \text{STEC}} + \frac{\mu_{\text{max, STEC}}}{\ln(10)} \times t_{\text{max}} - \frac{b}{\ln(10)} \times (t - t_{\text{max}}) & \text{if } t \geq t_{\text{max}} \end{cases} \end{array} \right.$$

with $y(t)$ LAB and $y(t)$ STEC the LAB and STEC density respectively (in \log_{10} CFU/ml) at time t (in h), y_0 LAB and y_0 STEC the initial LAB and STEC density respectively, μ_{max} LAB and μ_{max} STEC the maximum LAB and STEC growth rate respectively (in h^{-1}), b the slope of the decline (h^{-1}) and t_{max} the common time at which growth of both LAB and STEC strains stops.

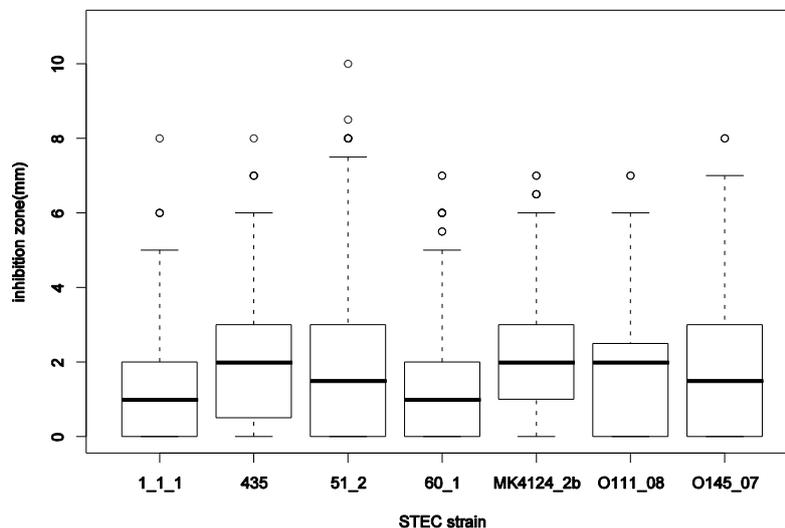
This model assumes an exponential growth of each strain, stopped at the same time for both strains, as soon as the dominant strain (here the LAB one) reaches the stationary phase. In order to describe a trend observed in some of our datasets, an exponential decline of STEC population after t_{\max} was added to the basic model. The basic model without such a decline is a special case of Model (1), defined by fixing b to 0. We called this simplified model Model (2). For each experimental co-culture, both models were fitted to data by non linear regression using the R function `nls`. Fitting of these two nested models were compared using an F-test (6).

Results

Screening of antagonistic activity

The width of the inhibition zone observed for the 268 LAB strains tested in triplicate against the 7 STEC strains of the first screening step, is shown in Figure 1. Twenty-three of the 268 LAB strains tested were totally ineffective against the STEC strains tested, and no inhibition zone could be observed. Two hundred and twenty two LAB strains were ineffective against at least one of the 7 STEC strains. Twenty-three LAB strains showed an effective inhibition of the 7 STEC strains, resulting in clear inhibition zones (≥ 2 mm) around their colonies for the 3 repeated measures.

Figure 1: Boxplot of the width of the inhibition zone (mm) for the 268 LAB strains tested against 7 STEC (n = 3).

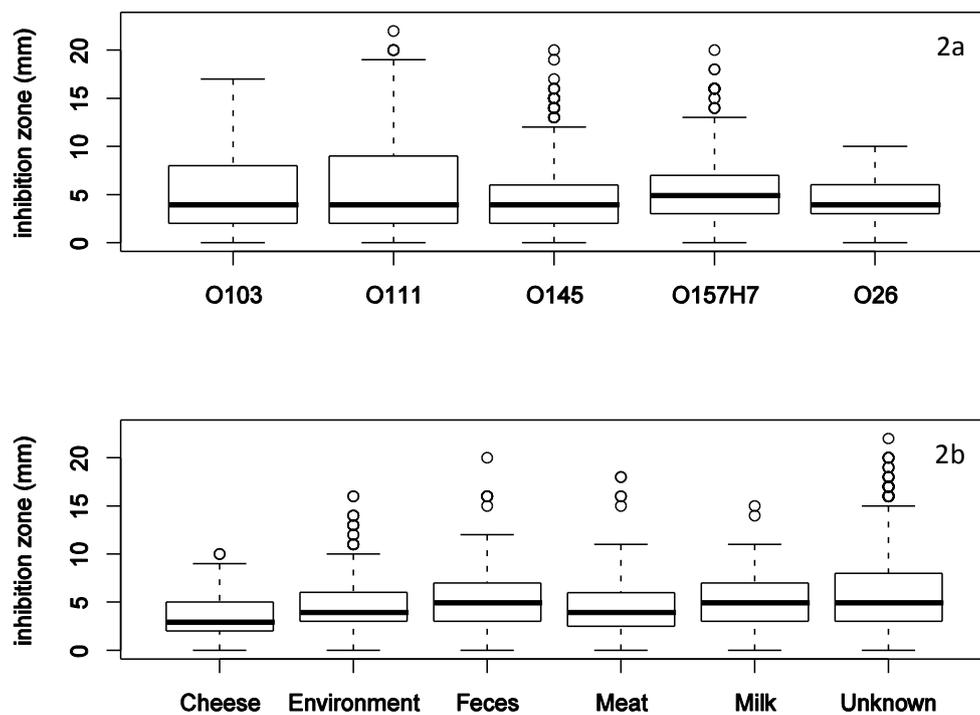


Widths of the inhibition zone were ranging from 0 to 10 mm in this part of the screening (Figure 1) however, 75 % of the inhibition values observed were less than 3 mm. These 23 pre-selected LAB strains were tested in the second part of the screening against 29 other STEC strains in triplicate.

Width of the inhibition zone observed for the 23 LAB strains tested in triplicate against the 36 STEC strains, depending on their serogroup and origin, is shown in Figure 2. Sizes of the different groups were not identical and were constituted of 12 *E. coli* O157:H7 strains, 12 *E.*

coli O26 strains and 3 strains of each other serogroups (O103, O111 and O145). Numbers of strains were also varying among the origins: Cheese (6), Environment (8), Feces (4), Meat (4), Milk (6) and Unknown (8).

Figure 2: Boxplots of the width of inhibition zone (mm) for the 23 LAB strains tested against 36 STEC strains according to STEC serogroup (Figure 2a) or STEC origin (Figure 2b). (n = 3)



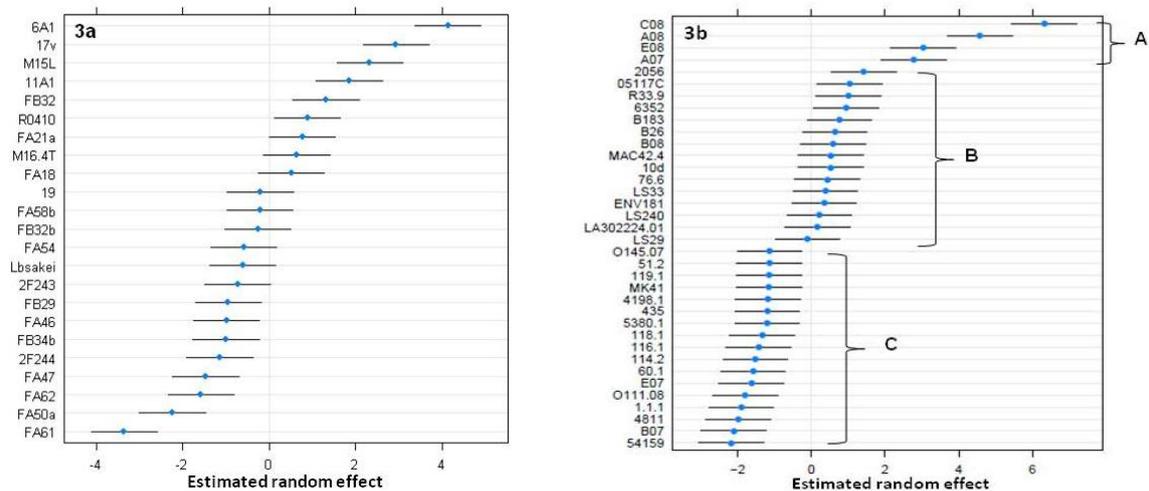
This second part of the screening showed that the observed inhibition values were varying among STEC serogroups and origins (Figure 2). Although extreme values were observed for some serogroups or origins, no particular trend could be drawn depending on these parameters.

In the second part of this screening, 6 LAB strains were proved to be effective against 36 STEC strains with an inhibition zone equal or larger than 2 mm for each repeated measure (Table 3). These strains belong to 5 different taxons: *Enterococcus* (11A1FLb21 and 17v), *Lactobacillus* (FB32), *Lactococcus* (M15L), *Leuconostoc* (6A1MLb4) and *Propionibacterium* (R0410).

No significant effect of both fixed factors serogroup and origin could be observed. Using a simplified model, keeping only the two random factors and their interaction, the distributions of estimated random effects were examined for their respect of normality assumption (Figure 3). If no strong deviation from this assumption was observed for LAB strain factor (Figure 3a), estimated random effects were not homogeneously distributed for STEC strain factor and

their distribution differed significantly from a normal distribution ($p = 0.0008$ with Shapiro-Wilk normality test) (Figure 3b).

Figure 3: Plot of estimated random effects for the LAB strain factor (3a) and STEC strain factor (3b) and definition of three groups for STEC strains (A, B and C).



From this distribution three groups were defined for STEC strains, characterized by a strong sensitivity to LAB strains (group A), an intermediate sensitivity (group B) and a weak sensitivity (group C) (Figure 3b). The sensitivity group of each STEC strain was reported in Table 1. Most of O157:H7 strains belonged to group B whereas O26 strains predominated in group C. Strains of the serogroups O103, O111 and O145 were divided in both groups A and C.

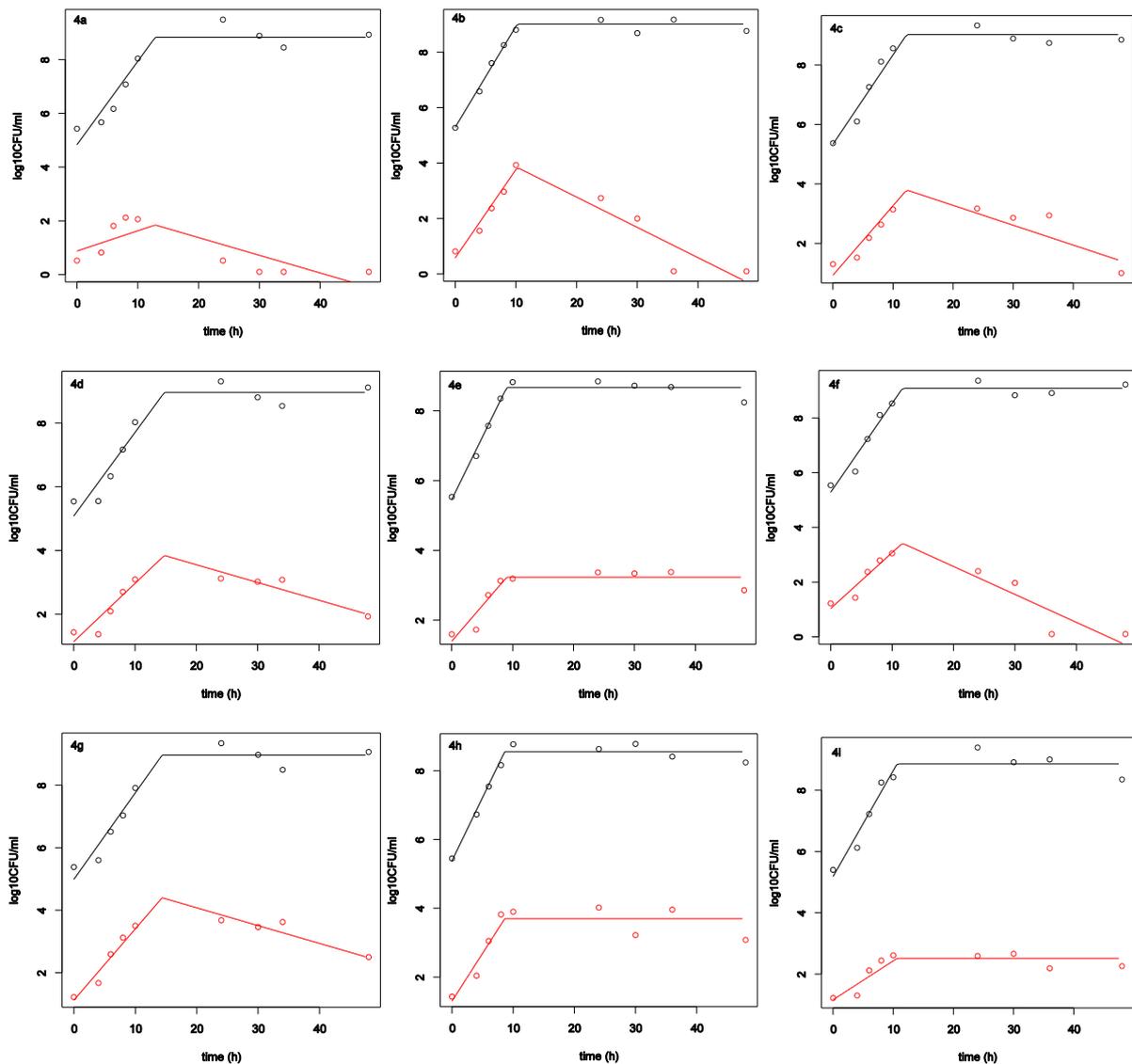
Identification of the inhibiting products:

The identification was performed on the 6 LAB strains previously selected for showing the highest inhibition potential against the 36 STEC strains. The cell-free culture supernatants of the selected LAB strains were observed to inhibit all STEC strains growth in 48 h. Supernatants treated with pepsine, trypsin and α -chymotrypsin proteases were observed to maintain the same level of inhibitory activity. Production of hydrogen peroxide was also not observed through addition of catalase for the LAB strains tested. In case of supernatant neutralization, inhibition was totally removed and STEC strains growth similar to positive control was observed in all assays ($n = 3$). When co-inoculated with these LAB strains, STEC growth inhibition was due to presence of organic acids. Acetic and lactic acid concentrations determined with the enzymatic kit were similar among the 6 LAB strains (Table 3) except for 11A1FLb21 which produced only 2.43 g/l of lactic acid. Due to their homofermentative metabolism, acetic acid concentration wasn't measured for *Enterococcus* strains 17v and 11A1FLb21.

Modeling and predicting the simultaneous growth of STEC and LAB strains

Evolution of the LAB strain (6A1MLb4) in pure culture or co-inoculated with the 9 STEC strains, were similar and were described by an exponential phase followed by a stationary phase (Data non shown). On the contrary, compared to pure culture, co-inoculated STEC strains evolution were different and showed an abrupt deceleration as soon as the co-inoculated LAB reach its maximal density (Figure 4). Growth rate were similar in pure culture or co-inoculated for both species respectively. Different trends could be observed for STEC counts after the end of the exponential growth phase: a stationary phase described by the Model 2 or a phase of decline taken into account in the Model 1 (Figure4). The F-test was used to compare these two nested models, and was resulting in the choice of the Model 1 with a decline term to describe observed data for all strains belonging to group A, two strains from group B (76.6 and 10d) and one strain from group C (116.1). On the opposite, the Model 2, with a stationary phase, well described growth of strain 6352 from group B and strains 60.1 and 435 from group C.

Figure 4: Theroretical and experimental data for simultaneous growth of LAB 6A1MLb4 *Leuconostoc mesenteroides* and 9 STEC strains of each sensitivity class A, B and C.



Simultaneous growth of the LAB strain (6A1MLb4) co-inoculated with each STEC strain A08 (4a), C08 (4b) or E08 (4c) from group A, STEC strain 76.6 (4d), 6352 (4e) or 10d (4f) from group B, and STEC strain 116.1 (4g), 60.1 (4h) or 435 (4i) from group C. Experimental data (○) are represented for STEC (black) and LAB (red) populations. Continuous lines represent their modelization.

Discussion

LAB could be of great interest in bioprotection of feed and food by avoiding development of pathogenic bacteria (13), or in animal and human health as Direct-Fed Microbial and direct probiotics (11, 52, 65, 75). Our objective was to select LAB inhibiting the growth of a wide range of STEC strains *in vitro* and to characterize their inhibition mechanisms. A screening to identify the inhibiting LAB strains, associated with an analysis of the inhibition values according to several factors, was first performed. Then, a study to determine the inhibition mechanisms was realized on the 6 most inhibiting LAB strains. This study was focusing on

the identification of the inhibiting products and on the kinetics of competition between the most inhibiting LAB strain and several STEC strains.

STEC strains from different virulence profiles, serogroups and origins were chosen in order to study many potential pathogenic STEC strains. According to screening data, 6 LAB from different taxons have been found to inhibit the growth of the 36 STEC tested. Statistical study on screening data has shown an important inhibition variability, mainly linked to LAB and STEC strains. It is known that STEC strains coming from environment have undergone several stresses such as weak nutrients accessibility, desiccation or important temperature variations (15). Strains from food have passed through technological stresses: acidic pH and weak a_w in cheese or low temperature storage during milk refrigeration or meat freezing for example. STEC strains found in feces have suffered stresses due to the host physiology such as stomach acidity, presence of bile salts and volatile fatty acids, competition with the natural host gastro-intestinal flora (41). Finally, these stresses might have triggered some resistance mechanisms enhancing the ability of STEC strains to further resist to LAB inhibition (24). Otherwise, it was observed that *E. coli* O157:H7 was less frequently found in raw milk cheese (7) compared to non-O157 serogroups whereas it was the most common STEC serogroup found in meat products (69). Non-O157 serogroups may have been more adapted to LAB inhibition due to prolonged contact with LAB in cheese whereas O157:H7 serotype may have been more sensitive. However, variations in inhibition could not be explained by the origin or the serogroup of the STEC strains tested. Laboratory growing of STEC strains could have altered their potential resistance phenotype acquired in previous matrices. Nevertheless, sensitivity classes have been determined for STEC strains: group A strains were strongly inhibited by LAB, group B strains have shown an intermediate inhibition and a last group C strains were more resistant to LAB inhibition. The groups observed were neither linked to STEC serogroup and origin. As a result, selected LAB were effective against the whole panel of STEC independently of their characteristics.

The multi-well antagonistic activity assay showed that inhibition of STEC growth by LAB was not due to a cell to cell inhibition but was linked to organic acids excreted in the culture medium by LAB. Depending on LAB metabolic pathways, lactic and acetic acids are the main acids produced (26) and the 6 selected strains have been confirmed to acidify the *in vitro* culture media through them. Yields for acid production were varying among LAB strains and STEC growth inhibition may also be explained by a combination of other antimicrobials products. LAB strains belonging to the taxons tested are also known to produce bacteriocins (43). Indeed, LAB could synthesize, ribosomically, proteinaceous compounds, termed as bacteriocins, which are capable to inhibit a large spectrum of bacteria, including both spoilage and pathogenic bacteria (36). Bacteriocin production is influenced by many factors and the most important ones are pH, temperature and medium composition (27). No evidence was shown to confirm the production of such antimicrobial substances by these LAB. It may be possible that LAB strains tested in this study are not bacteriocin producers or that *in vitro* conditions used were not optimum for bacteriocin production. More precisely, studies have shown that highest bacteriocin production could be obtained at pH and temperatures values lower than the optimum ones for growth (1, 22).

All selected LAB were proved to inhibit STEC growth through the same mechanism whatever the STEC sensitivity group. *Leuconostoc mesenteroides* 6A1MLb4 exhibited on average the widest growth inhibition zone, this LAB was thus chosen for the *in vitro* co-inoculations. Two models have been fitted to growth data of 6A1MLb4 and 3 STEC of each sensitivity class co-inoculated. Models show a simultaneous end of the exponential phase of all microbial populations. This type of strain competition is often called the Jameson effect and has already been used successfully to describe this type of data (19, 21, 70). Model (1) was best fitted to growth data of STEC strains belonging to sensitivity group A. Simultaneous growth described by this Model (1) could be compared to the biological mechanism of a bactericidal compound production by LAB during the stationary phase, leading to progressive destruction of the STEC population. Growth data of STEC strains belonging to intermediate and low sensitivity groups B and C co-inoculated with 6A1MLb4 could be described alternatively by Model (1) or Model (2). A different biological mechanism could explain STEC evolutions observed for co-inoculations described by Model (2): the inhibiting substance produced by LAB during the stationary phase may have had only a bacteriostatic effect on the STEC population. Although 3 STEC sensitivity groups have been defined, it was possible to fitted specific models only for sensitivity group A. As shown in Table 1, group A STEC were unable to use the glutamate dependant system and could thus be more affected by LAB inhibition as this system has been proved to be the most effective in protecting *E. coli* against the bactericidal effects of a variety of organic acids (14, 45). However, other STEC strains (76.6, 10d and 116.1) possessing this acid-resistant system had shown a decrease of their population when co-inoculated with 6A1MLb4. Bactericidal or bacteriostatic effect of the substance produced by LAB is not fully explained by presence of this acid resistance system. Modifications in STEC cells membrane organization allowing an easier entry of molecules into the cytoplasm may partially explain the difference (76). Further studies are now required to elucidate the reasons of this bactericidal or bacteriostatic effect on STEC strains.

Bacteriostatic effect was interesting for biopreservation however, due to the low infectious dose of STEC (64), bioprotection strategies against this pathogen should be based on a bactericidal effect. In food industry, most of the elimination techniques of planktonic or biofilm associated strains are based on chemical agents (chlorydric acid, sodium hydroxyd...) or physical treatments such as pasteurization (4, 48). However, food preservation strategies through LAB or their fermentation products addition are already used successfully for *E. coli* O157:H7 elimination (16, 38, 51) and should be developed against other STEC serogroups. The selected LAB of this study have shown an antimicrobial potential against a wide range of STEC strains and will be further investigated against other pathogenic microorganisms such as *Listeria monocytogenes* or *Salmonella* for use in biopreservation strategies.

One must keep in mind that changes observed in STEC and LAB populations in this study were specifics for *in vitro* inoculation. Both populations may behave in a different way in other environments such as feed or food. In this case, it will be necessary to take into account the natural background floras which could be composed of several species possibly producing antimicrobial components. In this case, combination of different microorganisms could have a

synergic effect on STEC strains, hastening their elimination or on the opposite, an antagonistic effect such as biofilm production of *E. coli* O157:H7 strongly enhanced by the presence of companion strains (66).

In conclusion, this study has shown that growth of STEC strains of different serogroups could be inhibited by LAB through the same inhibition mechanism: organic acids production. The inhibition effect was mostly LAB and STEC strains dependant. Although serogroup or origin of STEC were not significantly involved in inhibition variation, sensitivity group of STEC strains were observed. The reasons of the bactericidal or bacteriostatic effect of LAB on STEC strains remain unclear and should be elucidated to consider utilization of these LAB in other points of the STEC epidemiological cycle.

References:

1. **Aasen, I. M., T. Møretrø, T. Katla, L. Axelsson, and I. Storrø.** 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **53**:159-166.
2. **AFSSA.** 2010. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis Afssa du 15 juillet 2008. U.S. Patent Afssa – Saisine n° 2010-SA-0031. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, France.
3. **Awaisheh, S. S., and S. A. Ibrahim.** 2009. Screening of antibacterial activity of lactic acid bacteria against different pathogens found in vacuum-packaged meat products. *Foodborne Pathog. Dis* **6**:1125-1132.
4. **Bari, M. L., E. Nazuka, Y. Sabina, S. Todoriki, and K. Isshiki.** 2003. Chemical and irradiation treatments for killing *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa, radish, and mung bean seeds. *J. Food Prot.* **66**:767-774.
5. **Bates, D. M.** 2010. Fitting linear mixed models in R using lme4 package. The Newsletter of the R project **5**:27-30.
6. **Bates, D. M., and D. G. Watts.** 2007. Nonlinear regression analysis and its applications. John Wiley & Sons.
7. **Baylis, C. L.** 2009. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Int. J. Dairy Technol.* **62**:293-307.
8. **Bertin, Y., J. P. Girardeau, F. Chaucheyras-Durand, B. Lyan, E. Pujos-Guillot, J. Harel, and C. Martin.** 2011. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* gains a competitive advantage by using ethanolamine as a nitrogen source in the bovine intestinal content. *Environ. Microbiol* **13**:365-377.
9. **Bielaszewska, M., R. Köck, A. W. Friedrich, C. von Eiff, L. B. Zimmerhackl, H. Karch, and A. Mellmann.** 2007. Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome: time to change the diagnostic paradigm? *PLoS ONE* **2**:e1024.
10. **Buchanan, R. L., and S. G. Edelson.** 1999. pH-dependent stationary-phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. *J. Food Prot* **62**:211-218.
11. **Calderon, O., C. Padilla, C. Chaves, L. Villalobos, and M. Arias.** 2007. Evaluation of the effect of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic culture added to yogurt over *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* populations. *ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION* **57**:51-55.
12. **Callaway, T. R., M. A. Carr, T. S. Edrington, R. C. Anderson, and D. J. Nisbet.** 2009. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years. *Curr Issues Mol Biol* **11**:67-79.
13. **Caplice, E., and G. F. Fitzgerald.** 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* **50**:131-149.
14. **Castanie-Cornet, M. P., T. A. Penfound, D. Smith, J. F. Elliott, and J. W. Foster.** 1999. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* **181**:3525-3535.
15. **Cebrián, G., N. Sagarzazu, R. Pagán, S. Condón, and P. Mañas.** 2008. Resistance of *Escherichia coli* grown at different temperatures to various environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.* **105**:271-278.
16. **Chang, J. Y., and H. C. Chang.** 2011. Growth inhibition of foodborne pathogens by kimchi prepared with bacteriocin-producing starter culture. *J. Food Sci.* **76**:M72-78.
17. **Chapman, P. A., C. A. Siddons, D. J. Wright, P. Norman, J. Fox, and E. Crick.** 1993. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiol. Infect* **111**:439-447.
18. **Chaucheyras-Durand, F., F. Faqir, A. Ameilbonne, C. Rozand, and C. Martin.**

2010. 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* **76**:640-647.
19. **Cornu, M., E. Billoir, H. Bergis, A. Beaufort, and V. Zuliani.** 2011. Modeling microbial competition in food: application to the behavior of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. *Food Microbiol* **28**:639-647.
 20. **de Man, J. C., M. Rogosa, and M. E. Sharpe.** 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Microbiol* **23**:130-135.
 21. **Delignette-Muller, M. L., M. Cornu, R. Pouillot, and J.-B. Denis.** 2006. Use of Bayesian modelling in risk assessment: Application to growth of *Listeria monocytogenes* and food flora in cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* **106**:195-208.
 22. **DeVuyst, L., R. Callewaert, and K. Crabbe.** 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiol. UK* **142**:817-827.
 23. **Diels, A. M. J., J. De Taeye, and C. W. Michiels.** 2005. Sensitisation of *Escherichia coli* to antibacterial peptides and enzymes by high-pressure homogenisation. *Int. J. Food Microbiol.* **105**:165-175.
 24. **Dong, T., and H. E. Schellhorn.** 2010. Role of RpoS in virulence of pathogens. *Infect. Immun.* **78**:887-897.
 25. **Drasar, B. S.** 1974. Some factors associated with geographical variations in the intestinal microflora. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser* **3**:187-196.
 26. **Drider, D., and H. Prévost.** 2009. *Bactéries Lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*. Economica. Paris, France.
 27. **Drosinos, E. H., M. Mataragas, P. Nasis, M. Galiotou, and J. Metaxopoulos.** 2005. Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. *J. Appl. Microbiol* **99**:1314-1323.
 28. **Fuller, R., and G. R. Gibson.** 1997. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl* **222**:28-31.
 29. **Gopal, P. K., J. Prasad, J. Smart, and H. S. Gill.** 2001. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol* **67**:207-216.
 30. **Griffin, P. M., and R. V. Tauxe.** 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* **13**:60-98.
 31. **Hancock, D., T. Besser, J. Lejeune, M. Davis, and D. Rice.** 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *Int. J. Food Microbiol* **66**:71-78.
 32. **Heuvelink, A.** 2000. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in humans and the food chain. PhD, Utrecht, Netherlands.
 33. **Higginbotham, G., S. Mueller, K. Bolsen, and E. DePeters.** 1998. Effects of inoculants containing propionic acid bacteria on fermentation and aerobic stability of corn silage. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **81**:2185-2192.
 34. **Hirshfield, I. N., S. Terzulli, and C. O'Byrne.** 2003. Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria. *Sci Prog* **86**:245-269.
 35. **INVS.** 2007. Epidémie d'infections à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines non O157 liée à la consommation de camembert au lait cru, Nord-Ouest de la France, Octobre-Décembre 2005. Rapport d'investigation rédigé par L'Institut de veille sanitaire, 2007 13.
 36. **Jack, R. W., J. R. Tagg, and B. Ray.** 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev* **59**:171-200.
 37. **Jenkins, C., J. Evans, H. Chart, G. A. Willshaw, and G. Frankel.** 2008. *Escherichia coli* serogroup O26--a new look at an old adversary. *J. Appl. Microbiol* **104**:14-

- 25.
38. **Jin, T., H. Zhang, and G. Boyd.** 2010. Incorporation of preservatives in polylactic acid films for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and extending microbiological shelf life of strawberry puree. *J. Food Prot.* **73**:812-818.
39. **Johnson, R., R. Clarke, J. Wilson, S. Read, K. Rahn, S. Renwick, K. Sandhu, D. Alves, M. Karmali, H. Lior, S. McEwen, J. Spika, and C. Gyles.** 1996. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* **59**:1112-1122.
40. **Karmali, M. A., V. Gannon, and J. M. Sargeant.** 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology* **140**:360-370.
41. **Kazmierczak, M. J., M. Wiedmann, and K. J. Boor.** 2005. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**:527-543.
42. **Keenan, T. W., and D. D. Bills.** 1968. Metabolism of Volatile Compounds by Lactic Starter Culture Microorganisms. A Review1. *Journal of Dairy Science* **51**:1561-1567.
43. **Klaenhammer, T. R.** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**:337-349.
44. **Lin, J., I. S. Lee, J. Frey, J. L. Slonczewski, and J. W. Foster.** 1995. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* **177**:4097-4104.
45. **Lin, J., M. P. Smith, K. C. Chapin, H. S. Baik, G. N. Bennett, and J. W. Foster.** 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol* **62**:3094-3100.
46. **Londero, A., R. Quinta, A. G. Abraham, R. Sereno, G. De Antoni, and G. L. Garrote.** 2011. Inhibitory activity of cheese whey fermented with kefir grains. *J. Food Prot* **74**:94-100.
47. **Lynn, T. V., D. D. Hancock, T. E. Besser, J. H. Harrison, D. H. Rice, N. T. Stewart, and L. L. Rowan.** 1998. The occurrence and replication of *Escherichia coli* in cattle feeds. *J. Dairy Sci* **81**:1102-1108.
48. **Mak, P. P., B. H. Ingham, and S. C. Ingham.** 2001. Validation of apple cider pasteurization treatments against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **64**:1679-1689.
49. **McAllister, T., K. Beauchemin, A. Alazzeh, J. Baah, R. Teather, and K. Stanford.** 2011. Review: The use of direct fed microbials to mitigate pathogens and enhance production in cattle. *CANADIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE* **91**:193-211.
50. **Mellmann, A., M. Bielaszewska, L. B. Zimmerhackl, R. Prager, D. Harmsen, H. Tschäpe, and H. Karch.** 2005. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in human infection: in vivo evolution of a bacterial pathogen. *Clin. Infect. Dis* **41**:785-792.
51. **Mufandaedza, J., B. C. Viljoen, S. B. Feresu, and T. H. Gadaga.** 2006. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *Int. J. Food Microbiol.* **108**:147-152.
52. **Papathomopoulou, K., and P. Kotzekidou.** 2009. INACTIVATION OF VEROCYTOTOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI* AND *LISTERIA MONOCYTOGENES* CO-CULTURED WITH *LACTOBACILLUS SAKEI* IN A SIMULATED MEAT FERMENTATION MEDIUM. *JOURNAL OF FOOD SAFETY* **29**:331-347.
53. **Paton, A., and J. Paton.** 1998. Detection and characterization of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol* **36**:598-602.
54. **Pedroso, A., A. Adesogan, O. Queiroz, and S. Williams.** 2010. Control of *Escherichia coli* O157:H7 in corn silage with or without various inoculants: Efficacy and mode of action. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **93**:1098-1104.

55. **Pereira, C. I., J. A. Graça, N. S. Ogando, A. M. P. Gomes, and F. X. Malcata.** 2009. Bacterial dynamics in model cheese systems, aiming at safety and quality of Portuguese-style traditional ewe's cheeses. *J. Food Prot* **72**:2243-2251.
56. **Riemann, H. P., and D. O. Cliver.** 1998. Microbial food borne pathogens. *Escherichia coli O157:H7*. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract* **14**:41-48.
57. **Roe, A. J., C. O'Byrne, D. McLaggan, and I. R. Booth.** 2002. Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology (Reading, Engl.)* **148**:2215-2222.
58. **Rouse, S., and D. van Sinderen.** 2008. Bioprotective potential of lactic acid bacteria in malting and brewing. *J. Food Prot* **71**:1724-1733.
59. **Ruas-Madiedo, P., and C. G. de los Reyes-Gavilán.** 2005. Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science* **88**:843-856.
60. **Snedeker, K. G., M. Campbell, and J. M. Sargeant.** 2011. A Systematic Review of Vaccinations to Reduce the Shedding of *Escherichia coli* O157 in the Faeces of Domestic Ruminants. *Zoonoses and Public Health*.
61. **Tagg, J., and A. McGiven.** 1971. Assay System for Bacteriocins. *Applied Microbiology* **21**:943-&.
62. **Takada, A., G. Umitsuki, K. Nagai, and M. Wachi.** 2007. RNase E is required for induction of the glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **71**:158-164.
63. **Tarr, P. I., C. A. Gordon, and W. L. Chandler.** 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet* **365**:1073-1086.
64. **Tilden, J., Jr, W. Young, A. M. McNamara, C. Custer, B. Boesel, M. A. Lambert-Fair, J. Majkowski, D. Vugia, S. B. Werner, J. Hollingsworth, and J. G. Morris Jr.** 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health* **86**:1142-1145.
65. **Tsai, Y., P. Cheng, and T. Pan.** 2010. Immunomodulating Activity of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157H7 - Infected Mice. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* **58**:11265-11272.
66. **Uhlich, G. A., D. P. Rogers, and D. A. Mosier.** 2010. *Escherichia coli* serotype O157:H7 retention on solid surfaces and peroxide resistance is enhanced by dual-strain biofilm formation. *Foodborne Pathog. Dis.* **7**:935-943.
67. **Van Baale, M. J., J. M. Sargeant, D. P. Gnad, B. M. DeBey, K. F. Lechtenberg, and T. G. Nagaraja.** 2004. Effect of forage or grain diets with or without monensin on ruminal persistence and fecal *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5336-5342.
68. **van Reenen, C. A., and L. M. T. Dicks.** 2011. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Arch. Microbiol* **193**:157-168.
69. **Vernozy-Rozand, C., and S. Roza.** 2003. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia Coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). Rapport de l'AFSSA, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments AFSSA, Maisons Alfort.
70. **Vimont, A., C. Vernozy-Rozand, M. Montet, C. Lazizzera, C. Bavai, and M. Delignette-Muller.** 2006. Modeling and predicting the simultaneous growth of *Escherichia coli* O157 : H7 and ground beef background microflora for various enrichment protocols. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* **72**:261-268.
71. **Walkling-Ribeiro, M., F. Noci, D. A. Cronin, J. G. Lyng, and D. J. Morgan.** 2008. Inactivation of *Escherichia coli* in a tropical fruit smoothie by a combination of heat and pulsed electric fields. *J. Food Sci.* **73**:M395-399.

72. **Weinberg, Z. G., O. Shatz, Y. Chen, E. Yosef, M. Nikbahat, D. Ben-Ghedalia, and J. Miron.** 2007. Effect of Lactic Acid Bacteria Inoculants on In Vitro Digestibility of Wheat and Corn Silages. *Journal of Dairy Science* **90**:4754-4762.
73. **World Health Organization.** 2001. WHO | Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, a joint FAO/WHO expert consultation. Cordoba, Argentina, 1 - 4 October 2001.
74. **Yaakoubi, K., N. Benkerroum, F. Wiorowski, F. Sanson, J. Haydersah, and I. Chevallier.** 2009. DEVELOPMENT OF A MULTIWELL ANTAGONISTIC ACTIVITY ASSAY FOR THE DETECTION OF BACTERIOCIN PRODUCTION BY LACTIC ACID BACTERIA. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology* **17**:32-45.
75. **Zago, M., M. E. Fornasari, D. Carminati, P. Burns, V. Suárez, G. Vinderola, J. Reinheimer, and G. Giraffa.** 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol* **28**:1033-1040.
76. **Zhang, G. J., H. W. Liu, L. Yang, Y. G. Zhong, and Y. Z. Zheng.** 2000. Influence of membrane physical state on the lysosomal proton permeability. *J. Membr. Biol.* **175**:53-62.

TABLE 1: Characteristics of STEC strains used

Screening step	Strain	Serotype	Origin	Virulence factor					Sensitivity group
				<i>ea</i> <i>e</i>	<i>stx</i> 1	<i>stx</i> 2	<i>stx</i> c	Acid resistance	
2	ENV181	O157:H7	Environment	+	-	+	+	+	B
2	6352	O157:H7	Environment	+	-	-	+	+	B
2	B26	O157:H7	Environment	+	-	+	+	+	B
2	B183	O157:H7	Environment	+	-	+	+	+	B
2	LS33	O157:H7	Feces	+	+	+	+	+	B
2	LS29	O157:H7	Feces	+	+	+	+	+	B
2	76.6	O157:H7	Feces	+	+	+	+	+	B
2	R33.9	O157:H7	Feces	+	-	+	+	+	B
2	05117C	O157:H7	Meat	+	-	+	+	+	B
2	LS240	O157:H7	Meat	+	-	+	+	+	B
1	435	O157:H7	Meat	+	+	+	+	+	C
1	MK4124-2b	O157:H7	Meat	+	-	+	+	+	C
2	114.2	O26:H11	Environment	+	-	-	-	+	C
2	5380.1	O26:H11	Cheese	+	-	-	-	+	C
2	4198.1	O26:H-	Cheese	+	-	-	-	+	C
2	119.1	O26:H11	Environment	+	-	-	-	+	C
2	116.1	O26:H11	Environment	+	-	-	-	+	C
2	10d	O26:H11	Cheese	+	+	-	+	+	B
1	51.2	O26:H11	Cheese	+	+	-	+	+	C
2	LA302224.0							+	B
	1	O26:H11	Milk	+	-	+	+		
1	60.1	O26:H11	Milk	+	-	-	-	+	C
2	MAC42.4	O26:H11	Milk	+	+	-	+	+	B
2	118.1	O26:H11	Environment	+	-	-	-	+	C
2	B08	O26:H-	Milk	+	+	+	+	-	B
2	2056.1	O103:H2	Milk	-	-	-	-	-	A
1	1.1.1	O103:H-	Milk	-	-	-	-	+	C
2	E08.1	O103:H2	Unknown	+	+	-	+	-	A
2	B07.1	O103:H-	Unknown	+	-	+	+	+	C
2	54159.1	O111:H8	Cheese	+	-	-	+	+	C
2	A07.1	O111:H-	Unknown	+	-	-	-	-	A
2	C08.1	O111:H-	Unknown	+	+	+	+	-	A
1	O111.08	O111:H-	Unknown	+	+	+	+	+	C
2	A08.1	O145:H-	Unknown	+	+	-	+	-	A
2	E07.1	O145:H28	Unknown	+	+	-	+	-	C
1	O145.07	O145:H-	Unknown	+	+	-	+	+	C
2	4811.1	O145:H-	Cheese	+	-	-	-	-	C

(+) for acid resistance characteristic means the strain is able to use the glutamate dependent system.

TABLE 2: Target, genes and references of PCR assay for virulence profile of STEC strains.

Target	Gene	Reference
Serotype O157:H7	<i>uidA</i>	(12)
Somatic antigen O26	<i>wzx</i>	(17)
Somatic antigen O103	<i>rlmB</i>	(26)
Somatic antigen O111	<i>rfb</i>	(51)
Somatic antigen O145	<i>wck</i>	(25)
Flagellar antigen H11	<i>fliC_{H11}</i>	(24)
Flagellar antigen H2	<i>fliC_{H2}</i>	(46)
Flagellar antigen H8	<i>fliC_{H8}</i>	(46)
Flagellar antigen H28	<i>fliC_{H28}</i>	(46)
Intimin adherence protein	<i>eae</i>	(14)
Shigatoxin 1	<i>stx1</i>	(51)
Shigatoxin 2	<i>stx2</i>	(51)
Shigatoxins 1 and 2	<i>stxc</i>	(49)

TABLE 3: Taxon, extremum of the inhibition zone (mm) and concentration of lactic and acetic acids for the 6 most inhibiting LAB strains against 36 STEC strains.

Strain	Taxon	Inhibition zone (mm)		Concentration (g/l)	
		Minimum	Maximum	Lactic acid	Acetic acid
11A1FLb2 1	<i>Enterococcus</i>	2	19	2.43	ND
17v	<i>Enterococcus faecium</i>	3	17	5.361	ND
FB32	<i>Lactobacillus sakei</i>	2	19	4.145	2.1
M15L	<i>Lactococcus garvieae</i>	2	17	5.716	2.42
6A1MLb4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2	22	5.589	1.96
R0410	<i>Propionibacterium</i>	2	17	5.787	2.06

ND: non determined for homofermentative strains (11A1FLb21 and 17v).

ANNEXE 3 : Poster n°1

« Study of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* growth inhibition by Lactic Acid Bacteria ».

Lysiane Dunière, Marie-Laure Delignette-Muller, Audrey Gleizal, Franck Ferré, Isabelle Chevallier et Delphine Thévenot.

Poster présenté lors de la “2nd ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans and the Environment” du 8 au 10 Juin 2010, Toronto, Canada.

STUDY OF SHIGA-TOXIN PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* GROWTH INHIBITION BY LACTIC ACID BACTERIA

L. Dunière¹, M-L. Delignette-Muller², A. Gleizal¹, F.Ferre¹, I. Chevallier³, D. Thevenot¹.

¹Université de Lyon, F-69000, Lyon ; VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, Laboratoire National de Référence STEC, Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, F-69280 Marcy l'Etoile, France. ²Université Lyon 1, CNRS, UMR5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622, Villeurbanne, France. ³Université de Clermont-Ferrand, VetAgro Sup, Campus Agronomique de Clermont, UR Typicité des Produits Alimentaires, , FR-63370 Lempdes, France.

INTRODUCTION :

Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) is a recent emerging group of food-borne pathogens. Ruminants are recognized as the principal reservoir of STEC and so undercooked beef, raw dairy product or vegetables contaminated by the faeces of infected cattle are frequent sources of human STEC infection. STEC could infect cattle by their ability to survive and replicate in variety of cattle feeds, particularly in poorly fermented silage.

Lactic Acid Bacteria (LAB) are commonly used as bacterial inoculants in the production of silage. The LAB allow silage preservation by increasing lactic acid concentrations and consequently decrease pH values. Moreover LAB are known to produce antimicrobial substances active against other microorganisms. Many Gram negative bacteria, such as *E.coli*, could show a growth inhibition when in contact with acids or antimicrobial peptides.

AIMS :

- Identification of LAB showing antimicrobial activities against STEC strains.
- Characterization of the inhibition in order to select the best candidates for use in cattle feed.

MATERIAL AND METHODS :

36 STEC	
Serogroup	Origin
O157:H7	Meat
	Bovine Faeces
	Environment
O26	Milk
	Cheese
	Environment
O103	Cheese
O11 and O145	Reference

271 LAB	
<i>Lactobacillus</i>	
<i>Lactococcus</i>	
<i>Leuconostoc</i>	
<i>Enterococcus</i>	
<i>Pediococcus</i>	
<i>Propionibacterium</i>	
<i>Vagococcus</i>	



RESULTS :

- Selection of 26 LAB showing STEC growth inhibition against the 5 serogroups tested (Inhibition Zone ≥ 2 mm)
Lactobacillus, *Enterococcus*, *Propionibacterium*

- Statistical Analysis :

Linear mixed models were used to test the effect of two crossed random factors (LAB and STEC strains) and two fixed factors (origin and serogroup of STEC strains) on inhibition zone. Calculations were performed using R and the package lme4.

- Significant effects of both random factors were observed ($p < 0.0001$), but no significant effect of neither origin nor serogroup of STEC strains.

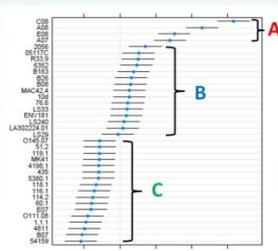
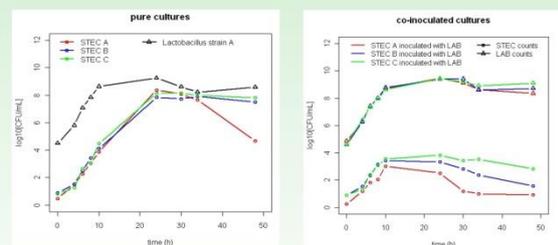


Figure 2 : Random effects for the "STEC strains" factor with 95% prediction intervals

Three groups of STEC strains appear in Figure 2
A : strains very sensitive to LAB inhibition,
B : strains moderately sensitive to LAB inhibition,
C : strains less sensitive to LAB inhibition.

Figure 3 : Kinetics of *Lactobacillus* strain A and STEC strains of the three groups (A, B and C) in pure cultures or co-inoculated in MRS/BHI broth (means for n=3)



- STEC strains growth were not affected by LAB during their exponential phase.
- STEC strains growth in co-cultures were stopped by a competition effect when *Lactobacillus* strain A reached the stationary phase : Jameson Effect
- During the stationary phase of LAB, STEC counts seemed to be stabilized for group C and showed a decrease for groups B and A (more important for group A)

CONCLUSION :

LAB of *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Propionibacterium* genus have shown an antagonistic effect on STEC growth. These bacteria could represent a technological interest to ensure the quality of cattle feed.

ANNEXE 4 : Communication orale n°1

Communication présentée lors du 8^{ème} congrès national de la Société Française de Microbiologie
du 2 au 4 Juin, Marseille, France.

« ETUDE DE L'INHIBITION DE CROISSANCE DE SOUCHES D'*ESCHERICHIA COLI* PRODUCTEURS
DE SHIGA TOXINES (STEC) PAR DES BACTERIES LACTIQUES. »

L Dunière, D Thevenot, I Chevallier

Introduction: Les *E. coli* producteurs de ShigaToxines (STEC) sont reconnus à l'échelon international comme des pathogènes émergents, associés à des épidémies alimentaires parfois de grande envergure et souvent gravissimes. L'atteinte de l'homme se traduit par des pathologies sérieuses, surtout chez les enfants de moins de 3 ans, avec des développements de colites hémorragiques et/ou de syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) pouvant entraîner des séquelles rénales parfois mortelles. La plupart des infections à STEC sont associées à la consommation de denrées d'origine animale notamment la viande hachée de bœuf insuffisamment cuite ainsi que les produits laitiers. La contamination de ces aliments étant la plupart du temps liée à une contamination fécale. Le réservoir des STEC est en effet constitué par des animaux porteurs sains, et plus particulièrement le tube digestif des ruminants (essentiellement les bovins). Le portage sain des STEC par les ruminants est en partie entretenu au travers de l'alimentation du bétail. De nombreuses bactéries à gram négative comme *Escherichia coli*, peuvent être inhibées par diverses substances produites par des bactéries lactiques. Ces dernières sont en effet connues pour leurs propriétés antimicrobiennes envers d'autres organismes plus ou moins génétiquement proches grâce notamment à la production d'acides ou de peptides antimicrobiens. L'objectif des travaux a été d'identifier des bactéries lactiques ayant des activités antimicrobiennes contre des souches de STEC, puis de caractériser cette inhibition.

Matériel et méthode: Dans un premier temps, le potentiel inhibiteur de 271 souches de bactéries lactiques (appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc* et *Propionibacterium*) a été évalué sur 7 souches de STEC appartenant aux 5 sérogroupes d'intérêt décrit par l'AFSSA : O157 H7, O26, O103, O145 et O111.

L'inhibition de la croissance des souches de STEC a été évaluée à l'aide d'un test en goutte adapté du protocole de Tagg et McGiven. Dans un deuxième temps, les souches de bactéries lactiques sélectionnées dans la première partie ont été testées de la même manière sur 36 souches de STEC appartenant aux différents sérogroupes cibles, et issus de différentes origines (viande, environnement ou fèces) afin de valider leur potentiel inhibiteur. Dans un troisième temps, la nature de ces inhibitions a été caractérisée suivant un arbre de décision par la méthode des tests en goutte en différentes étapes.

Résultats discussion : Au total, 25 souches de bactéries lactiques ont été considérées comme inhibitrices de la croissance (halo d'inhibition >1.5 mm) des 7 souches de STEC testées. Les analyses effectuées par la suite ont montré que les souches de STEC présentaient des degrés d'inhibition variables en fonction de leurs sérogroupes et de leurs origines. Enfin, les inhibitions observées se sont révélées de natures différentes en fonction des souches de bactéries lactiques étudiées (peptides, acides....)

Conclusion : Cette étude a montré que des bactéries pathogènes comme les STEC peuvent être inhibées par la présence de bactéries technologiques que sont les bactéries lactiques. De telles souches représentent un intérêt majeur pour limiter la présence des STEC dans les ensilages, mais également dans le tube digestif des ruminants afin de limiter le portage asymptomatique et ainsi enrayer le cycle épidémiologique.

ANNEXE 5 : Communication orale n°2

Communication présentée lors du 17^{ème} Colloque des Bactéries Lactique, du 25 au 27 Octobre 2010, Nancy, France.

« ETUDE DE L'INHIBITION DE CROISSANCE DES *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES (STEC) PAR DES BACTERIES LACTIQUES. »

Dunière Lysiane, Delignette-Muller Marie-Laure, Gleizal Audrey, Ferre Franck, Chevallier Isabelle, Thevenot Delphine

Introduction : Les *E. coli* producteurs de ShigaToxines (STEC) sont reconnus à l'échelon international comme des pathogènes émergents. L'atteinte de l'homme se traduit par des pathologies sérieuses, avec des développements de colites hémorragiques et/ou de syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) pouvant entraîner des séquelles rénales parfois mortelles (Espié *et al.*, 2005). Les ruminants sont considérés comme le réservoir principal des STEC et la consommation de denrées d'origine animale contaminées par des fèces d'animaux porteurs sont des sources fréquentes d'infections humaines à STEC (viande hachée de bœuf insuffisamment cuite, produits laitiers ou végétaux). Les STEC peuvent contaminer les ruminants par leur capacité à survivre et se répliquer dans de nombreux aliments pour bétail et particulièrement dans les ensilages incorrectement menés (Fenlon and Wilson, 2000). De nombreuses bactéries à gram négative comme *Escherichia coli*, peuvent être inhibées par diverses substances produites par des bactéries lactiques. Ces dernières sont en effet connues pour leurs propriétés antimicrobiennes envers d'autres organismes plus ou moins génétiquement proches grâce notamment à la production d'acides ou de peptides antimicrobiens (Guarner and Schaafsma, 1998). Les objectifs des travaux ont été, tout d'abord, d'identifier des bactéries lactiques ayant des activités antimicrobiennes contre des souches de STEC, puis, de caractériser cette inhibition pour sélectionner les souches les plus aptes à être utilisées en termes de bio-protection agronomique dans les ensilages.

Matériel et méthode : Dans un premier temps, le potentiel inhibiteur de 271 souches de bactéries lactiques (appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*,

Pediococcus, *Vagococcus*, *Leuconostoc* et *Propionibacterium*) a été évalué sur 7 souches de STEC appartenant aux 5 sérogroupes d'intérêt décrit par l'AFSSA : O157 H7, O26, O103, O145 et O111. L'inhibition de la croissance des souches de STEC a été évaluée à l'aide d'un test en goutte adapté du protocole de Tagg et McGiven (1971). Dans un deuxième temps, les souches de bactéries lactiques ainsi sélectionnées ont été testées de la même manière sur 36 souches de STEC appartenant aux différents sérogroupes cibles, et provenant de différentes origines (aliments, environnement ou fèces) afin de valider leur potentiel inhibiteur. Une étude statistique utilisant le logiciel R et le package lme4, ainsi qu'une étude cinétique ont été menées sur les données obtenues afin de caractériser l'origine de cette inhibition (R software).

Résultats discussion : Au total, 25 souches de bactéries lactiques ont été considérées comme inhibitrices de la croissance (halo d'inhibition >2 mm) des 7 souches de STEC testées. Les analyses effectuées par la suite ont montré que les souches de STEC se répartissaient en différents groupes selon leur degré d'inhibition mais qu'aucune influence significative du séro groupe ni de l'origine des souches de STEC n'était observable. L'étude cinétique a confirmé une différence dans la vitesse et la nature de l'inhibition en fonction des groupes de STEC testés.

Conclusion : Cette étude a montré que des bactéries pathogènes comme les STEC peuvent être inhibées par la présence de bactéries technologiques que sont les bactéries lactiques. De telles souches représentent un intérêt majeur pour limiter la présence des STEC dans les ensilages, mais également dans le tube digestif des ruminants afin de limiter le portage asymptomatique et ainsi d'enrayer le cycle épidémiologique.

Références

E. Espié, F. Grimont, P. Mariani-Kurkdjian et V. Vaillant, **2006**, Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2006, *rapport de l'Institut Pasteur et de l'Institut de Veille Sanitaire*.

DR. Fenlon and J. Wilson, **2000**, Growth of *Escherichia coli* O157 in poorly fermented laboratory silage : a possible environmental dimension in the epidemiology of *E.coli* O157. *L. Appl. Microbiol.* 30 : 118-121

F. Guarner and GJ. Schaafsma, **1998**, Probiotics. *Int. J. of Food Microbiol.* 39 : 237-238

R Development Core Team (2009) R : A Language and Environment for Statistical Computing. R Development Core Team. Vienna, Austria. (ISBN 3-900051-07-0) (<http://www.R-project.org>)

JR. Tagg and AR. Mc Given, **1971**, Assay system for bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 21, 943.

ANNEXE 6 : Publication dans « Applied and Environmental Microbiology »

“Fate of *Escherichia coli* O26 in corn silage experimentally inoculated at ensiling, at silo opening, or after aerobic exposure, and protective effect of various bacterial inoculants.”

Lysiane Dunière, Audrey Gleizal, Frédérique Chaucheyras-Durand, Isabelle Chevallier et
Delphine Thévenot.

Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(24) 8698-8704

Fate of *Escherichia coli* O26 in Corn Silage Experimentally Contaminated at Ensiling, at Silo Opening, or after Aerobic Exposure, and Protective Effect of Various Bacterial Inoculants

Lysiane Dunière,^{1*} Audrey Gleizal,^{1,2} Frédérique Chaucheyras-Durand,^{3,4}
Isabelle Chevallier,⁵ and Delphine Thévenot-Sergentet^{1,2}

Université de Lyon, VetAgro Sup, Unité de Recherche CALITYSS, 69280 Marcy l'Etoile, France¹; Université de Lyon, VetAgro Sup, Laboratoire LMAP/LNR STEC, Université Lyon I, 1 Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France²; Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité de Microbiologie UR 454, Centre de Recherche de Clermont-Ferrand/Thaix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France³; Lallemand Animal Nutrition, 19 Rue des Briquetiers, 31702 Blagnac, France⁴; and Clermont Université VetAgro Sup, Unité de Recherche CALITYSS, 89 Avenue de l'Europe, 63370 Lempdes, France⁵

Received 25 July 2011/Accepted 24 September 2011

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains are responsible for human illness. Ruminants are recognized as a major reservoir of STEC, and animal feeds, such as silages, have been pointed out as a possible vehicle for the spread of STEC. The present study aimed to monitor the fate of pathogenic *E. coli* O26 strains in corn material experimentally inoculated (10^5 CFU/g) during ensiling, just after silo opening, and after several days of aerobic exposure. The addition of 3 bacterial inoculants, *Propionibacterium* sp., *Lactobacillus buchneri*, and *Leuconostoc mesenteroides* (10^6 CFU/g), was evaluated for their abilities to control these pathogens. The results showed that *E. coli* O26 could not survive in corn silage 5 days postensiling, and the 3 inoculants tested did not modify the fate of pathogen survival during ensiling. In the case of direct contamination at silo opening, *E. coli* O26 could be totally eradicated from corn silage previously inoculated with *Leuconostoc mesenteroides*. The combination of proper ensiling techniques and the utilization of selected bacterial inoculants appears to represent a good strategy to guarantee nutritional qualities of cattle feed while at the same time limiting the entry of pathogenic *E. coli* into the epidemiological cycle to improve the microbial safety of the food chain.

There is growing concern about food safety and especially about inputs of pathogenic microorganisms with possible implications for human health and the environment. Among these microorganisms, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains have emerged in the past 30 years as a food-borne pathogen of public health importance (51). STEC strains are responsible for human illnesses ranging from diarrhea to hemorrhagic colitis and hemolytic-and-uremic syndrome (HUS) (35). HUS has been recognized as the leading cause of acute renal failure in children (60). STEC infections are frequently acquired through the ingestion of contaminated food or water or through direct contact with contaminated animals (38). The majority of reported outbreaks and sporadic cases of STEC infection in humans have been associated with serotype O157:H7 (38). However, other STEC serogroups are significant causes of human diseases, especially *E. coli* O26, O103, O111, and O145 (48). Since 1996, numbers of infections attributed to *E. coli* O26 strains have shown an important increase (9). In France, one outbreak linked to raw milk cheese contaminated by *E. coli* O26 was reported in December 2005 (21), and in a prospective multicenter study conducted in Austria and Germany during a 6-year period, *E. coli* O26 was the

second most frequently detected serogroup isolated from patients with a clinical diagnosis of HUS after the O157:H7 serotype (67). STEC strains possess *stx* genes, coding for Shiga toxin production (47). Previous studies have shown that *E. coli* O26 could easily arise from *stx*-negative to *stx*-positive strains and vice versa (6, 36). An important property of food-borne pathogenic *Escherichia coli* strains is their resistance to acids, enabling them to survive in fermented environments or in the human gastrointestinal tract (42). Indeed, the low infectious dose associated with human STEC infection is attributed to this acid-resistant characteristic (28). Three systems, the oxidative, glutamate-dependent, and arginine-dependent, could protect *E. coli* cells against pH 2 to 2.5 (41). The glutamate-dependent system has been proven to be most effective in protecting *E. coli* against the bactericidal effects of a variety of organic acids (10, 42).

Ruminants are recognized to be a major reservoir of STEC (11, 62). The average STEC carriage rate in cattle in Europe was shown to range from 11 to 21% (53). STEC carriage in bovines is transient (29), and variations in STEC excretion can be observed over time (30, 55). The seasonal increase in STEC shedding from cattle suggests that environmental replication may have an important role in STEC ecology on farms. Feed-stuffs could be considered the first step in the food production chain, and the prevalence of STEC in cattle environments should be controlled to limit the risk of STEC transmission to humans. Animal feeds, such as silages, have been suspected to be a vehicle for the spread of STEC within livestock (15).

* Corresponding author. Mailing address: VetAgro Sup, Unité CALITYSS/Equipe EMSA, 1 Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France. Phone: 33 4 78 87 26 85. Fax: 33 4 78 87 26 69. E-mail: l.duniere@vetagro-sup.fr.

Published ahead of print on 7 October 2011.

Indeed, *E. coli* O157 has been found relatively frequently in bunk feeds (1.8%) (29) and could also replicate in a variety of cattle feeds (43). The most important crops for ensiling worldwide are whole crop corn, alfalfa, and various grasses (63). In France, corn silage is consumed by about 80% of dairy cows throughout the year (2), and it is extensively used for the feeding of U.S. herds (37).

Ensiling is a preservation method that is based on natural lactic acid fermentation under anaerobic conditions (27). The preservative effect is related mostly to a rapid pH reduction due to water-soluble carbohydrate (WSC) conversion into organic acids by lactic acid bacteria (LAB). Various amounts of organic acids, mainly lactic acid, acetic acid, and propionic acid, are produced during silage fermentation, depending on forage quality parameters, moisture, and the use of silage additives (2). The addition of selective bacteria at the beginning of ensiling could influence the fermentation process, improve the preservation efficiency, and avoid aerobic spoilage. The heterofermentative organism *Lactobacillus buchneri* is extensively used to improve the aerobic stability of silages via its accumulation of organic acids (acetic and propionic acids) and propylene glycol (46). Many studies have shown an interest in this species as a silage additive (24, 33, 39, 40, 66). Other lactic acid bacteria, such as *Leuconostoc mesenteroides* or the homofermentative lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus* sp., can be used for the rapid production of lactic acid and their antimicrobial effects (27, 31, 33).

STEC contamination in silage could occur via shedding or through the fertilization of fields with manure or irrigation water. Although previous studies have shown that *E. coli* O157:H7 could not survive in well-fermented silage (4, 8), pathogenic *E. coli* strains were shown to survive in poorly fermented silage (22, 23). Inadequate silage processing could thus be a source of animal contamination. Silo opening and animal feeding could be other possible ways of animal reservoir contamination by pathogenic *E. coli*. At silo opening, air penetrates into the silage, resulting in an important pH increase (65), which could allow *E. coli* to survive. Several studies have been performed to assess the fate of *E. coli* O157 in silage (3, 49), but nothing is known about the survival of *E. coli* O26 in silage. Only one study has been performed to evaluate the effects of various bacterial inoculants on the survival of pathogenic *E. coli* O157:H7 in aerobically spoiled silages (49). The first objective of this study was to evaluate the fate of *E. coli* O26 during corn silage processing from ensiling until unloading and after aerobic exposure. The second objective was to evaluate the potential of three different bacterial inoculants to control pathogen development.

MATERIALS AND METHODS

E. coli O26 strains. Three different *E. coli* strains belonging to the O26 serogroup were used in the present study (Table 1). The strains belong to the *E. coli* collection of LMAP VetAgro Sup, French National Reference Laboratory. One of these strains originated from a farm environment (strain C2), and the other two came from dairy products (strains C1 and C3). The virulence profiles of these strains were characterized by real-time PCR (RT-PCR), and the strains were tested for their ability to survive acid stress by using the glutamate-dependent system according to a protocol described previously by Takada et al. (59). All strains were kept in cryobeads (Technical Services, CL, Heywood, Lancashire, United Kingdom) and maintained at $\leq 80^{\circ}\text{C}$.

TABLE 1. Characteristics of *E. coli* O26 strains used^a

Strain	Origin	Serotype	Presence of virulence factor			
			eae	stx ₁	stx ₂	Acid resistance
C1	Milk	O26:H11	+	+	+	+
C2	Farm environment	O26:H11	+	+	+	+
C3	Camembert cheese	O26:H4	+	+	+	+

^a An RT-PCR assay tested for the *wzx* gene that encodes the somatic antigen O26 (16), *fliC* that encodes the flagellar antigen H11 (20), the *eae* gene that encodes the intimin adherence protein (13), and the *stx*₁ and *stx*₂ genes that encode Shiga toxins (47). +, the strain is able to use the glutamate-dependent system according to data described previously by Takada et al. (59).

Bacterial additives. The 3 bacterial strains used were heterofermentative and are known to produce lactic acid and other organic acids. The two bacterial strains *Propionibacterium* sp. strain R0410 and *Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788 were obtained from the Lallemand collection (Lallemand SAS, Blagnac, France). *L. buchneri* is already marketed as a silage additive. The third strain, *Leuconostoc mesenteroides* 6A1MLb4, was obtained from the Research Unit CALITYSS collection (VetAgro Sup, Lempdes, France) and was initially isolated from a sausage production factory. For long-term conservation, the isolates were stored at $\leq 80^{\circ}\text{C}$ in 30% glycerol.

Preparation of microbial inocula. Bacterial additives were grown in de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) broth (Biokar Diagnostic, Beauvais, France) for 24 h at 30°C (17). Bacteria were sedimented by centrifugation (3,000 \times g for 10 min), washed twice, and resuspended in tryptone salt (TS) broth (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Cells were adjusted to an optical density at 600 nm of 0.8 with Densimat (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) to achieve 1×10^7 CFU/g in the suspension. Strains were then diluted in TS broth to achieve 1×10^8 CFU/g at ensiling. The population of bacteria in the suspension was checked by spread plating onto MRS agar plates. *E. coli* strains were grown in 10 ml brain heart infusion (BHI) broth (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) by incubation at 37°C for 24 h. The same protocol was then followed in order to achieve 1×10^8 CFU/g in silage.

Bacterial treatments applied to the forage consisted of *Propionibacterium* sp. R0410, *Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788, *Leuconostoc mesenteroides* 6A1MLb4, and a mixture of equal amounts of each strain (mix). During the storage period, the four inocula (*Propionibacterium* sp., *L. buchneri*, *Leuconostoc mesenteroides*, and mix) were added to corn material at 1×10^8 CFU/g, and *E. coli* C1, C2, and C3 were inoculated independently at 1×10^8 CFU/g. In minisilos, only *Propionibacterium*, *L. buchneri*, and *Leuconostoc mesenteroides* additives at 1×10^8 CFU/g were applied onto the corn material at ensiling, and the same *E. coli* strains were then challenged independently at 1×10^8 CFU/g immediately after silo opening and after long-term aerobic exposure. The control consisted of bacterial additives and *E. coli* strains inoculated separately in silage previously treated with water. Concentrations of *E. coli* and bacterial additive populations in the final suspensions were checked by spread plating onto agar plates. A schematic protocol for the study is displayed in Fig. 1.

Silage processing. Whole plant corn was harvested at 40.7% dry matter (DM) with a 20-mm length of cut. Before the beginning of the work, the corn material was tested by using an RT-PCR assay for the potential presence of *E. coli* O26 (16). Minisilos were employed only for contamination at silo opening. Indeed, the number of silos needed to evaluate pathogen fate during the storage period was too important, and plastic bag silos were preferred.

For the first experiment of pathogen contamination at ensiling, 250 g of forage was distributed into a plastic box, and the bacterial inoculant was applied by manual spreading and mixed thoroughly by hand to ensure a good distribution of the inoculum. Each treatment was then divided into three parts and contaminated with *E. coli* strains C1, C2, and C3, respectively. A portion of 50 g of each treated forage was transferred into a 20- by 30-cm translucent airtight plastic bag (Boyauderie Dudos, Bourg en Bresse, France). Air in the bag silos was removed by use of a vacuum cleaner (Bower 42; Henkelmann, Murin and Fouillat, Fezin, France) at ≤ 81 kPa to obtain anaerobic conditions close to those of silage. Triplicate samples were ensiled for 0, 5, 8, 21, and 90 days at 20°C away from light, giving a total of 300 bag silos.

For the second experiment of *E. coli* contamination at opening, each additive was applied in triplicate onto 2 kg of forage by spraying 200 ml of the bacterial

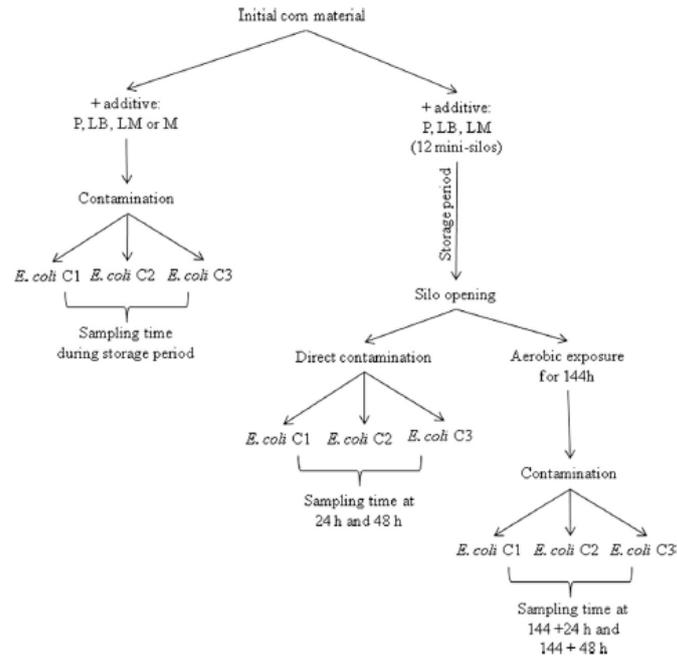


FIG. 1. Schematic protocol for the study. P, *Propionibacterium* sp. strain R0410; LB, *Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788; LM, *Leuconostoc mesenteroides* 6A1MLb4.

suspension onto a plastic sheet and mixed thoroughly by hand to ensure a good distribution. Forage was then manually compacted into a total of 12 cylindrical minisilos with a 2-kg capacity to achieve anaerobic conditions similar to those of silage. Polyvinyl chloride (PVC) tubes were equipped with a valve allowing gas evacuation. Minisilos were stored for 120 days at room temperature (20°C). At silo opening, moldy silage was removed from the minisilos. Approximately 500 g of silage was taken, mixed thoroughly, and used for immediate *E. coli* O26 contamination. The remaining forage in each silo (600 g) was left in the tube, covered with 2 layers of cheesecloth to avoid dehydration and allow aerobic exposure, and stored at 20°C for 144 h. Silage for immediate contamination was divided into three equal parts of 150 g each, transferred into a plastic bag, and contaminated with *E. coli* strains C1, C2, and C3, respectively. The bag silos were stored at room temperature, and silage pH and *E. coli* counts were determined 24 h and 48 h after contamination. The same protocol was then applied to the rest of the silage, which was previously aerated for 144 h and gently mixed before contamination. As a result, silages previously treated with bacterial additives were subjected to *E. coli* contamination at two stages of aerobic exposure (immediately or after 144 h), and samplings were performed 24 h and 48 h after each contamination, as shown in Fig. 1.

Sampling, enumeration, and detection. For each sampling time, 25 g of silage was diluted (1:10) in sterile buffered peptone water (BPW) (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) in a sterile bag filter (BagSystem 400 ml Model[®]; Interscience, Saint Nom la Breteche, France) and homogenized for 30 s in a stomacher (Stomacher Mix1; AES Laboratory, Bruz, France). Further decimal dilutions were made with TS broth for the enumeration of *E. coli* O26 and bacterial additives. The concentration of *E. coli* O26 was determined by plating 10-fold serial dilutions onto ColiID agar (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) complemented with 0.05 mg/liter of cefixime and 2.5 mg/liter of potassium tellurite (CT) (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), and the colonies were incubated for 24 h at 37°C. Violet colonies were identified as *E. coli* O26 and were confirmed by RT-PCR. Total LAB were enumerated on MRS plates incubated at 30°C for 48 h. Microbial analyses were performed by using spiral plating (WASP spiral plating; AES Laboratory, Bruz, France), and the enumeration of the colonies was carried

out with an EC2 Easy Count 2 automatic colony counter (AES Laboratory, Bruz, France). When no colony was isolated from the silages, the detection of *E. coli* O26 was undertaken after an enrichment step for 24 h at 37°C in order to check for the presence or absence of the target bacteria in the forage. More precisely, 1 ml of the enrichment bag was sampled, immunomagnetic separation (IMS) was performed manually as recommended by the manufacturer (Dynabeads; Invitrogen, Cergy Pontoise, France), and the sample was plated onto Sorbitol MacConkey (SMAC) agar (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). After 24 h of incubation at 37°C, presumptive *E. coli* O26 colonies were confirmed by RT-PCR. In parallel, bacterial genomic DNA was extracted from 1 ml enrichment broth with EZ1 Automate according to the manufacturer's recommendations (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), and RT-PCR was performed on O26 somatic antigen.

Physicochemical analysis. The dry matter (DM) content of silage samples was determined by drying 10 g for 24 h at 105°C according to a protocol described previously by Bach et al. (4). The determination of the pH was performed directly by use of a pH meter (WTW; pH330, Weilheim, Germany) at each sampling time. The D,L-lactate concentration was determined on 25 g of the negative-control silages by using capillary electrophoresis, and volatile fatty acid (VFA) profiles were obtained by gas chromatography (analyzed by Lareal, France). Two hundred grams previously removed at the opening of each minisilo was analyzed by Inzo (France) for minerals, nutritional values, and organic acid production.

Statistical analysis. During the ensiling period, an analysis of variance (ANOVA) using the factor "silage additives" with 5 modalities (*L. buchneri*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Propionibacterium*, mix, and water) was used to determine significant differences in LAB cell counts at day 90, depending on the additive employed. The same test with only 4 modalities (*L. buchneri*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Propionibacterium*, and water) was used for LAB cell counts 48 h after contamination at opening or after aerobic exposure. The hypothesis of a significant difference depending on the additives used was also tested with the results of the physicochemical parameters of silages at opening. Statistical analyses were performed with R software (50). A statistically significant difference was defined by a P value of less than 5%. When appropriate, average pH values,

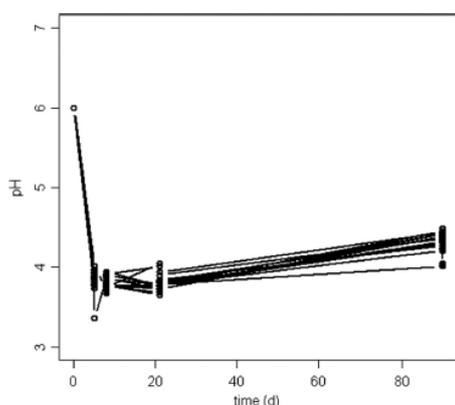


FIG. 2. Evolution of pH values in all bag silos during the storage period (90 days).

LAB counts, or physicochemical parameter results were indicated by the SD (standard deviation).

RESULTS

No *E. coli* O26 was detected before the challenge in the corn material; indeed, no violet colony appeared on ColiID agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), and the RT-PCR detection of O26 somatic antigen (17) in the enrichment broth of the initial corn material was negative.

Silages contaminated at ensiling. (i) Physicochemical changes. Figure 2 shows the pH changes in all bag silos during storage (90 days). Their patterns were similar for all silages. Initially, the pH value of the corn material was 6.0. At the beginning of fermentation, the pH dramatically decreased to very low values and dropped below 4.0 at day 5. Afterwards, the pH increased slightly from 3.85 (SD \pm 0.1) at day 5 to 4.33 (SD \pm 0.1) at day 90. In negative-control silages, the lactic acid concentration showed changes corresponding to pH values: a sharp rise was observed from 4.5 g/kg of DM in the initial silage to 46.28 g/kg of DM on day 21. A very slight decrease during the last part of the storage period was then noticed, and the lactic acid concentration reached 41.35 g/kg of DM on day 90. Volatile fatty acid (VFA) profiles showed the same evolution. Acetic acid was produced with a peak of 11.83 g/kg of DM at 21 days postensiling, and the final concentration was 10.7 g/kg of DM on day 90. The other VFAs analyzed, i.e., propionic acid, butyric and isobutyric acids, and valeric and isovaleric acids, were below the detection level (\leq 0.1 g/kg) during the storage period.

The evolution of DM in all the bag silos changed in the same way and showed a slight decrease during storage. The level of DM was 40.7% for the corn material before ensiling and finally reached 37.7% (SD \pm 2.27%).

(ii) Total LAB population changes. Total LAB concentrations were comparable between samples and rose from 7.26 \log_{10} CFU/g (SD \pm 6.97 \log_{10} CFU/g) to 8.40 \log_{10} CFU/g

(SD \pm 7.89 \log_{10} CFU/g) in 8 days. The concentrations decreased slightly afterwards. The LAB concentrations in silages inoculated with *Propionibacterium* sp., *L. buchneri*, and *Leuconostoc mesenteroides* were close to those found in silages containing endogenous LAB during the ensiled period. However, on day 90, LAB counts were higher for some silages, but no significant difference was observed between silages with and those without bacterial inoculants ($P > 0.05$).

(iii) *E. coli* O26 population changes. Counts and detection of *E. coli* O26 in the all bag silos were performed on days 0, 5, 8, 21, and 90 after ensiling (Table 2). Between day 0 and day 5, an important decrease in the O26 load was observed for all silages, and most of the *E. coli* counts were below the detection level (\leq 100 CFU/g of silage). On day 5, no culturable *E. coli* O26 cells were detected, but the somatic antigen O26 was amplified by RT-PCR in all of the samples, except for strain C3, in bag silos inoculated with *L. buchneri* where no signal was detected. At 8 days postensiling, no specific trend of *E. coli* survival could be pointed out, except for *E. coli* C1, C2, and C3 coinoculated with the mixture, which were still detectable. On day 21, *E. coli* O26 was no longer found in silage, and all enrichments were negative for the RT-PCR detection of the somatic antigen O26. The same results were observed at the end of the storage period (day 90). No trend could be observed for the changes in the three *E. coli* O26 strains during the storage period of corn silage regardless of the additive considered (*Propionibacterium* sp., *L. buchneri*, *Leuconostoc mesenteroides*, or mixture).

Silages contaminated at opening. (i) Physicochemical results. At opening, the pH value for all silos was 4.43 (SD \pm 0.1) and remained stable during 48 h. Nutritional and nutritive analyses did not show important changes between the different silos (Table 3). Significant differences could be observed for the production of acetic acid in silos, which was found in lower

TABLE 2. *E. coli* O26 counts and detection in different silages on days 0, 5, 8, 21, and 90 after ensiling (n = 3)^a

Silage	Inoculum at day 0	No. of positive signals detected/total no. of trials performed on day:			
		5	8	21	90
C1	2.57E ⁻⁰⁴	2/3	3/3	0/3	0/3
C2	2.04E ⁻⁰⁴	1/3	2/3	0/3	0/3
C3	4.17E ⁻⁰⁴	3/3	0/3	0/3	0/3
C1 \pm <i>Propionibacterium</i>	7.33E ⁻⁰⁴	3/3	0/3	0/3	0/3
C1 \pm <i>L. buchneri</i>	1.80E ⁻⁰⁵	3/3	1/3	0/3	0/3
C1 \pm <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.43E ⁻⁰⁵	2/3	0/3	0/3	0/3
C1 \pm mix	5.28E ⁻⁰⁵	3/3	3/3	0/3	0/3
C2 \pm <i>Propionibacterium</i>	1.83E ⁻⁰⁵	2/3	0/3	0/3	0/3
C2 \pm <i>L. buchneri</i>	2.27E ⁻⁰⁵	3/3	0/3	0/3	0/3
C2 \pm <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2.07E ⁻⁰⁵	3/3	1/3	0/3	0/3
C2 \pm mix	4.00E ⁻⁰⁵	3/3	1/3	0/3	0/3
C3 \pm <i>Propionibacterium</i>	1.70E ⁻⁰⁵	1/3	1/3	0/3	0/3
C3 \pm <i>L. buchneri</i>	4.95E ⁻⁰⁵	0/3	0/3	0/3	0/3
C3 \pm <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2.33E ⁻⁰⁵	1/3	0/3	0/3	0/3
C3 \pm mix	7.36E ⁻⁰⁵	1/3	3/3	0/3	0/3

^a Detection of *E. coli* O26 cells was performed after enrichment using RT-PCR on the O26 antigen.

TABLE 3. Comparison of nutritive and nutritional values of silage minisilos (n = 27) and reference values from corn silage under very good conditions of vegetation^a

Parameter	Value	
	Minisilos	Reference corn silage
Mean DOMD (%) \pm SD	75.18 \pm 0.3	□ 74
Mean protein concn (g/100 g) \pm SD	7.29 \pm 0.1	□ 7
Mean lactic acid concn (g/kg) \pm SD	52.88 \pm 5.38	□ 47
Mean acetic acid concn (g/kg) \pm SD	11.1 \pm 3.96	□ 11
Butyric acid concn (g/kg)	□ 0.05	0
Propionic acid concn (g/kg)	□ 0.05	0

^a See reference 34. DOMD, digestible organic matter in DM in vitro.

quantities for silos inoculated with *L. buchneri* than others ($P \leq 0.05$). Other indicators were not significantly different. In minisilos, the DM content was about 39.32% (SD \pm 0.94%), the starch content was 40.38% (SD \pm 1.14%), and the content of DM and cellulose was 16.54% (SD \pm 0.5%).

After 144 h of aerobic exposure, the pH values in most of the silos showed an important increase and were about 7.16 (SD \pm 1.16). The silage pH slightly decreased to pH 6.92 (SD \pm 0.84) at 144 h plus 24 h and finally reached pH 6.77 (SD \pm 0.84) at 144 h plus 48 h. The DM contents were similar in every silo and showed an increase during the 144-h aerobic period to finally reach 50.9% (SD \pm 0.73%).

(ii) Direct contamination at opening. Total LAB populations had the same behaviors between the samples. The populations ranged from 8.98×10^5 to 3.6×10^6 CFU/g at opening and evolved between 7.4×10^5 and 2.4×10^7 CFU/g during 48 h. Total LAB populations in silages treated with *Leuconostoc mesenteroides* and *Propionibacterium* contaminated with *E. coli* C2 showed a slight decrease in populations. The same results were observed for positive-control silos contaminated with *E. coli* C3. Other silos showed an increase in the total LAB load. As observed during ensiling, no significant differences at 48 h after contamination were found between silages inoculated with bacterial additives and silages with endogenous LAB ($P \leq 0.05$). Twenty-four hours after contamination, most of the *E. coli* counts were below the detection level of 100 CFU/g of silage, but strains were still detected by RT-PCR after enrichment (Table 4). Forty-eight hours after contamination, *E. coli* O26

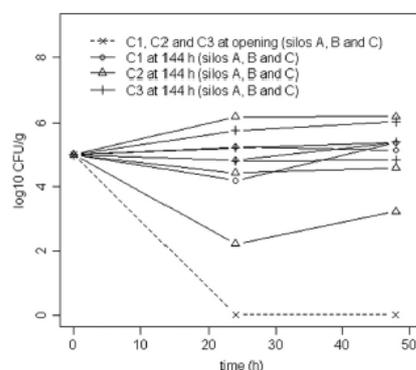


FIG. 3. Comparison of *E. coli* evolutions in *Leuconostoc mesenteroides*-treated silage immediately after opening or after 144 h of aerobic exposure for *E. coli* C1, C2, and C3 in independent silos A, B, and C.

was less frequently detected. In *Leuconostoc mesenteroides*-treated silages, *E. coli* strains C1, C2, and C3 were not detectable in any of the 3 repeats. The other additives did not show the same effect on *E. coli* survival.

(iii) Contamination after 144 h of aerobic exposure. The evolutions of total LAB after 144 h of aerobic exposure were similar between silages and compared to LAB evolution at opening. The populations ranged from 1×10^6 CFU/g to 1×10^8 CFU/g after aerobic exposure and remained stable until 144 plus 48 h without any significant difference 48 h after contamination ($P \leq 0.05$). Enumerations of C1, C2, and C3 were carried out during the 48 h of sampling after aerobic exposure. No differences could be found between the different treatments, and the pathogen was enumerated at a concentration ranging between 1.67×10^2 CFU/g and 6.02×10^6 CFU/g of silage. A comparison of the evolutions of the 3 *E. coli* strains in *Leuconostoc mesenteroides*-treated silage contaminated either at opening or after 144 h of aerobic exposure is shown in Fig. 3. In one trial of the silage previously treated with the LAB *L. buchneri*, *E. coli* growth was observed.

TABLE 4. Enumeration and detection of *E. coli* O26 in minisilos 24 and 48 h after contamination at opening (n = 3)^a

Sampling time (h)	Sample	Concn of <i>E. coli</i> (log ₁₀ CFU/g) or detection by RT-PCR								
		C1			C2			C3		
		Silo A	Silo B	Silo C	Silo A	Silo B	Silo C	Silo A	Silo B	Silo C
24	Water	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	<i>Propionibacterium</i>	o	o	o	o	o	o	5.72	o	o
	<i>L. buchneri</i>	o	o	o	o	o	o	4.56	1	o
48	Water	Δ	Δ	o	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
	<i>Propionibacterium</i>	Δ	Δ	Δ	o	Δ	Δ	o	Δ	4.54
	<i>L. buchneri</i>	Δ	o	o	o	o	o	4.23	1.83	o

^a Detection of *E. coli* O26 cells was performed after enrichment using RT-PCR on the O26 antigen. o, a positive signal was detected; Δ, no signal was detected.

DISCUSSION

Silages could be contaminated by several pathogenic microorganisms and more precisely by pathogenic *E. coli* through manure or irrigation water (64). Hazard analysis and critical control points (HACCP) and good manufacturing practices (GMP) should be applied to forage crops and feeds (64). The cleaning of equipment would clearly reduce contamination, but another possible on-farm critical control point is to minimize the establishment of pathogenic *E. coli* in silage in order to limit *E. coli* contamination of animal feedstuffs, which can represent a first step in the human food chain. According to GMP, a delay of at least 4 weeks between manure spreading and harvesting should be applied in order to limit the presence of butyric bacteria in silage. This preventive measure could also be applied for limiting the presence of *E. coli*. Although the elimination of *E. coli* or *E. coli* O157 during the storage period in corn and grass silage was demonstrated previously in other studies (4, 8, 12, 49), only Pedroso et al. investigated the fate of *E. coli* O157:H7 in silage during the unloading phase (49), as this serotype was the one most frequently associated with outbreaks. Strains of other serogroups, and especially O26, have been increasingly linked to diarrheal disease, but no information regarding the survival and behavior of pathogenic *E. coli* strains belonging to O26 or other serogroups was available at the time. Our study aimed to evaluate the fate of *Escherichia coli* O26 in corn silages and the potential of three bacterial additives to control pathogen development. In the first part of this study, an experiment was conducted where contamination occurred at ensiling. In the second part, experimental contamination was performed after silo opening, at two stages of aerobic exposure.

The ensiling process is based on lactic acid fermentation due to epiphytic LAB on whole plant corn. The addition of bacterial inoculants to silage is intended to ensure a faster accumulation of organic acids during the ensiling period. The main organic acid produced by epiphytic LAB or silage additives is lactic acid, which is responsible for strong pH decreases. Filya et al. showed previously that lactic acid could be used as a substrate by lactate-assimilating yeasts in the case of insufficient anaerobiosis resulting in silage spoilage (25). Short-chain aliphatic acids, such as acetic acid, are proven inhibitors of the growth of yeasts and molds in silage (2, 18, 24). Propionic acid is produced from lactic acid. On the other hand, the detection of butyric acid in silage is a sign of fermentation due to undesirable microorganisms and should absolutely be avoided. The three bacterial additives tested in the present study were known to carry out heterofermentative metabolism. *Lactobacillus buchneri*, which is recognized as a very efficient microbial additive to improve aerobic stability (19), and *Propionibacterium* sp., which ferments sugars and lactate to acetate and propionate (31), present common metabolic pathways. *Leuconostoc mesenteroides* can also produce lactate, acetate, ethanol, and diacetyl, which are considered antimicrobial metabolites (54). The strains were chosen because we demonstrated their ability to inhibit most STEC growth when coincubated in vitro in a mix of MRS and BHI agar neutral medium. Two hundred sixty-nine bacterial strains were screened according to a protocol described previously by Tagg and McGiven (58; data not shown), and the 3 most inhibiting strains were chosen

to be challenged in corn silage, although some of them are not usually considered common silage additives.

The three strains of *E. coli* tested in this study (originating from the environment and dairy products) belonged to the O26 serogroup, which is more and more frequently associated with STEC infections in humans (9) and is commonly found in cattle populations (36). Although the strains used were stx negative, all of them possess the *eae* gene coding for the intimin adherence protein, and strains C1 and C2 possess the *fliC* gene coding for the flagellar antigen H11. These strains are considered pathogenic, more precisely AEEC (attaching and effacing *E. coli*) strains (1), and therefore represent a major concern. These strains of *E. coli* were also chosen for their increased resistance to LAB inhibition when coinoculated in vitro according to previous screening results (data not shown). The *E. coli* inoculum level used (1×10^5 CFU/g) is voluntarily high compared with that of natural contamination in order to clearly visualize a decrease in the pathogen numbers during the experiment.

When STEC contamination occurred at ensiling, the results showed that 1×10^5 CFU/g of *E. coli* O26 was eliminated from corn silage at 5 days postensiling. This fact could be linked to pH evolution. The decrease of the pH was due to the production of various organic acids by LAB populations (2). Undissociated organic acids are able to pass through the bacterial membrane and could lead to cellular death (32, 52). Lactic acid, which is most effective at inhibiting pathogenic *E. coli* growth in vitro (7), is the main acid produced in silage (2). Possible changes in *E. coli* membrane integrity or in composition during ensiling may be too damaging to allow cell survival. Strains tested in the present study possess the *rpoS* gene, which is known to control several stress-related genes, such as acid stress genes (5, 14) and the glutamate-dependent acid resistance system. However, *E. coli* cell numbers decreased markedly during ensiling. This could be explained by the rapid pH decrease. The slight increase of the pH observed at the end of ensiling for all bag silos was due to the development of heterofermentative microorganisms, which transform lactic acid into weaker acids such as VFAs. The concentrations of VFAs and pH values obtained during the storage period were characteristic of a good ensiling process: the level of lactic acid was around 47 g/kg of DM, the level of acetic acid was 11 g/kg of DM, no butyric or isobutyric acid was detected, and the pH was close to 4 (2, 34). The final pH remained low until the end of the storage period and did not result in *E. coli* survival. Besides, negative results for O26 antigen detection by RT-PCR after the enrichment step suggest that *E. coli* O26 cells were not in a viable but nonculturable (VBNC) state but were completely eliminated from the silage on day 21. The corn material used was initially at 40.7% DM, which corresponds to the ultimate maturity step for corn ensiling. The addition of bacterial inoculants by spraying may result in a lower DM value at ensiling. The small fluctuations of the DM level observed in this study are characteristic of good silage preservation, as it implies few losses of water-soluble carbohydrates (WSCs), nitrogen, minerals, and inoculants, which could be carried away by effluents (2).

Although anaerobiosis is one of the most important conditions for silage preservation, allowing an earlier start of LAB fermentation (2), forage quality is also a result of other mech-

anisms, such as a lowering of the oxidoreduction potential and competition for nutrients (33). These microbial and physicochemical changes could be considered a barrier effect. In the present study, the use of the bacterial additives separately or in combination showed no evidence of improved efficiency against *E. coli* O26 survival during ensiling compared to silages without bacterial inoculants. Besides, when coinoculated with the mixture of LAB, *E. coli* C1, C2, and C3 were detectable until 8 days, which indicates that no synergistic effect of the three additives tested against *E. coli* O26 growth in silage could be observed and even that competition between strains may exist. It is possible that differences in efficiency would have been observed with samples obtained earlier (during the first 5 days postensiling). It may also be possible that antimicrobials that can be produced by bacterial additives, such as bacteriocins, hydrogen peroxide, ethanol, and diacetyl (26), have a very limited effect due to the complexity of the silage environment (no diffusion or dilution effect of the substance produced). The quantity of inoculant applied (1×10^6 viable cells per gram) is often considered sufficient for the bacterial additives to overwhelm the epiphytic LAB and become the predominant population in the silage (27). According to statistical analysis, LAB population changes in negative-control or inoculated silages were similar. During ensiling, the total LAB population increased in all silages due to the fermentation process, and it then slightly decreased once the pH of stability (pH 4) was reached, as usually observed for silages (19). However, data on the long-term establishment of the studied additives were not available, and it was proved previously that the effects of bacterial inoculants could differ depending on the harvesting location (57) and the potential presence of bacteriophages (44). The *L. buchneri* inoculant did show a more pronounced antimicrobial effect against *E. coli* C3, which was no longer detected at 5 days postensiling, than against C1 and C2. This finding underlines the fact that the inhibition of *E. coli* growth and survival is definitely strain dependent.

At minisilo opening, forage nutritional values were representative of a very good silage quality for dairy cows or bovines (34). The most important physicochemical parameter for the evaluation of silage quality is a pH below 5, which was observed for all the silos. All indicators were characteristic of good silage conservation whatever the treatment. The silage quality was especially confirmed by the proportion of fermentation products at the end of the storage period (2, 34). No significant difference in silage quality and acids produced was observed depending on the fermentative profiles of the 3 additives. Contrary to results reported by other studies (39, 40, 66), the silos inoculated with *L. buchneri* were not those with the highest level of production of acetic acid. However, a direct comparison could not be made due to differences in the bacterial species compared. *L. buchneri*-treated silos showed higher propionic acid concentrations than those in other silos. It may be possible that the fermentative metabolism of *L. buchneri* was orientated from acetic acid production toward other compounds, such as short-chain aliphatic acids (propionic acid) or methyl propylene glycol. The level of acetic acid in the different silages was characteristic of good processing, but no difference existed between organic acids due to endogenous or selected-additive fermentation.

The results for silages at opening showed that silos charac-

terized by a low pH prevented *E. coli* O26 establishment and survival in corn silage contaminated by 1×10^5 CFU of the pathogen per gram of silage but did not lead to a complete eradication of the pathogen. These results were observed during the 48 h after opening without a significant difference in pathogen counts between the inoculants *L. buchneri* and *Propionibacterium* sp. compared to the negative control. LAB strain *Leuconostoc mesenteroides* is the only bacterial inoculant that showed an effective protective effect against *E. coli* survival when contamination occurred at opening. Indeed, pathogens were not detected in these enrichment broths by RT-PCR 48 h after silage contamination, suggesting that the 3 *E. coli* O26 strains were not in a VBNC state but were completely eliminated from the silage. *Leuconostoc mesenteroides* may produce some antimicrobial compounds which could prevent the establishment of pathogenic *E. coli* in silage, such as organic acids and bacteriocins. It may also produce some VFAs not analyzed conventionally in silage, such as valeric acid or isobutyric acid, and thus may not have been tracked in these minisilos. Besides, corn contains phenolic compounds such as ferulic acid and *p*-coumaric acid, which are antimicrobial components naturally found in plants (45). Phenolic compounds have been shown to severely alter *E. coli* O157:H7 and *E. coli* O111 cells (56, 61). The *Leuconostoc mesenteroides* strain may have made these substances available to damage *E. coli* strains. More studies are now required to identify the inhibition mechanisms of *Leuconostoc mesenteroides*.

The potential inhibitory effect of bacterial additives, through nutritional competition or the production of antimicrobial substances, depends on the strain of the bacterial additive but can also be different according to the target strain. For example, strain C3 was enumerated between $1 \log_{10}$ CFU/g and $5.72 \log_{10}$ CFU/g in silos contaminated at opening, compared to C1 and C2, which could be detected only after enrichment. The *E. coli* strains were surviving and growing only in silage showing a pH increase. Environmental conditions found in silages may be inadequate to induce the different resistance mechanisms of the strains tested, especially those involved in acid resistance. The fact that *E. coli* establishment seems to be linked to an increase in pH was confirmed by results obtained after 144 h of aerobic exposure. Indeed, the pathogen was found in all silos. Air had penetrated into the remaining forage, causing a development restart in the aerobic microorganisms initially present in corn silage and a pH increase. Indeed, yeasts and molds are known to consume lactic acid (31), which could explain the pH elevation from 4.43 ± 0.17 at silo opening to 7.16 ± 1.6 after long-term aerobic exposure. Aerobic exposure during 144 h could also lead to the elimination of potential volatile antimicrobial components involved in forage preservation.

The aeration of corn silage induced pathogenic *E. coli* O26 survival and growth in all the silos tested and thereby represents a risk for the dissemination of the pathogen in the animal reservoir. Pedroso et al. found similar results in the case of *E. coli* O157:H7 contamination at silo opening (49). Those authors also showed that the *Lactobacillus buchneri* additive could be useful to curtail the growth of *E. coli* O157:H7 after aerobic exposure but that it could not lead to the complete elimination of the pathogen. Appropriate unloading techniques are therefore essential to guarantee the nutritional qualities and microbial safety of cattle feed. It is noteworthy

that in our study, the 144-h air exposure led to a sharp degradation of the silage, which was visibly moldy and inedible for ruminants. These results confirm that the unloading face of silage should be renewed often to avoid the development of undesirable microorganisms such as molds or pathogenic *E. coli*.

In conclusion, this study showed that pathogenic *E. coli* O26 could be eliminated during storage in carefully ensiled corn mainly through the production of organic acids usually produced by endogenous LAB. In the case of contamination at silo opening, our results showed that *E. coli* O26 could be totally eradicated from *Leuconostoc mesenteroides* 6A1MLb4-treated silage during the feeding-out phase. However, no protective effect was pointed out after 144 h of aerobic exposure regardless of the bacterial additives tested. During ensiling, bacterial treatments did not significantly affect *E. coli* O26 elimination compared with the negative control, except for the LAB *L. buchneri*, which showed *E. coli* strain-dependent inhibition. The antimicrobial mechanisms of the LAB *Leuconostoc mesenteroides* and *L. buchneri* should now be studied in order to use this protective effect for other points of the food chain, and the inhibitory effect should be tested against other serogroups of pathogenic *E. coli*. Feedstuff safety control through the utilization of bacterial inoculants could limit the entry of pathogenic *E. coli* into the epidemiological cycle, but special care should always be taken with good manufacturing practices and proper silage processing.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by the research program 2010-240 no. 19389 from the Ministère Français de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité, et de l'Aménagement du Territoire.

REFERENCES

- AFSSA. 2010. Avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis AFSSA du 15 juillet 2008. AFSSA Saisine no. 2010-SA-0031. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Paris, France.
- AFSSA. 2004. Bonnes pratiques de fabrication de l'ensilage pour une meilleure maîtrise des risques sanitaires. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Paris, France.
- Avery, S., L. Walters, and M. Hutchison. 2005. Fate of *Escherichia coli* O157 and detection of stx phage during fermentation of maize, an animal feedstuff. *Lett. Appl. Microbiol.* 40:99–105.
- Bach, S. J., et al. 2002. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in barley silage: effect of a bacterial inoculant. *J. Appl. Microbiol.* 93:288–294.
- Bhagwat, A. A., et al. 2005. Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains based on acid resistance phenotypes. *Infect. Immun.* 73:4993–5003.
- Bielaszewska, M., et al. 2007. Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome: time to change the diagnostic paradigm? *PLoS One* 2:e1024.
- Buchanan, R. L., and S. G. Edelson. 1999. pH-dependent stationary-phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. *J. Food Prot.* 62:211–218.
- Byrne, C. M., et al. 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during silage fermentation. *J. Food Prot.* 65:1854–1860.
- Caprioli, A., A. E. Tozzi, G. Rizzoni, and H. Karch. 1997. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 3:578–579.
- Castanie-Cornet, M. P., T. A. Penfound, D. Smith, J. F. Elliott, and J. W. Foster. 1999. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181:3525–3535.
- Chapman, P. A., et al. 1993. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiol. Infect.* 111:439–447.
- Chen, Y., S. Seda, M. Gamburg, R. Pinto, and Z. G. Weinberg. 2005. Fate of *Escherichia coli* during ensiling of wheat and corn. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5163–5170.
- China, B., E. Jacquemin, A.-C. Devrin, V. Pirson, and J. Mainil. 1999. Heterogeneity of the *eae* genes in attaching/effacing *Escherichia coli* from cattle: comparison with human strains. *Res. Microbiol.* 150:323–332.
- Coldewey, S. M., et al. 2007. Impact of the *rpoS* genotype for acid resistance patterns of pathogenic and probiotic *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* 7:21.
- Davis, M. A., et al. 2003. Feedstuffs as a vehicle of cattle exposure to *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Vet. Microbiol.* 95:199–210.
- DebRoy, C., et al. 2004. Detection of *Escherichia coli* serogroups O26 and O113 by PCR amplification of the *wzx* and *wzy* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1830–1832.
- de Man, J. C., M. Rogosa, and M. E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* 23:130–135.
- Driehuis, F., and S. J. Oude Elferink. 2000. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *Vet. Q.* 22:212–216.
- Driehuis, F., S. J. Oude Elferink, and S. F. Spoelstra. 1999. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *J. Appl. Microbiol.* 87:583–594.
- Durso, L. M., J. L. Bono, and J. E. Keen. 2005. Molecular serotyping of *Escherichia coli* O26:H11. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4941–4944.
- Espié, E., F. Grimont, P. Mariani-Kurkdian, and V. Vaillant. 2005. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2005. Institut de Veille Sanitaire, Institut Pasteur, Paris, France.
- Fenlon, D. R., I. D. Ogden, A. Vinton, and I. Svoboda. 2000. The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 2000:149S–156S.
- Fenlon, D., and J. Wilson. 2000. Growth of *Escherichia coli* O157 in poorly fermented laboratory silage: a possible environmental dimension in the epidemiology of *E. coli* O157. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:118–121.
- Filya, I., E. Sucu, and A. Karabulut. 2006. The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of maize silage. *J. Appl. Microbiol.* 101:1216–1223.
- Filya, I., E. Sucu, and A. Karabulut. 2004. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. *J. Appl. Microbiol.* 97:818–826.
- Fuller, R., and G. R. Gibson. 1997. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 222:29–31.
- Gollop, N., V. Zakin, and Z. G. Weinberg. 2005. Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *J. Appl. Microbiol.* 98:662–666.
- Griffin, P. M., and R. V. Tauxe. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 13:60–98.
- Hancock, D., T. Besser, J. Lejeune, M. Davis, and D. Rice. 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *Int. J. Food Microbiol.* 66:71–78.
- Heuvelink, A. E., et al. 1998. Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. *J. Clin. Microbiol.* 36:3480–3487.
- Higginbotham, G., S. Mueller, K. Bolsen, and E. DePeters. 1998. Effects of inoculants containing propionic acid bacteria on fermentation and aerobic stability of corn silage. *J. Dairy Sci.* 81:2185–2192.
- Hirshfield, J. N., S. Terzulli, and C. O'Byrne. 2003. Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria. *Sci. Prog.* 86:245–269.
- Holzer, M., E. Mayrhuber, H. Danner, and R. Braun. 2003. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends Biotechnol.* 21:282–287.
- INRA. 2010. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux—valeurs des aliments. INRA, Paris, France.
- INVS. 2007. Epidémie d'infections à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines non O157 liée à la consommation de camembert au lait cru, Nord-Ouest de la France, Octobre-Décembre 2005. Rapport d'investigation rédigé par l'Institut de veille sanitaire, 2007. INVS, Paris, France.
- Jenkins, C., J. Evans, H. Chart, G. A. Willshaw, and G. Frankel. 2008. *Escherichia coli* serogroup O26—a new look at an old adversary. *J. Appl. Microbiol.* 104:14–25.
- Jokela, B., and M. Russell. 2003. Perennial forages benefit soils, other crops, and water quality in important ways. USDA Agricultural Research Service, Washington, DC.
- Karmali, M. A., V. Gannon, and J. M. Sargeant. 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet. Microbiol.* 140:360–370.
- Kristensen, N., et al. 2010. Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. *J. Dairy Sci.* 93:3764–3774.
- Kung, L., and N. Ranjit. 2001. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *J. Dairy Sci.* 84:1149–1155.
- Lin, J., I. S. Lee, J. Frey, J. L. Slonczewski, and J. W. Foster. 1995. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177:4097–4104.
- Lin, J., et al. 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3094–3100.
- Lynn, T. V., et al. 1998. The occurrence and replication of *Escherichia coli* in cattle feeds. *J. Dairy Sci.* 81:1102–1108.

44. Mäyrä-Mäkinen, A., and M. Bigrè. 1993. Lactic acid bacteria, p. 65–96. In S. Salminen and A. von Wright (ed.), *Industrial use and production of lactic acid bacteria*. Marcel Dekker Inc., New York, NY.
45. Mérida, H., et al. 2010. The phenolic profile of maize primary cell wall changes in cellulose-deficient cell cultures. *Phytochemistry* 71:1684–1689.
46. Oude Elferink, S. J., et al. 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:125–132.
47. Paton, A., and J. Paton. 1998. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO*₁₁₁, and *rfbO*₁₅₇. *J. Clin. Microbiol.* 36:598–602.
48. Pearce, M. C., et al. 2006. Prevalence and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, and O145 shed by cattle in Scotland. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:653–659.
49. Pedroso, A., A. Adesogan, O. Queiroz, and S. Williams. 2010. Control of *Escherichia coli* O157:H7 in corn silage with or without various inoculants: efficacy and mode of action. *J. Dairy Sci.* 93:1098–1104.
50. R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, 2011. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
51. Riemann, H. P., and D. O. Cliver. 1998. Microbial food borne pathogens. *Escherichia coli* O157:H7. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 14:41–48.
52. Roe, A. J., C. O'Byrne, D. McLaggan, and I. R. Booth. 2002. Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology* 148:2215–2222.
53. Rogerie, F., et al. 2001. Characterization of Shiga toxin producing *E. coli* and O157 serotype *E. coli* isolated in France from healthy domestic cattle. *Int. J. Food Microbiol.* 63:217–223.
54. Rouse, S., and D. van Sinderen. 2008. Bioprotective potential of lactic acid bacteria in malting and brewing. *J. Food Prot.* 71:1724–1733.
55. Rugbjerg, H., E. M. Nielsen, and J. S. Andersen. 2003. Risk factors associated with faecal shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in eight known-infected Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 58:101–113.
56. Santesteban-López, A., E. Palou, and A. López-Malo. 2007. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a(w) and pH. *J. Appl. Microbiol.* 102:486–497.
57. Schmidt, R. J., and L. Kung, Jr. 2010. The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silages made at different locations. *J. Dairy Sci.* 93:1616–1624.
58. Tagg, J., and A. McGiven. 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* 21:943.
59. Takada, A., G. Umitsuki, K. Nagai, and M. Wachi. 2007. RNase E is required for induction of the glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:158–164.
60. Tarr, P. I., C. A. Gordon, and W. L. Chandler. 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 365:1073–1086.
61. Venter, P., M. Abraham, J. F. R. Lues, and I. Ivanov. 2006. The influence of sanitizers on the lipopolysaccharide composition of *Escherichia coli* O111. *Int. J. Food Microbiol.* 111:221–227.
62. Wang, G., T. Zhao, and M. P. Doyle. 1996. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2567–2570.
63. Weinberg, Z. G., and G. Ashbell. 2003. Engineering aspects of ensiling. *Biochem. Eng. J.* 13:181–188.
64. Weinberg, Z. G., G. Ashbell, Y. Chen, M. Gamburg, and S. Sela. 2004. The effect of sewage irrigation on safety and hygiene of forage crops and silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 116:271–280.
65. Weinberg, Z., et al. 1995. The effect of a propionic-acid bacterial inoculant applied at ensiling, with or without lactic-acid bacteria, on the aerobic stability of pearl-millet and maize silages. *J. Appl. Bacteriol.* 78:430–436.
66. Weinberg, Z., et al. 2002. Ensiling whole-crop wheat and corn in large containers with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28:7–11.
67. Zimmerhackl, L.-B., et al. 2010. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26: H11-associated hemolytic uremic syndrome: bacteriology and clinical presentation. *Semin. Thromb. Hemost.* 36:586–593.

ANNEXE 7 : Poster n°2

“Pathogenic *E. coli* O26 survival in corn silage at two stages of contamination and protective effect of bacterial inoculants”.

Lysiane Dunière, Audrey Gleizal, Frédérique Chaucheyras-Durand, Isabelle Chevallier et Delphine Thévenot.

Poster présenté :

Au congrès international « Autumn Conference- Society for General Microbiology », du 5 au 7 Septembre 2011, University of York, UK.

Au congrès national « Ecosystèmes Microbiens et Bioprotection des Aliments », les 17 et 18 Novembre 2011, ONIRIS, site de la Géraudière, Nantes.



VetAgro Sup

PATHOGENIC *E. COLI* O26 SURVIVAL IN CORN SILAGE AT TWO STAGES OF CONTAMINATION AND PROTECTIVE EFFECT OF BACTERIAL INOCULANTS



LYSIANE DUNIERE¹, AUDREY GLEIZAL^{1,2}, FREDERIQUE CHAUCHEYRAS-DURAND^{3,4}, ISABELLE CHEVALLIER⁵ AND DELPHINE THEVENOT-SERGENTET^{1,2}, Université de Lyon, VetAgro Sup, Unité de Recherche CALITYSS, 69280 Marcy l'étoile, France¹, and Université de Lyon, VetAgro Sup, Laboratoire LMAP/LNR STEC, Université Lyon I, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France², and Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité de Microbiologie UR 454, Centre de Recherche de Clermont-Ferrand/Theix, 63122 Saint-Genès-Champagnelle, France³, and Lallemand Animal Nutrition, 19 rue des Briquetiers, 31702 Blagnac, France⁴ and Clermont Université VetAgro Sup, Unité de Recherche CALITYSS, 89 avenue de l'Europe, 63370 Lempdes, France⁵.

INTRODUCTION

Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) are responsible of severe human illness ranging from diarrhea to hemolytic and uremic syndrome (HUS). Ruminants are considered as the main STEC reservoir and silages have been recognized as possible vehicle for STEC spread. Lactic Acid Bacteria (LAB) are commonly used in silage preservation by decreasing pH through organic acids production. A previous study has shown O26 STEC were not able to survive appropriate silage processing but little is known about their fate in case of contamination at silo opening.

OBJECTIFS

- Evaluate the fate of STEC O26 in corn silage when contamination occurs at opening or after long term aerobic exposure.
- Evaluate the potential of three different bacterial inoculants to control pathogen development.

STRAINS

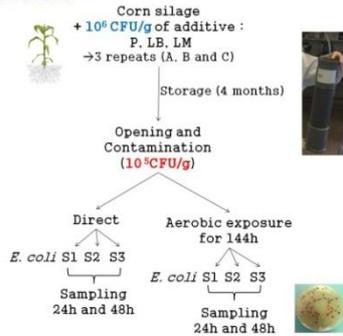
3 Bacterial Inoculants

- Propionibacterium* sp. (P)
- Leuconostoc mesenteroides* (LM)
- Lactobacillus buchneri* (LB)

3 *E. coli* strains

Strain	Origin	Serotype	eeae	stx1	stx2
S1	Milk	O26:H11	+	-	-
S2	Farm environment	O26:H11	+	-	-
S3	Cheese	O26:H-	+	-	-

PROTOCOL



RESULTS

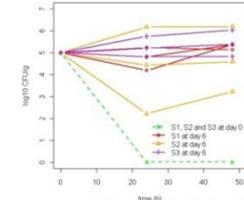
Contamination at silo opening

Sampling time	Sample/ <i>E. coli</i>	S1			S2			S3		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
24 h	Water	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	LM	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	P	+	+	+	+	+	+	5.72	+	+
	LB	+	+	+	+	+	+	4.56	1	+
48 h	Water	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	+	-	-	+	-	4.54
	LB	-	+	+	+	+	+	+	4.23	1.83

E. coli strains were never detected after enrichment in silage previously inoculated with LAB LM.

After long term aerobic exposure

E. coli strains were ranging from 10² CFU/g to 10⁶ CFU/g.



E. coli S1, S2 and S3 evolution (log₁₀ CFU/g) in silage previously inoculated with LAB LM at opening or after long term aerobic exposure (n=3)

CONCLUSION

- LM bacterial additive prevented survival of STEC strains inoculated in corn silage at silo opening.
- However no inoculants showed effective protective effect after long term aerobic exposure.

Feedstuffs safety control through utilization of LAB inoculants could limit entry of STEC into the epidemiological cycle but special care should be given to proper silage processing.

This study was supported by the research programme "2010-240 n°19389" from the Ministère Français de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du Territoire.

