

THÈSE

présentée

devant l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le

14 décembre 2007

par

Bastien Fremaux

**Écologie des *Escherichia coli* producteurs
de Shiga-toxines (STEC) dans les effluents
d'élevages bovins et le sol**

Directeur de thèse : Madame le Pr Christine Vernozzy-Rozand

Co-Directeur de thèse : Madame le Dr Claire Prigent-Combaret

JURY :

PRESIDENT : Monsieur Patrick Potier, Professeur Université Claude Bernard Lyon I (UCBL)

RAPPORTEUR : Monsieur Gilles Salvat, Directeur de l'AFSSA - Ploufragan

RAPPORTEUR : Madame Valérie Livrelli, Professeur – Faculté de Pharmacie Clermont-Fd

EXAMINATEUR : Madame Marie Cornu, Chargée de Recherche AFSSA – Maisons Alfort

EXAMINATEUR : Madame Christine Vernozzy-Rozand, Professeur - ENV Lyon

EXAMINATEUR : Madame Claire Prigent-Combaret, Chargée de Recherche CNRS – UCBL

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur J. LIETO

M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. COCHAT

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme. le Professeur S. FLECK

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur G. CLERC

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

REMERCIEMENTS

Y *Yesterday is history... tomorrow is mystery... and today is a gift... that's why it's called... present!*

Eleanor Roosevelt

A **Monsieur le Professeur Patrick Potier**, de l'Université Claude Bernard Lyon I, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse. Qu'il reçoive ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

A **Madame le Professeur Christine Vernozy-Rozand**, notre Directrice de thèse. Nous tenons à lui exprimer toute notre reconnaissance pour nous avoir permis de réaliser cette thèse au sein de son laboratoire, et pour avoir encadré ce travail de thèse avec autant d'enthousiasme et de disponibilité ainsi que pour ses nombreux conseils avisés. Nous sommes reconnaissants de la confiance qu'elle nous a accordée et des discussions enrichissantes que nous avons eues. Nous la remercions aussi pour son aide à la réalisation de ce rapport et nous tenons à lui assurer toute notre admiration et notre amitié.

A **Madame le Docteur Claire Prigent-Combaret**, notre co-Directrice de thèse. Nous tenons chaleureusement à la remercier pour son soutien permanent durant la thèse. Qu'elle reçoive toute l'expression de notre reconnaissance pour ses précieux conseils et ses compétences scientifiques qui nous ont permis de mener à bien ce projet. Nous la remercions aussi pour son aide à la réalisation de ce rapport et nous tenons à lui assurer toute notre admiration et notre amitié.

A **Madame le Professeur Valérie Livrelli**, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Clermont-Ferrand. 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.

A **Madame le Docteur Marie Simon-Cornu**, Chargée de recherche à l'AFSSA Maisons-Alfort. Nous la remercions d'avoir contribué à mener à bien ce projet en participant au comité

de pilotage et nous sommes reconnaissants de l'honneur et du plaisir qu'elle nous a fait en participant au jury de notre thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

A **Monsieur le Docteur Gilles Salvat**, Directeur de l'AFSSA Ploufragan / Brest, d'avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur. Nous sommes reconnaissants pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et nous tenons à lui exprimer à cet égard nos sincères remerciements.

Une thèse est le résultat d'un travail de longue haleine. C'est le fruit de multiples discussions au cours de diverses collaborations...

Mes sincères remerciements vont conjointement et tout particulièrement à **Christine V.-R.** et **Claire P.-C.** pour leur encadrement et leur soutien qui m'ont permis de mener à bien ce projet. Je tenais également à les remercier pour avoir initié ce travail, ainsi que **l'AFSSA Lyon** pour son soutien financier.

J'exprime ma plus grande gratitude et mes remerciements à **Marie-Laure Delignette-Muller**, pour m'avoir inculqué le goût des Biostatistiques avec autant de patience et de rigueur ainsi que pour sa participation au comité de pilotage et son aide précieuse tout au long de la thèse.

Je tiens à remercier **Marie-Pierre** et **Delphine** pour leurs conseils et les bons moments partagés autour d'un repas ou d'une tasse de café. Un merci particulier à **Marie-Pierre** pour pour m'avoir guidé à mon arrivée au laboratoire et pour tous ses précieux conseils qu'elle m'a prodigué. Tout cela avec beaucoup de patience, de sympathie et de gentillesse.

Certains des travaux présentés n'auraient probablement pas pu aboutir sans la collaboration de l'Équipe d'Écologie Microbienne UMR 5557 (CNRS, Lyon1) et de l'UMR Carrtel (INRA, Thonon-Les-Bains). Je remercie vivement le **Pr. Yvan Moëgne-Loccoz** et le **Dr. Lucille Jocteur-Montrozier** (UMR 5557) pour les nombreuses et enrichissantes discussions que nous avons eues durant ces 3 années, ainsi que pour leur soutien sur la mise en œuvre et la rédaction des travaux de thèse. Un grand merci au **Dr. Jean Marcel Dorioz**, au **Dr. Dominique Trevisan** et au **Dr. Philippe Quetin** (UMR Carrtel) pour leurs conseils précieux en hydrogéologie. Merci également aux thésards de l'Équipe d'Écologie Microbienne (UMR 5557) pour leur aide technique, leur disponibilité et tous les bons moments qu'on a pu

partager in « Montpel city » : **Joël, Mickael, Stéphanie, Olivier, Emelyne, Vincent, Martina**, et tous les autres...

Je tiens à remercier chaleureusement **Vincent Atrache** pour son soutien et pour tous les moments privilégiés que l'on a passés au congrès « VTEC 2006 » en Australie.

Une pensée émue pour toute l'équipe très conviviale de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle. J'adresse mes sincères remerciements à Christine V-R, Marie-Laure, Marie-Pierre, Ammara, Marie, Delphine, Christine B, Christine M-C et tous les stagiaires (Audrey, Mathieu, Benoît, Jean-Baptiste, Nina, Marion, Sarah, Julien, Aïmen, Alexia, Fabien, Stephane) pour m'avoir aidé et soutenu afin de mener à bien ce projet.

J'adresse mes plus sincères remerciements à mes amis **Antoine** et **Ammara** pour leur soutien permanent, leur bonne humeur et tous les fous rires et les moments fabuleux que l'on a partagés. Un grand, grand Merci☺ !

Une pensée particulière pour...

Mes **Parents**, sans qui, je n'en serai pas là aujourd'hui. Merci pour tout leur amour et leur soutien depuis toujours. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude.

Ma **Sœur, Mickael, mes nièces, Maigane et Alissone, et mon neveu, Gregory**, pour leur soutien et toute la complicité qui nous unit.

Ma fiancée **Sandra♥**, celle qui depuis des années partage ma vie, mes doutes et mes joies. Je te dédie ce mémoire en guise de remerciement et de reconnaissance pour ton soutien constant et ta présence à mes côtés.

Toute ma **Famille** et tous mes **Amis** qui me sont chers...

œ Un grand merci à tous pour ces moments privilégiés que l'on a pu partager durant cette aventure, et qui me laisseront des souvenirs impérissables œ

La science consiste à passer d'un étonnement à un autre...

Aristote

TABLE DES MATIÈRES

Page de titre.....	1
Université Claude Bernard Lyon 1	2
Remerciements.....	3
Table des matières.....	6
Liste des abréviations.....	13
Liste des illustrations.....	14

Introduction générale	17
------------------------------------	-----------

Mémoire bibliographique	20
--------------------------------------	-----------

PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS RELATIVES AUX *ESCHERICHIA COLI* **PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES (STEC)**

1. Classification taxonomique des STEC.....	21
1.1. Caractères généraux de l'espèce <i>E. coli</i>	21
1.2. Classification en pathotypes des <i>E. coli</i> responsables de troubles intestinaux	22
1.3. Origine évolutive des STEC.....	26
1.3.1. Origine des EHEC	26
1.3.2. Origine du clone O157:H7	28
2. Facteurs de virulence des STEC	29
2.1 Les Shiga-toxines	29
2.1.1. Structure des toxines Stx1 et Stx2.....	30
2.1.2. Variants <i>stx</i>	30
2.1.3. Mécanisme d'action des toxines Stx	31
2.1.4. Rôle des toxines Stx dans la physiopathologie	32
2.2. Les facteurs d'adhésion.....	34
2.2.1. Le système de sécrétion de type III.....	35

2.2.2. Autres facteurs majeurs d'adhésion	37
2.3. Autres facteurs plasmidiques de virulence.....	38
2.3.1 L'entérohémolysine.....	38
2.3.2 La protéase EspP	39
2.3.3 Autres facteurs.....	39
3. Pathologies humaines associées aux EHEC	39
3.1. La colite hémorragique.....	39
3.2. Le SHU.....	40
3.3. Le PTT.....	40
4. Epidémiologie humaine des STEC.....	41
4.1. Principaux modes de transmission	41
4.1.1. Transmission alimentaire	42
4.1.2. Transmission hydrique	43
4.1.3. Transmission inter-humaine.....	44
4.1.4. Transmission par le contact avec les animaux de ferme et leur environnement	44
4.2. Principales épidémies.....	44

DEUXIÈME PARTIE : PRÉVALENCE ET SURVIE DES STEC DANS LES ÉLEVAGES BOVINS

1. Dans les fèces des bovins	49
1.1. Données chiffrées du portage fécal bovin en STEC	49
1.2. Les facteurs de variation du portage sain en STEC	52
1.2.1. Influence du type d'alimentation.....	52
<i>a) Les vaches et/ou jeunes bovins</i>	<i>52</i>
<i>b) Les veaux au sevrage</i>	<i>53</i>
1.2.2. Les saisons.....	53
1.2.3. L'âge des bovins.....	54
1.2.4. Les conditions d'alimentation et d'abreuvement des animaux	54
1.2.5. Les conditions de logement des bovins.....	55
1.2.6. Le stress des bovins.....	55
1.2.7. L'introduction d'un animal extérieur au troupeau	56

1.3. Survie et croissance des STEC dans les fèces.....	56
2. Dans le lisier et le fumier d'origine bovine	57
2.1 Prévalence des STEC dans le lisier et le fumier de bovins	58
2.2 Survie des STEC dans le lisier et le fumier de bovins	58
2.2.1. Dans le lisier.....	58
2.2.2. Dans le fumier	59
3. Dissémination et survie des STEC au sein des exploitations bovines	60
3.1. Prévalence et diversité des supports contaminés par les STEC	60
3.2. Survie des STEC dans l'environnement de la ferme.....	61

TROISIÈME PARTIE : SURVIE ET TRANSFERT DES STEC DANS LES COMPARTIMENTS ENVIRONNEMENTAUX : LE SOL, L'EAU ET LES VÉGÉTAUX

1. Survie des STEC dans l'environnement.....	63
1.1 Survie des STEC dans le sol	63
1.2 Facteurs affectant la survie des STEC dans le sol.....	65
1.2.1. La texture et la structure du sol	65
1.2.2. Les propriétés physico-chimiques du sol	66
<i>a) Le taux d'humidité</i>	<i>66</i>
<i>b) Le pH.....</i>	<i>67</i>
1.2.3. L'apport d'éléments nutritifs.....	67
1.2.4. Les conditions climatiques	67
1.2.5. Les interactions microbiennes.....	68
<i>a) La compétition et l'antagonisme.....</i>	<i>68</i>
<i>b) La prédation.....</i>	<i>69</i>
1.3 Survie des STEC dans l'eau	69
1.3.1. Dans les eaux d'abreuvoir	69
1.3.2. Dans les eaux de surface et l'eau potable.....	70
<i>a) Dans l'eau de mer</i>	<i>70</i>
<i>b) Dans l'eau des cours d'eau, lacs et réservoirs d'eau potable</i>	<i>70</i>
<i>c) Dans l'eau commercialisée en bouteille</i>	<i>71</i>

1.4 Survie, adhérence et internalisation des STEC dans les végétaux	71
1.4.1. Survie des STEC sur les végétaux.....	71
1.4.2. Adhérence des STEC sur les tissus des végétaux	72
1.4.3. Internalisation des STEC dans les végétaux	75
2. Transfert des STEC dans l'environnement	77
2.1 Transfert vertical des STEC dans le sol à partir d'effluents d'élevages	77
2.1.1. Les événements de pluies	78
2.1.2. La porosité du sol	79
2.1.3. Le taux de matière organique	79
2.2 Transfert des STEC dans l'eau à partir des sols contaminés.....	79
2.3 Transfert potentiel des STEC vers les cultures de végétaux	80
2.3.1. L'eau d'irrigation	81
2.3.2. Le sol amendé par des effluents	82
2.3.3. La faune.....	82

QUATRIÈME PARTIE : MAÎTRISE DE LA DISSÉMINATION DES STEC DANS L'ENVIRONNEMENT

1. Limitation du portage bovin en STEC	84
1.1 Pratiques d'élevages adaptées	84
1.2 Stratégies d'inhibition des STEC	85
1.2.1. Utilisation des bactériophages.....	85
1.2.2. Utilisation de composés antimicrobiens.....	86
1.2.3. La vaccination	87
1.3 Stratégies d'exclusion des STEC	87
1.3.1. Type d'alimentation	87
1.3.2. Utilisation de probiotiques	87
2. Gestion raisonnée des effluents d'élevages bovins contaminés par les STEC	89
2.1. Les données chiffrées de la production en France et le cadre réglementaire	89
2.2. Traitement des effluents d'élevages	91
2.2.1. Traitements biologiques	91
<i>a) Digestion aérobie.....</i>	<i>91</i>

b) Digestion en anaérobiose	93
2.2.2. Traitements chimiques	94
Conclusion du mémoire bibliographique	96

Mémoire expérimental	97
-----------------------------------	-----------

**PREMIÈRE PARTIE : DISSÉMINATION ET PERSISTANCE DES STEC DANS
LES EXPLOITATIONS LAITIÈRES EN FRANCE**

<i>Présentation de la Publication n°1</i>	<i>99</i>
1. Contexte et objectif de l'étude	99
2. Matériels et méthodes	99
3. Résultats et discussion	100
4. Conclusion	101
Publication n°1	102

**DEUXIÈME PARTIE : SURVIE DES STEC NON-O157 DANS LES EFFLUENTS
D'ÉLEVAGES BOVINS**

<i>Présentation des Publications n°2 et 3</i>	<i>115</i>
1. Contexte et objectifs de ces études	115
2. Matériels et méthodes	115
2.1. Etude n°1 : survie des STEC dans le fumier	115
2.2. Etude n°2 : survie des STEC dans le lisier	117
3. Résultats et discussion	118
3.1. Etude n°1 : survie des STEC dans le fumier	118
3.2. Etude n°2 : survie des STEC dans le lisier	120
4. Conclusion	120
Publication n°2	122
Publication n°3	133

TROISIÈME PARTIE : SURVIE DES STEC O26 DANS DIFFÉRENTS TYPES DE SOLS FERTILISÉS AVEC DU FUMIER BOVIN EN CONDITIONS *IN VITRO*

<i>Présentation de la Publication n°4</i>	141
1. Contexte et objectifs de cette étude	141
2. Matériels et méthodes	141
3. Résultats et discussion	142
4. Conclusion	144
Publication n°4	145

QUATRIÈME PARTIE : ÉCOLOGIE DES STEC DANS UN BASSIN VERSANT PÂTURÉ PAR DES RUMINANTS

<i>Présentation de la Publication n°5</i>	155
1. Contexte et objectifs de cette étude	155
2. Matériels et méthodes	156
3. Résultats et discussion	157
3.1. Prévalence des gènes <i>stx</i> et dénombrement des STEC dans les bouses, le sol et l'eau	157
3.2. Caractéristiques génotypiques et phénotypiques des isolats STEC	157
3.3. Persistance et transfert des STEC	158
4. Conclusion	159
Publication n°5	160

CINQUIÈME PARTIE : ÉTUDE DE L'EFFET D'UN COMPOSÉ ANTIMICROBIEN, LE 2,4 DIACETYLPHELOGLUCINOL (PHL), ET DE LA SOUCHE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* F113 PRODUCTRICE DE PHL SUR UNE COLLECTION D'ISOLATS D'*ESCHERICHIA COLI* O157:H7

<i>Présentation de la Publication n°6</i>	187
1. Contexte et objectifs de cette étude	187

2. Matériels et méthodes	187
3. Résultats et discussion.....	189
3.1. Analyse de la diversité d'une collection d'isolats d' <i>E. coli</i> O157:H7	189
3.2. Effet du Phl sur la croissance des isolats d' <i>E. coli</i> O157:H7.....	189
3.3. Effet de <i>P. fluorescens</i> F113 et F113G22 sur la croissance d' <i>E. coli</i> O157:H7 sur milieu gélosé.....	190
3.4. Effet de <i>P. fluorescens</i> F113 et F113G22 sur la croissance d' <i>E. coli</i> O157:H7 sur des plantules de blé.....	190
3.5. Relation entre la résistance au Phl et le profil de virulence, l'origine et le profil PFGE des 73 isolats d' <i>E. coli</i> O157:H7	191
4. Conclusion.....	191
Publication n°6	192
Discussion & perspectives.....	223
Conclusion générale.....	229
Annexes.....	232
Annexe 1 : Revue sur l'écologie des STEC dans les effluents d'élevages bovins et l'environnement.....	233
Publication n°7	234
Annexe 2 : communications n°1 et 2.....	270
Annexe 3 : communications n°3 et 4.....	272
Annexe 4 : communication n°5	276
Bibliographie.....	278
Abstract.....	319

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AFSSA = Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
BHI = Bouillon cœur-cerveille
BCM = Bicozamycine
BFP = « Bundle forming pili »
CMI = Concentration Minimale Inhibitrice
eae = Gène codant l'intimine (Facteur d'attachement/effacement)
EHEC = *Escherichia coli* entérohémorragique
E-hlyA = Entérohémolysine
EPT = Eau Peptonnée Tamponnée
GFP = Protéine fluorescente verte
GUD : Activité β -glucuronidase
LB = Luria Bertani
LBA = Luria Bertani Agar
LDC = Lysine Décarboxylase
LEE = Locus of Enterocyte Effacement
LT = Entérotoxine Thermolabile
ODC = Ornithine Décarboxylase
PCR = Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
Phl ou DAPG = 2,4-diacétylphloroglucinol
PFGE = Électrophorèse en champ-pulsé (Pulse Field Gel Electrophoresis)
POR = Potentiel d'oxydo-réduction
PTT = Purpura Thrombotique Thrombocytopénique
SHU = Syndrome Hémolytique et Urémique
SL = Entérotoxine Thermostable
SOR : Sorbitol
STEC = *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines
Stx = Shiga-toxine
UFC = Unité formant colonie

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : Pathogénie associée aux six classes d' <i>E. coli</i> responsables de diarrhées	23
Figure 2 : Définition des STEC et EHEC au sein de l'espèce <i>E. coli</i>	25
Figure 3 : Arbre phylogénétique obtenu après un alignement multiple des séquences de 6 gènes chromosomiques conservés (<i>trpA</i> , <i>trpB</i> , <i>pabB</i> , <i>putP</i> , <i>icd</i> , et <i>polB</i>) d'une collection de 98 souches d' <i>E. coli</i> et/ou de <i>Shigella</i> , et enraciné par une souche de l'espèce <i>E. fergusonii</i>	27
Figure 4 : Modèle hypothétique de l'émergence d' <i>E. coli</i> O157:H7 à partir d'une souche EPEC de sérotype O55:H7	29
Figure 5 : Relations phylogénétiques entre les séquences nucléotidiques des variants <i>stx1</i> et <i>stx2</i> déterminées à partir du logiciel MEGA 3.1	31
Figure 6 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines	32
Figure 7 : Principales étapes du processus infectieux des STEC	34
Figure 8 : Représentation graphique du système de sécrétion de type III	36
Figure 9 : Flux potentiels de STEC	42
Figure 10 : Détails d'un microagrégat de sol	66
Figure 11 : Microscopie confocale des tissus de plants de laitues cultivés dans du sol irrigué à l'aide d'eau contaminée par la souche 96A13466 d' <i>E. coli</i> O157:H7 (pGFP _{uv}) .	74

Figure 12 : Colonisation de feuilles d' <i>A. thaliana</i> par <i>E. coli</i> O157:H7 marqué avec une protéine fluorescente verte (GFP)	75
Figure 13 : Migration d' <i>E. coli</i> O157:H7 marqué à la GFP jusqu'à une fleur de <i>A. thaliana</i>	76
Figure 14 : Mortalité et transfert des bactéries fécales dans le sol.....	77
Figure 15 : Evolution des concentrations en <i>E. coli</i> observées après épandage de lisier dans les divers compartiments : végétation, surface du sol, horizons A et B	78
Figure 16 : Illustration des facteurs contribuant à la contamination des végétaux par les bactéries fécales.....	81
Figure 17 : Le processus de compostage.....	92
Figure 18 : Digesteur anaérobie	94
Figure 19 : Le plasmide pGFP _{uv} (Clontech™) est un vecteur d'expression procaryote. Il contient un gène de sélection permettant la résistance à l'ampicilline (Amp ^R), une origine de réplication procaryote (pUC Ori) et un promoteur procaryote (pLac) en amont du gène codant la protéine autofluorescente GFP _{uv}	116
Figure 20 : Emplacement des différents sites échantillonnés dans les tas de fumier.....	117
Figure 21 : Dénombrements des STEC dans les 2 tas non retournés (Tas 1 ○, Tas 2 +) pour chaque site A, E et F, ainsi que dans les 2 tas retournés (Tas 1 ○, Tas 2 +) pour chaque site Aa, Ea et Fa	119
Figure 22 : Graphique des valeurs moyennes du taux d'inactivation spécifique k_{max} obtenues pour les 4 souches STEC O26 inoculées dans les 3 types de sols (A, B et C) et incubés aux 2 températures (4 et 20°C).....	143

Tableaux

Tableau 1 : Caractères biochimiques spécifiques des espèces du genre <i>Escherichia</i> (<i>E. coli</i> , <i>E. hermanii</i> , <i>E. vulneris</i> , <i>E. fergusonii</i>).....	21
Tableau 2 : Principales épidémies à STEC suite à la consommation de divers aliments et enregistrées dans le monde depuis 1995	46
Tableau 3 : Principales épidémies à STEC d'origine environnementale et enregistrées dans le monde depuis 1995.....	47
Tableau 4: Prévalence du portage des STEC chez différents types de bovins provenant de diverses exploitations	50
Tableau 5 : Principales données de survie d' <i>E. coli</i> O157:H7 dans différents types de sols fertilisés ou non par des déjections animales	64
Tableau 6 : Nature des déjections récupérées en élevages bovins en fonction du type de production et du mode d'élevage	89

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont considérés comme l'un des plus importants groupes de pathogènes émergents. L'infection à *Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC) s'accompagne fréquemment de diarrhée sanglante. Le tableau clinique peut se compliquer d'un syndrome hémolytique et urémique parfois mortel, notamment chez les enfants en bas âges, ou d'un purpura thrombotique thrombocytopénique chez l'adulte. Le sérotype le plus communément retrouvé en clinique humaine est O157:H7 mais d'autres sérogroupes tels que O103, O26 ou O111 sont de plus en plus incriminés lors d'épidémies à EHEC. 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 considérablement changé depuis ces dix dernières années, et l'ingestion de légumes et fruits contaminés ainsi que le contact avec les animaux et leur environnement sont de plus en plus impliqués en clinique humaine.

Parmi les animaux d'élevage, les bovins représentent le principal réservoir en STEC. Une récente étude a montré que jusqu'à 100% des bovins provenant d'une même exploitation peuvent être porteurs sains de STEC. En outre, les STEC sont capables de survivre pendant plusieurs mois dans les matières fécales des bovins (jusqu'à 18 semaines à 15°C). Les sols et les eaux sont régulièrement souillés par les déjections animales lors de la mise à l'herbe des bovins ou suite à l'épandage des effluents d'élevages, pratique agricole courante destinée à recycler les déchets organiques produits par les exploitations. La survie des STEC dans l'environnement contribue au maintien du cycle épidémiologique de la bactérie et favorise le portage intestinal des STEC par les bovins.

Quelques travaux ont montré l'aptitude d'*E. coli* O157:H7 à persister dans l'environnement. Cependant, les rares données disponibles se limitent essentiellement à ce sérotype. Il paraissait donc essentiel de disposer de données contribuant à une meilleure connaissance du devenir des STEC non-O157 dans les effluents d'élevages et le sol, et si possible, à la définition de stratégies de maîtrise des pollutions diffuses agricoles.

Avant d'exposer les résultats de cette étude, objet du mémoire expérimental, il convient de replacer ce travail dans son contexte scientifique général, développé dans le mémoire bibliographique. Ce dernier sera consacré en premier lieu à :

- ✓ une présentation globale des STEC, décrivant, entre autres, leur taxonomie, les facteurs de virulence de la bactérie, les signes cliniques associés à une infection à EHEC, ainsi que l'épidémiologie humaine des STEC,
- ✓ suivi d'une description de leur prévalence ainsi que de leur survie au sein des exploitations agricoles, notamment dans les effluents d'élevages bovins,

✓ d'une description de leur survie dans les compartiments environnementaux, à savoir le sol, les végétaux et l'eau. Cette partie donnera également un aperçu du transfert potentiel des STEC entre ces différents compartiments.

✓ Enfin, seront abordés les moyens de maîtrise de la dissémination des STEC dans l'environnement. Cette dernière partie insistera notamment sur les moyens de limiter le portage bovin en STEC et sur la gestion des effluents d'élevages bovins.

L'étude expérimentale reprendra l'ensemble des travaux qui ont été entrepris afin d'évaluer la persistance des STEC dans les effluents d'élevages, et de déterminer leur capacité à être transférés à partir des déjections animales dans le sol et à y survivre. Un travail préalable a consisté à évaluer la persistance et la dissémination des souches STEC au sein de plusieurs exploitations laitières françaises.

Les objectifs spécifiques de ces travaux étaient de :

✓ déterminer la survie des STEC non-O157 dans les effluents d'élevages bovins (lisier et fumier), et identifier les principaux facteurs associés à l'inhibition de la bactérie dans ces effluents, en particulier lors du compostage du fumier.

✓ déterminer la survie de souches STEC de sérotype O26:H11 dans 3 types de sol différents (avec des variations de texture, pH et contenu en matières organiques) en conditions *in vitro*. Afin de simuler l'étape de labour, ces sols ont été inoculés avec du fumier bovin contaminé, et 2 températures d'incubations i.e. 4°C et 20°C ont été testées.

✓ évaluer *in situ* la dynamique de transfert et la survie des STEC non-O157 dans le sol (à 2 profondeurs : la rhizosphère et la couche de sol sous-jacente) à partir de bouses naturellement contaminées dans différentes stations d'un bassin versant pâturé par des ruminants. Le transfert probable des STEC dans l'eau à partir des déjections des animaux et/ou des sols a également été analysé à l'exutoire du bassin versant.

✓ évaluer l'effet d'un composé antimicrobien, le 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl) et d'une rhizobactérie productrice de Phl de l'espèce *P. fluorescens* sur la survie d'*E. coli* O157:H7 dans différentes conditions expérimentales. En effet, la rhizosphère abrite des populations bactériennes antagonistes qui pourraient limiter la survie de la bactérie dans cet écosystème.

✓ proposer, à partir des résultats obtenus, des mesures spécifiques de maîtrise de la dissémination des STEC dans l'environnement.

Les résultats expérimentaux sont exposés sous la forme de 7 publications acceptées ou soumises dans des revues internationales et de 5 communications affichées présentées lors de 4 congrès internationaux et d'1 congrès national.

MÉMOIRE BIBLIOGRAPHIQUE

PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS RELATIVES AUX *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES (STEC)

Cette première partie a pour objectif de décrire les caractères généraux décrivant l'espèce *Escherichia coli* et d'illustrer l'histoire évolutive des STEC à travers l'acquisition de divers facteurs de virulence, tels que les Shiga-toxines Stx1 et/ou Stx2. Leur mécanisme d'action, les troubles cliniques associés ainsi que les épidémies causées par les EHEC sont également exposés dans cette partie.

1. Classification taxonomique des STEC

1.1. Caractères généraux de l'espèce *E. coli*

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les genres appartenant à cette famille, tels que *Salmonella* ou encore *Shigella*, sont des bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates et qui ne possèdent pas d'oxydase (Le Minor *et al.*, 1990).

Le genre *Escherichia* regroupe cinq espèces : *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* et *E. vulneris*. Chaque espèce d'*Escherichia* possède des caractéristiques biochimiques spécifiques, permettant de les différencier (Grimont, 1987) (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractères biochimiques spécifiques des espèces du genre *Escherichia* (*E. coli*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. fergusonii*) (d'après Grimont, 1987).

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

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

E. coli a été décrite pour la première fois en 1885 dans des selles de nourrissons par l'Allemand Theodor Escherich. Son nom actuel a cependant été proposé en 1919 pour reclasser une espèce préalablement connue sous les noms de "*Bacterium coli commune*", de "*Bacillus coli*" ou de "*Bacterium coli* (Grimont, 1987). C'est un microorganisme commun de la microflore commensale intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux) (Greator et Thorne, 1994). Il représente près de 80% de la microflore aérobie (Ghebru, 1988). A ce titre *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...).

Par ailleurs, bien que la majorité des souches d'*E. coli* soient commensales, certaines d'entre elles sont associées à des pathologies intestinales (Levine, 1987) ou extra-intestinales (Pohl *et al.*, 1989) très diverses chez l'homme. 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.

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

Il n'existe pas de classification standardisée des différents pathotypes d'*E. coli*. Une classification basée sur la pathogénie des syndromes diarrhéiques comprenant 6 groupes est utilisée par les médecins (Figure 1) :

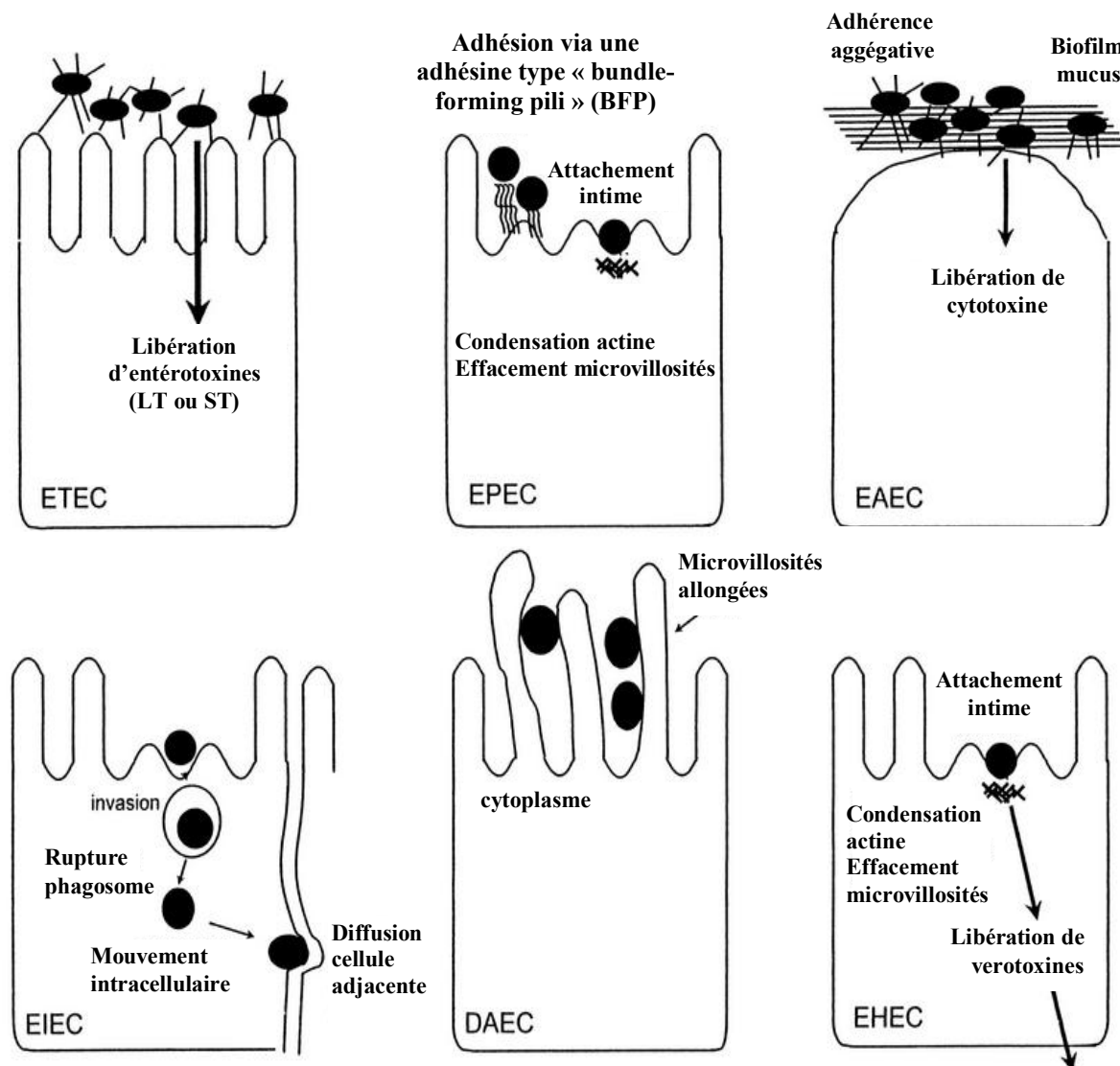


Figure 1: Pathogénie associée aux six classes d'*E. coli* responsables de diarrhées (d'après Nataro et Kaper, 1998). LT : toxines thermolabiles ; ST : toxines thermostables.

✓ Les *E. coli* Entérotoxinogènes (ETEC) sont majoritairement associés à 2 syndromes cliniques importants, les diarrhées du nourrisson dans les pays en voie de développement et la diarrhée du voyageur (ou « turista »). Les ETEC colonisent essentiellement la partie proximale de l'intestin grêle, grâce à leurs « facteurs de colonisation » (CFAx et CSx) qui sont des adhésines fimbriaires (Cassels et Wolf, 1995). Ils n'induisent pas d'altération histologique marquée de la muqueuse. Le pouvoir pathogène des ETEC s'explique principalement par la sécrétion des toxines thermostables (ST) et/ou thermolabiles (LT) (Levine, 1987).

✓ **Les *E. coli* Entéropathogènes (EPEC)** sont responsables de gastro-entérites infantiles. Ils touchent en particulier les enfants en bas âge (< 3 ans). Lors d'infections, des lésions histopathologiques particulières apparaissent, appelées lésions d'attachement et d'effacement (lésions A/E) (Andrade *et al.*, 1989). Ce phénotype est caractérisé par l'effacement des microvillosités intestinales et par l'adhérence intime entre les bactéries et la membrane cytoplasmique des entérocytes. Plusieurs gènes dont le gène *eae* sont à l'origine de ces lésions (Jerse *et al.*, 1990).

✓ **Les *E. coli* Entéroaggrégatifs (EAEC)** sont de plus en plus reconnus comme étant responsables de retards de croissance et de diarrhées persistantes dans les pays en voie de développement ainsi que dans les pays industrialisés. Une adhésion agrégative en " briques empilées ", à l'origine de nécroses au pôle apical des villosités avec un œdème inflammatoire et hémorragique de la sous-muqueuse, les caractérise. Ils élaborent une entérotoxine thermostable (EASTI) et une entérotoxine thermolabile (Kaper *et al.*, 2004).

✓ **Les *E. coli* Entéroinvasifs (EIEC)** sont phylogénétiquement assez proches de *Shigella* spp. (Brenner *et al.*, 1973), et leur mécanisme de pathogénie est similaire (invasion de l'épithélium intestinal). Ils sont responsables de syndromes dysentériques caractérisés par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnés d'une diarrhée aqueuse qui évolue rapidement en une dysenterie (selles contenant du sang et du mucus).

✓ **Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC)** sont responsables de diarrhées et d'infections urinaires. Les diarrhées peuvent être aqueuses et contenir du mucus. L'expression d'une adhésine fimbriale (appartenant à la famille Afa/Dr) et d'une protéine de membrane externe confère aux bactéries un phénotype d'adhésion « diffuse », sur les lignées cellulaires en culture de type Hep-2 (Benz et Schmidt, 1992; Cookson et Nataro, 1996).

✓ **Les *E. coli* Entérohémorragiques (EHEC)** sont à l'origine de troubles plus ou moins sévères allant d'une « simple » diarrhée peu hémorragique à des colites hémorragiques, voire à un Syndrome Hémolytique et Urémique chez l'enfant ou à un Purpura Thrombotique et Thrombocytopénique chez l'adulte, pouvant conduire parfois à la mort du patient (Riley *et al.*, 1983). Les EHEC qui correspondent aux souches isolées chez les malades possèdent typiquement au moins un gène *stx* (*stx*₁ codant la Shiga-toxine 1 [Stx1] ou *stx*₂ codant la Shiga-toxine 2 [Stx2]) (Konowalchuk *et al.*, 1977; Riley *et al.*, 1983) ainsi que d'autres facteurs de virulence comme le gène *eae* codant le facteur d'attachement et d'effacement (Levine et Edelman, 1984) ou le gène *ehx* codant l'entérohémolysine (Schmidt *et al.*, 1995b). L'ensemble des souches d'*E. coli* possédant au moins un gène *stx* représente le groupe des STEC [Shiga-toxin-Producing *E. coli*] (ou VTEC selon l'ancienne dénomination

internationale [verotoxin-producing *E. coli*]). Il est important de souligner que les STEC ne sont néanmoins pas tous pathogènes pour l'homme (Figure 2).

La classification des STEC la plus utilisée par les microbiologistes est fondée en grande partie sur les travaux de Kauffmann (1947), et se base sur la détermination :

- ✓ du sérotype, identifié selon l'antigène somatique O. Plus de 180 sérogroupes O d'*E. coli* sont actuellement connus ;
- ✓ du sérotype, identifié au sein du sérotype sur la base des antigènes H flagellaires (56 antigènes différents) et éventuellement des antigènes K de la capsule (80 antigènes).

Cette classification permet d'obtenir, en considérant les trois antigènes O, H et K, plus de 800 000 sérotypes différents. A l'heure actuelle, seulement 2000 sérotypes environ ont été réellement isolés à ce jour. Parmi ceux-ci, *E. coli* O157:H7 est le principal sérotype responsable de pathologies chez l'homme. Néanmoins, d'autres sérogroupes (i.e. O26, O111, O145 et O103) sont de plus en plus à l'origine d'épidémies et impliqués dans des SHU à l'échelle internationale.

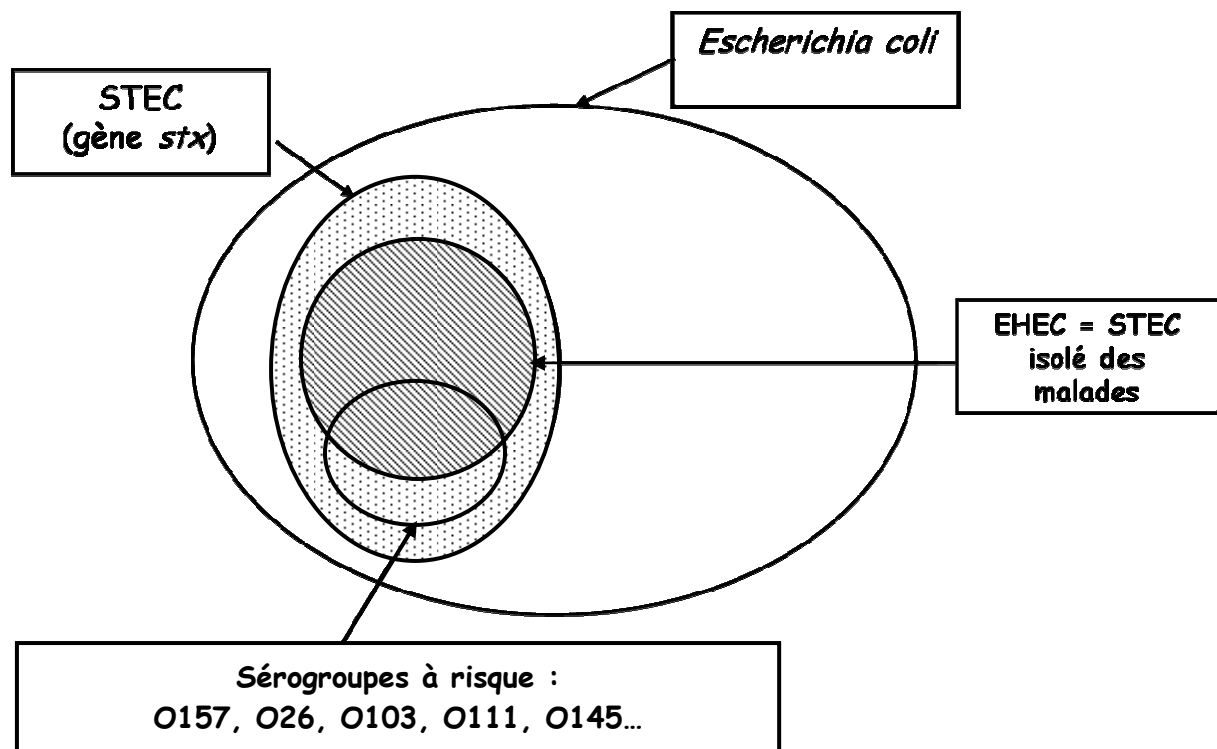


Figure 2 : Définition des STEC et EHEC au sein de l'espèce *E. coli*.

1.3. Origine évolutive des STEC

1.3.1. Origine des EHEC

L'évolution de la pathogénie chez *E. coli* est le résultat de l'arrivée d'éléments génétiques mobiles codant pour divers facteurs de virulence. Toutefois, la rétention et l'expression de ces facteurs de virulence dépendent étroitement du fond génétique de la cellule bactérienne dans laquelle ils ont été introduits. Une analyse phylogénétique a récemment été réalisée sur la base de l'alignement des séquences de 6 gènes chromosomiques conservés (*trpA*, *trpB*, *pabB*, *putP*, *icd*, et *polB*) de 98 souches appartenant aux différents pathovars d'*E. coli* associés à des pathologies intestinales ou extra-intestinales (Escobar-Paramo *et al.*, 2004). Cette étude a montré notamment que les souches d'*E. coli* pathogènes, à l'origine de troubles intestinaux, appartiennent à 4 groupes phylogénétiques (A, B1, C et E) qui auraient émergé après la différenciation du groupe phylogénétique D (Figure 3). Ceci suggère que d'importantes modifications du génome d'*E. coli* ont eu lieu en ce point clé de l'évolution de l'espèce, permettant entre autres l'arrivée, le maintien, et l'expression fonctionnelle des facteurs de virulence dans l'ancêtre commun à ces 4 groupes.

Différentes hypothèses ont été développées concernant l'origine des EHEC. La plus probable serait que les EHEC soient un groupe de clones dérivant des *E. coli* Entéropathogènes (EPEC) (Whittam *et al.*, 1993). L'émergence des EHEC serait consécutive à l'acquisition par transfert horizontal de gènes de virulence (*stx1*, *stx2*, *eae* et *ehx*). Ces gènes sont en effet localisés sur des éléments mobiles : les gènes *stx1* et *stx2* sont situés sur des prophages, le gène *eae* (intimine) sur un îlot de pathogénicité LEE et le gène *ehxA* et *katP* (entérohémolysine-EHEC, KatP) sur le plasmide pO157.

Ainsi l'acquisition de gènes *stx* par deux clones EPEC aurait conduit à l'émergence de deux lignées majeures de EHEC : EHEC-1, constituée de souches O157, et EHEC-2, constituée de souches O26 et O111 (Wieler *et al.*, 1997; Sperandio *et al.*, 1998, Reid *et al.*, 2000). On retrouve d'ailleurs ces 2 lignées dans l'analyse réalisée par Escobar-Paramo *et al.* (2004), où les souches d'*E. coli* O157:H7 (complexe EHEC-1) sont regroupées dans le clade E, alors que celles du complexe EHEC-2 sont distribuées au sein du groupe A (Figure 3).

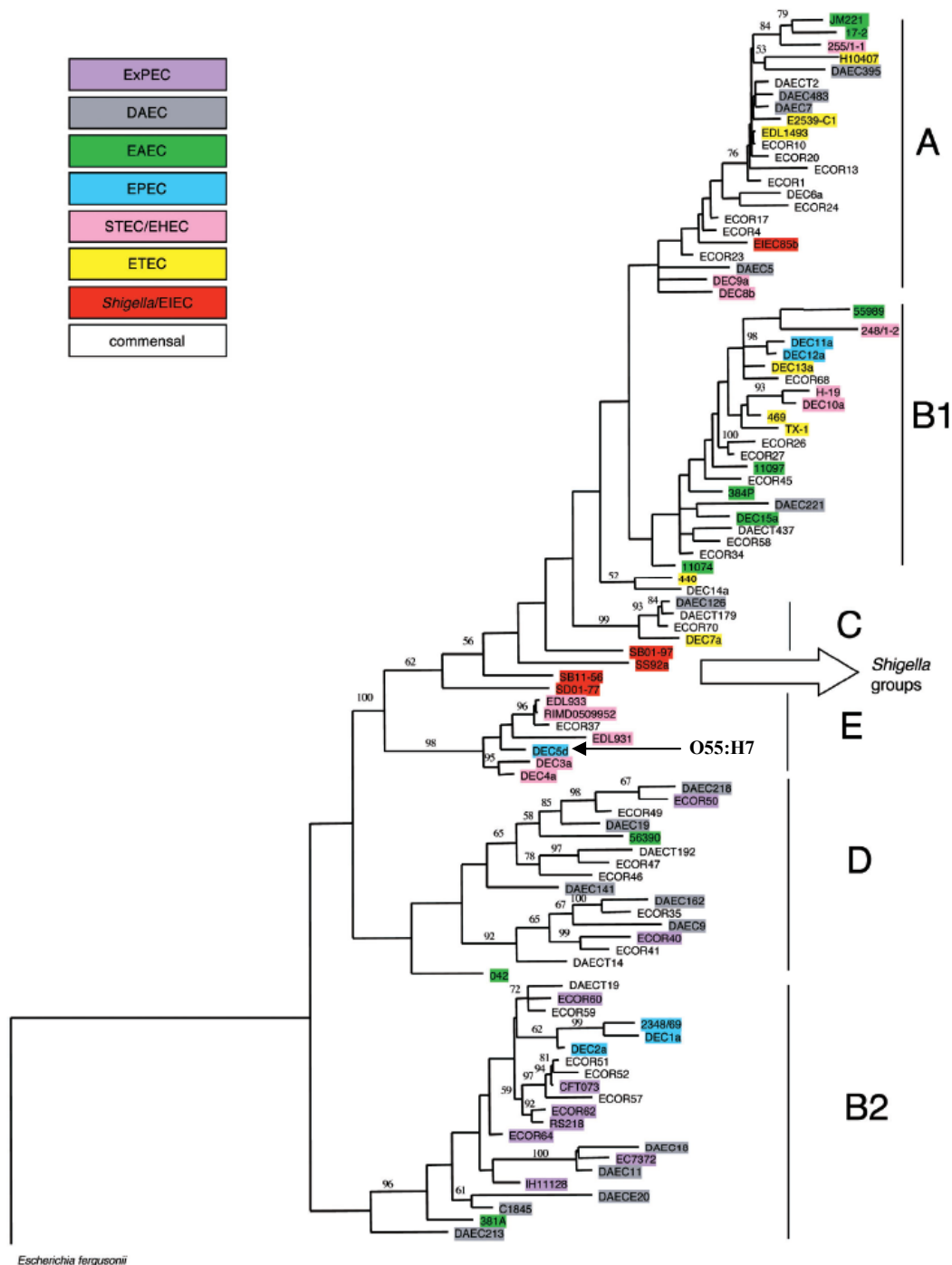


Figure 3 : Arbre phylogénétique obtenu après un alignement multiple des séquences de 6 gènes chromosomiques conservés (*trpA*, *trpB*, *pabB*, *putP*, *icd*, et *polB*) d'une collection de 98 souches d'*E. coli* et/ou de *Shigella*, et enraciné par une souche de l'espèce *E. fergusonii*. Les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont indiquées au dessus des noeuds. Six principaux groupes phylogénétiques A, B1, C, E, D, et B2 ont été différenciés (d'après Escobar-Pàramo *et al.*, 2004).

1.3.2. Origine du clone O157:H7

Un modèle concernant l'émergence du clone O157:H7 a été proposé par Feng *et al.* (1998). Celui-ci est basé sur un ensemble d'événements génétiques qui auraient eu lieu chez l'ancêtre génétiquement le plus proche des EHEC O157:H7, un EPEC de sérotype O55:H7 (β -glucuronidase positive et fermentant le sorbitol) (Figure 4). Par ailleurs, l'analyse phylogénétique de Escobar-Pàramo *et al.* (2004) conforte ce modèle évolutif. En effet, toutes les souches d'*E. coli* O157:H7 analysées sont regroupées autour de la souche DEC5d de sérotype O55:H7 (Figure 3). Le clone O157:H7 aurait émergé à partir d'un ancêtre possédant l'îlot de pathogénicité LEE, il y a au moins trente mille ans, via l'acquisition du gène *stx2* vraisemblablement par transduction avec un phage ; il en a résulté l'émergence d'un clone O55:H7 *stx2*-positif. Ensuite, ce clone aurait acquis un plasmide codant des hémolysines et la région *rfb* (nécessaire à la synthèse de l'antigène O157) et plus récemment un gène phagique codant la Shiga-toxine 1 (*stx1*). Ce clone aurait perdu plus récemment la capacité à fermenter le sorbitol et à produire une activité β -glucuronidase fonctionnelle, suite à une mutation T→G en position 92 du gène *uidA* (Park *et al.*, 2001). Ce clone aurait également acquis le plasmide de virulence pO157 (gènes *ehxA* et *katP*) donnant naissance au clone O157:H7 "sorbitol –" de répartition mondiale (Feng *et al.*, 1998; Reid *et al.*, 2000).

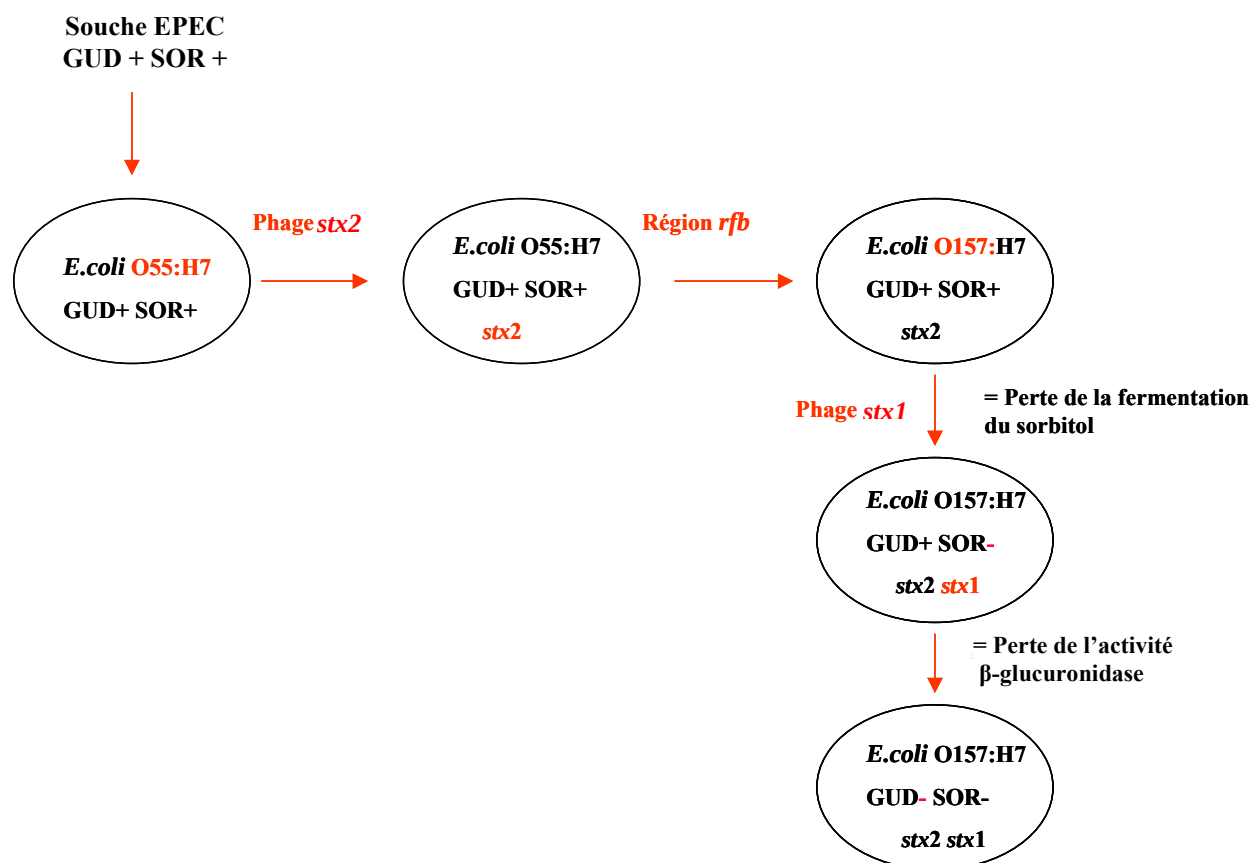


Figure 4 : Modèle hypothétique de l'émergence d'*E. coli* O157:H7 à partir d'une souche EPEC de sérotype O55:H7 (Feng *et al.*, 1998). GUD+ : activité β-glucuronidase fonctionnelle ; SOR+ : fermentation du sorbitol.

2. Facteurs de virulence des STEC

2.1 Les Shiga-toxines

Les souches STEC se caractérisent par la production de cytotoxines capables d'inhiber *in vitro* les cellules Vero (cellule rénale du singe vert d'Afrique) en stoppant de façon irréversible leur multiplication. Ces toxines sont regroupées sous le terme de Shiga-toxines (Stx) ou Shiga-like toxines (Slt) étant donné leurs homologues avec la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1 (O'Brien *et al.*, 1982; Strockbine *et al.*, 1988).

2.1.1. Structure des toxines Stx1 et Stx2

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. La sous-unité A possède une activité de type N-glycosidase qui permet l'arrêt de la synthèse protéique de la cellule cible infectée. Les deux sous-unités A et B sont codées par un opéron d'environ 1230 pb généralement porté par un bactériophage de type λ -like. L'opéron *stx* est constitué d'un cistron proximal codant la sous-unité A et d'un cistron distal, séparé du précédent par 12 à 15 nucléotides, codant la sous-unité B. Les gènes de la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1, ressemblant par leurs structures et leurs fonctions à Stx1, sont situés quant à eux, sur le chromosome (Gannon *et al.*, 1990).

2.1.2. Variants *stx*

Deux grandes classes de Shiga-toxine sont aujourd'hui identifiées : les toxines Stx1, qui sont neutralisables par des anticorps anti-Shiga-toxine de *Shigella dysenteriae* 1, et les toxines Stx2 qui ne le sont pas (Strockbine *et al.*, 1986; Calderwood *et al.*, 1996). Stx1 et Stx2 possèdent respectivement 99 % et 56 % d'homologie vis à vis de la séquence en acides aminés de la toxine de type 1 de *Shigella dysenteriae* (Strockbine *et al.*, 1988). Elles se distinguent par leurs propriétés immunologiques, mais leur mécanisme d'action et leurs propriétés biochimiques sont similaires. Cependant, les toxines Stx1 et Stx2 ne semblent pas traverser de la même façon la barrière de l'épithélium intestinal (Hurley *et al.*, 1999). En outre des études (Wadolowski *et al.*, 1990; Lindgren *et al.*, 1993) ont montré que Stx2 serait 1000 fois plus cytotoxique sur les cellules endothéliales rénales humaines que la toxine Stx1 (Louise et Obrig, 1995a). Ces résultats corroborent les données épidémiologiques indiquant que les souches responsables des troubles les plus sévères chez l'homme, comme les souches de sérotype O157:H7, produisent Stx2 (Boerlin, 1999).

Depuis la première description des Shiga-toxines, un nombre conséquent de variants génétiques des toxines Stx1 et Stx2 ont été décrits (Beutin *et al.*, 2007). Au sein de la classe des toxines Stx2, 11 variants (Brett *et al.*, 2003) sont à l'heure actuelle différenciés, dont les variants Stx2 NV206 et Stx2g qui ont été récemment décrits (Bertin *et al.*, 2001; Leung *et al.*, 2003). Concernant la classe des toxines Stx1, les variants sont moins diverses puisqu'ils sont au nombre de 6, les plus fréquents étant Stx1, Stx1c et Stx1d. Ces sous-types présentent des différences d'activité biologique, de réactivité sérologique, ou de spécificité de liaison aux récepteurs (Calderwood *et al.*, 1996).

Les gènes *stx1* et *stx2* et leurs variants appartiennent à 2 clades phylogénétiques bien distincts. Certains d'entre eux ont été représentés dans la Figure 5. La séquence du variant Stx2f est de loin celle qui présente le moins d'homologie avec celle de Stx2. En outre, les séquences des variants Stx2-NV206 et Stx2g sont proches des séquences des variants Stx2, Stx2c et Stx2d, fréquemment associés à des pathologies chez l'homme. Le variant Stx2e est quant à lui retrouvé presque exclusivement dans les souches d'origine porcine (associées à l'oedème du porc).

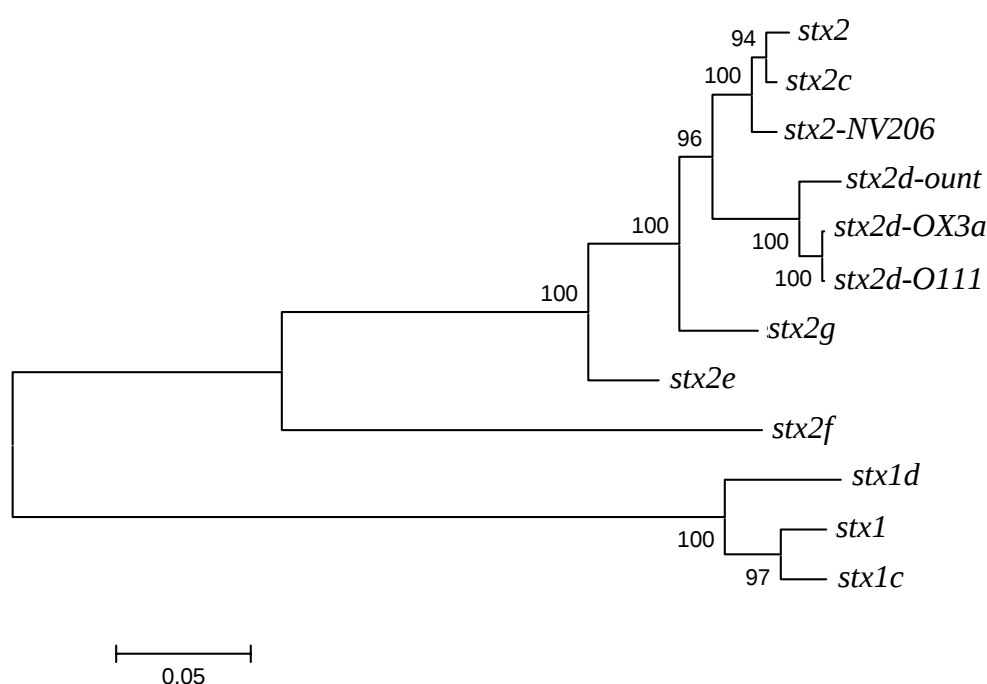


Figure 5 : Relations phylogénétiques entre les séquences nucléotidiques des variants *stx1* et *stx2* déterminées à partir du logiciel MEGA 3.1. Les séquences ont été analysées en utilisant la méthode « Neighbor-Joining » et le test Kimura 2 paramètres (d'après Fremaux *et al.*, non publié).

2.1.3. Mécanisme d'action des toxines Stx

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 (galactose- α (1-4)-galactose- β (1-4)-glucosyl-céramide) (Lingwood *et al.*, 1987). Ce récepteur ne serait apparemment pas le seul impliqué dans le

mécanisme d'action des Shiga-toxines. En effet, une récente étude a démontré que l'épithélium intestinal de l'homme pourrait être affecté par la toxine Stx2 en l'absence de récepteur Gb3 dans un système de culture d'organe *in vitro* (IVOC). Cependant, le mécanisme impliqué reste à l'heure actuelle inconnu (Schuller *et al.*, 2004). 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 est transloquée dans le cytoplasme, 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 6).

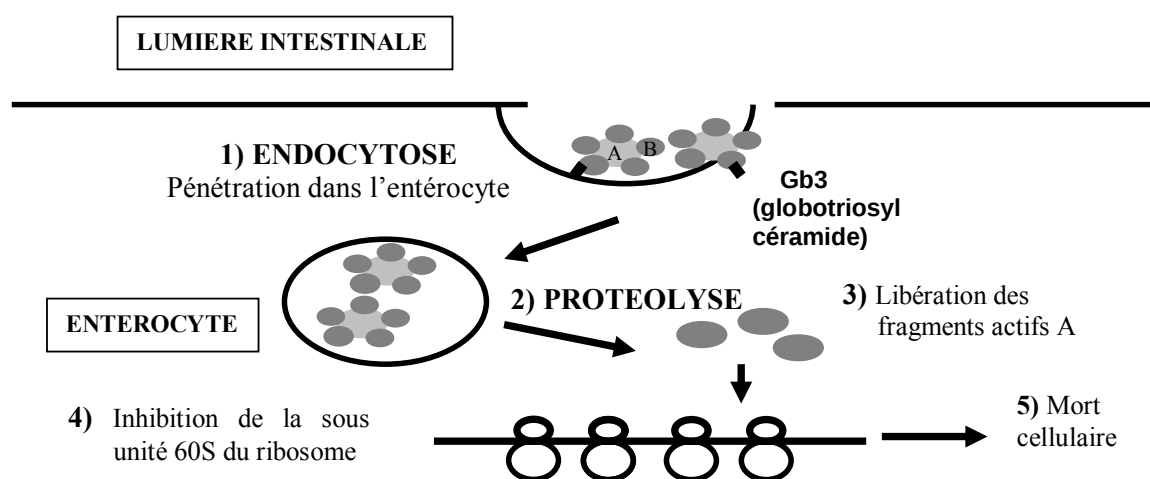


Figure 6 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines (Extrait de Vernozzy-Rozand et Montet, 2001).

2.1.4. Rôle des toxines Stx dans la physiopathologie

L'essentiel des symptômes cliniques est associé à la production de Shiga-toxines par les EHEC. Cependant, le processus infectieux est multifactoriel et dépend à la fois de facteurs bactériens et de facteurs liés à l'hôte (Paton et Paton, 1998). Après avoir traversé l'épithélium intestinal, les toxines seraient capables de diffuser par voie systémique et d'être véhiculées jusqu'aux organes cibles via la circulation sanguine, soit dans les globules rouges, soit par l'intermédiaire des polynucléaires (Figure 7) (Fernandez *et al.*, 2006). Lorsque l'on injecte à des souris, par voie intraveineuse, des Shiga-toxines, ces dernières se localisent dans l'intestin

mais aussi dans la moelle épinière et le cerveau et d'une manière générale dans tous les organes possédant les récepteurs Gb3. Elles seraient responsables des thromboses observées au cours des atteintes locales et systémiques par altération des cellules endothéliales (Louise et Odrig, 1995b). En effet, les cellules endothéliales vasculaires humaines, au niveau du côlon, au niveau du parenchyme rénal, et au niveau du système nerveux central, sont particulièrement riches en récepteurs Gb3, expliquant les manifestations cliniques observées (diarrhée, insuffisance rénale, troubles neurologiques) (Paton et Paton, 1998). Une action directe de Stx au niveau des microvillosités des cellules épithéliales intestinales a été suggérée par des études sur des biopsies de côlons humains et de rats (Fiorito *et al.*, 2000). Ces dommages causés directement aux microvillosités pourraient être responsables de l'inhibition de la réabsorption d'eau au niveau du côlon.

Par ailleurs, d'autres études ont montré que les toxines Stx induiraient la production de cytokines par les macrophages et les monocytes (TNF- α , IL-1 β , IL-12...) (Lee *et al.*, 2002a). Les cytokines induiraient alors la production de récepteurs Gb3 à la surface des cellules, les rendant plus sensibles à l'action de Stx (Foster *et al.*, 2000). Ainsi, l'induction d'IL-8 par les cellules épithéliales intestinales en contact avec des STEC a été mise en évidence (Hurley *et al.*, 1999; Thorpe *et al.*, 2001). En activant la réponse inflammatoire, cette induction des récepteurs Gb3 permettrait le développement de lésions au niveau de la barrière intestinale, donc la dissémination systémique des toxines et favoriserait l'évolution vers un SHU. Ces phénomènes d'induction des cytokines pro-inflammatoires, qui pourraient jouer un rôle clé dans la physiopathologie, sont encore mal élucidés.

En outre, les Shiga-toxines seraient également impliquées dans l'apoptose des cellules endothéliales. En effet, Erwert *et al.*, (2003) ont montré que Stx1 et Stx2 inhibent l'expression cellulaire du facteur anti-apoptotique Mcl-1.

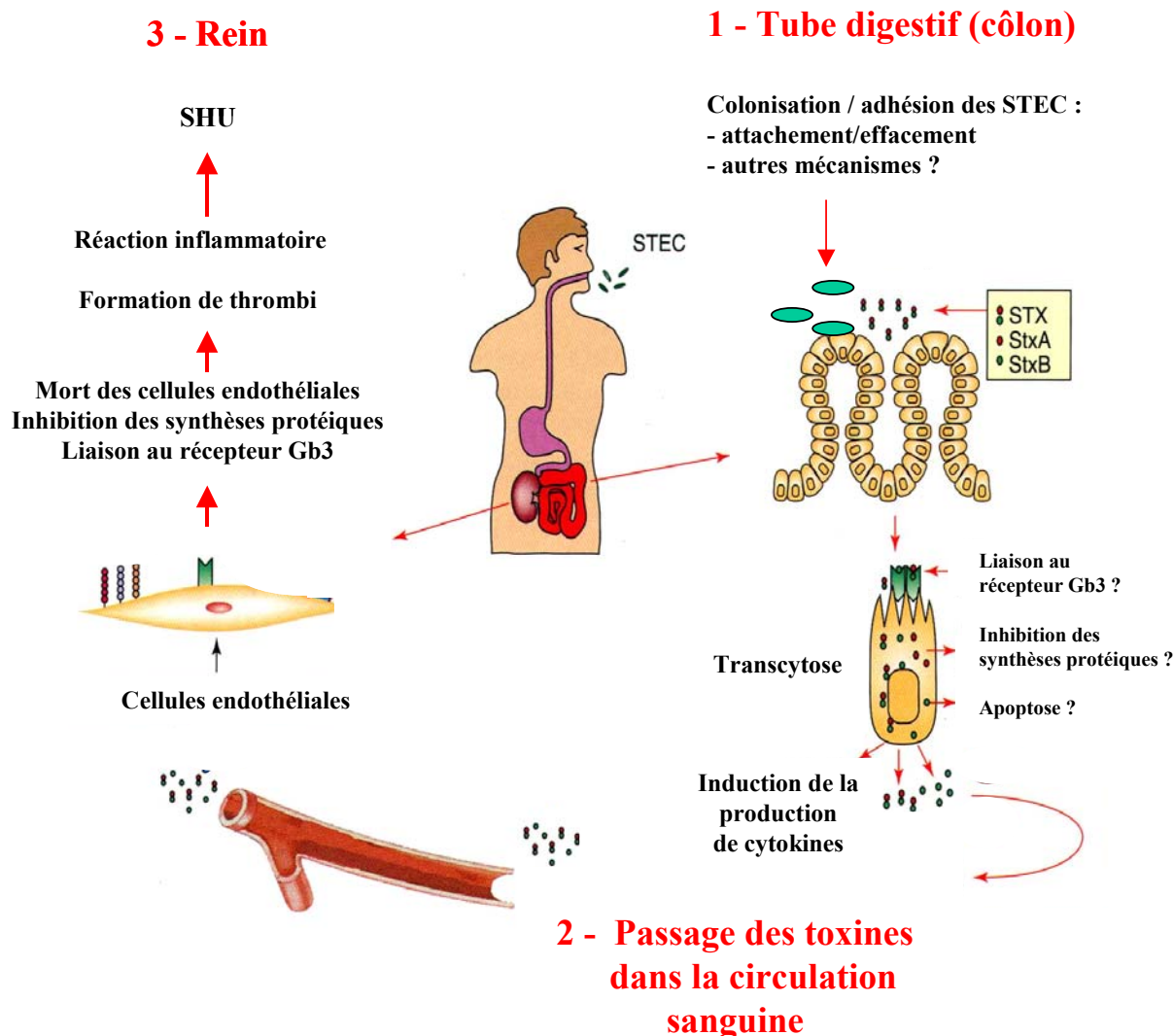


Figure 7 : Principales étapes du processus infectieux des STEC. Après ingestion des STEC, une étape de colonisation du tube digestif est probable. Les toxines traversent l'épithélium intestinal par transcytose, avant de rejoindre le système circulatoire. Elles peuvent alors atteindre les récepteurs spécifiques (Gb3) localisés à la surface des cellules endothéliales, principalement au niveau intestinal, rénal et cérébral (AFSSA, 2003).

2.2. Les facteurs d'adhésion

Les facteurs d'adhésion sont des éléments majeurs de la pathogénie. Les principaux mécanismes d'adhésion décrits chez les entérobactéries font appel à des fimbriae, des protéines de la membrane externe et des lipopolysaccharides. De nombreuses études *in vitro*

et *in vivo* ont été réalisées afin de connaître les différents facteurs responsables de ce processus (Paton *et al.*, 1997).

La colonisation du tube digestif par certaines souches STEC s'accompagne du développement de lésions spécifiques des entérocytes dites d'attachement-effacement (A/E), qui se limitent au côlon et au caecum (Donnenberg *et al.*, 1993). Les lésions A/E, d'abord décrites chez les EPEC, se caractérisent par un effacement des microvillosités des cellules de l'épithélium intestinal. Cet effacement est dû à une dépolymérisation des filaments d'actine constitutifs des microvillosités (Ismaili *et al.*, 1995). Il s'en suit une accumulation et une repolymérisation d'actine pour former un piédestal sur lequel les bactéries viennent se lier de façon étroite. Les lésions provoquées par le mécanisme de résorption des microvillosités intestinales seraient à l'origine des symptômes diarrhéiques observés lors des infections. Contrairement aux EPEC qui colonisent l'intestin grêle, l'adhésion des STEC se limite à l'épithélium folliculaire des plaques de Peyer (Phillips et Frankel, 2000).

2.2.1. Le système de sécrétion de type III

Les gènes responsables des lésions d'attachement et effacement sont portés par l'îlot de pathogénicité chromosomique LEE (locus d'effacement des entérocytes), codant un système de sécrétion de type III (Figure 8) et trois classes de protéines sécrétées par l'intermédiaire de celui-ci :

- ✓ Le gène *eae* (*E. coli* attaching and effacing) code une protéine de membrane externe de 94 kDa appelée intimine (Jerse *et al.*, 1991). La fonction "adhésion" de l'intimine est assurée par les 280 acides aminés situés dans le domaine C-terminal. Cette région est constituée de 2 domaines "Ig-like" assurant la reconnaissance du récepteur spécifique Tir présent à la surface de la cellule cible, ainsi que d'un second récepteur non clairement identifié à ce jour.

- ✓ Le gène *tir* code le co-récepteur spécifique de l'intimine, Tir (Translocated Intimin Receptor), une protéine de 78 kDa injectée dans le cytoplasme de la cellule eucaryote grâce au système de sécrétion de type III où il est modifié par des kinases (Kenny *et al.*, 1997). Tir s'insère ensuite dans la membrane cytoplasmique de l'entérocyte (DeVinney *et al.*, 1999).

- ✓ Les gènes *esp* (EPEC-secreted protein) codent pour une « seringue » moléculaire (*espA*, *espB*, *espD*, *espK*) impliquée dans la translocation des effecteurs dans la cellule hôte (Tir, map, *espF*, *espG*, *espH* ...).

Les protéines Esp ne comportant pas de séquence signal, leur sécrétion a été attribuée au système de sécrétion de type III dont les gènes sont également portés par le LEE. Ce système est codé par les gènes *sep* (secretion of *E. coli* protein) et *esc* (*E. coli* secretion) (Jarvis et Kaper, 1996).

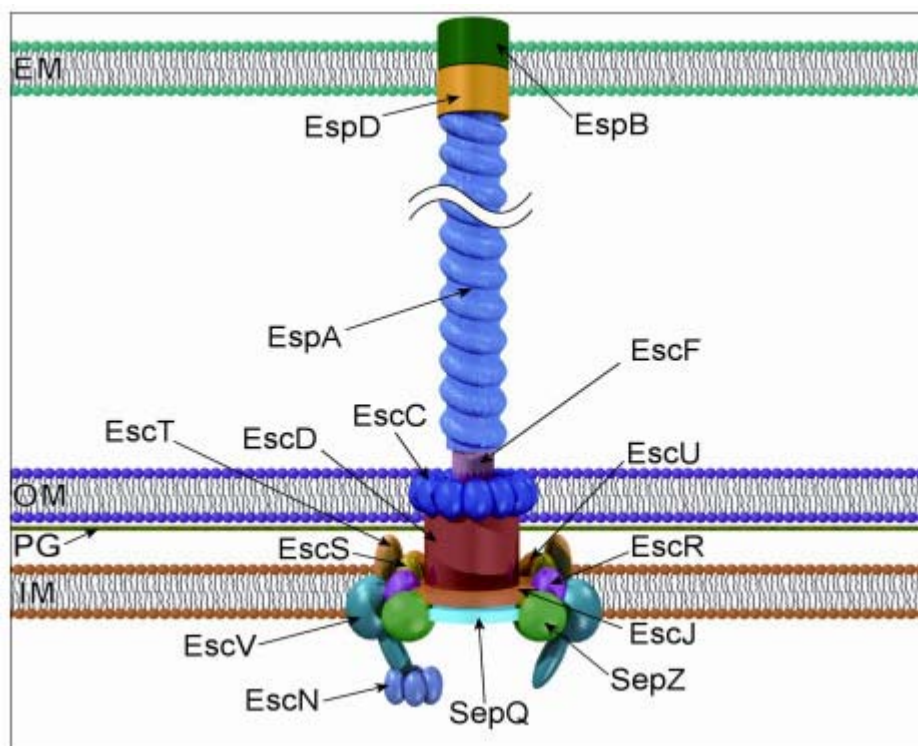


Figure 8 : Représentation graphique du système de sécrétion de type III (d'après Pallen *et al.*, 2005). IM, membrane interne ; PG, peptidoglycane ; OM, membrane externe ; EM, membrane eukaryotique.

La régulation de l'expression des gènes du LEE est un mécanisme complexe qui fait intervenir une multitude de facteurs. Le principal régulateur identifié à l'heure actuelle correspond au produit du gène *ler* (LEE-encoded regulator), une protéine de 13 kDa régulant plusieurs opérons du LEE (Mellies *et al.*, 1999). Récemment, Laaberki *et al.* (2006) ont mis en évidence deux cascades majeures de régulation contrôlant l'expression des gènes du LEE dans la souche *E. coli* O157:H7 Sakai. Celles-ci agissent sur l'activité du promoteur du gène *ler*. La première active ce promoteur par l'intermédiaire de l'ARN non codant *dsrA* et du facteur de transcription RpoS, la deuxième réprime le promoteur du gène *ler* par l'intermédiaire de la protéine H-NS et du régulateur spécifique du LEE, GrlA. D'autres facteurs pourraient réprimer l'expression des gènes du LEE tels que GrlR (global regulator of

LEE repressor) ou le facteur Mpc (multiple point controller) (Lio et Syu, 2004; Tsai *et al.*, 2006). Au contraire, la protéase ClpXP permettrait la stimulation de l'expression des gènes du LEE à travers deux principales voies dont une serait dépendante du facteur RpoS (Tomoyasu *et al.*, 2005).

Par ailleurs, la régulation du LEE fait intervenir des facteurs environnementaux (Beltrametti *et al.*, 1999; Elliott *et al.*, 2000; Sperandio *et al.*, 2001; Sperandio *et al.*, 2002). Notamment, en situation de carence en nutriments ou lors de l'arrêt de la croissance en phase stationnaire, l'expression du gène *ler* serait stimulée et l'adhérence des cellules favorisée. De plus, l'augmentation de la synthèse du régulateur de la transcription ppGpp en présence de DksA (ARN polymérase) permettrait d'activer le promoteur du gène *ler* (Nakanishi *et al.*, 2006).

Récemment, un deuxième système de sécrétion de type III (ETT2 : *E. coli* type III secretion system 2) a été révélé après séquençage complet du génome de *E. coli* O157:H7. Cependant il semble qu'il soit incapable à lui seul de permettre la synthèse d'un système de sécrétion fonctionnel (Zhang *et al.*, 2004). Par contre, certains gènes du système ETT2 coderaient pour des protéines inhibitrices (EtrA et EivF) de la transcription des gènes du LEE.

2.2.2. Autres facteurs majeurs d'adhésion

Bien que le LEE soit prépondérant chez les EHEC, certaines souches EHEC associées à des cas de SHU sont LEE (-).

✓ Sur l'une d'entre elles, Paton *et al.* (2001) ont isolé un gène provenant d'un mégaplasme et codant le facteur Saa (STEC autoagglutinating adhesin) constitué par environ 500 acides aminés. Il augmenterait de manière significative l'adhérence des cellules STEC sur lignées cellulaires de type Hep-2. La distribution de ce gène parmi des souches STEC d'origine bovine et humaine fut par la suite investiguée par Jenkins *et al.* (2003). Les souches *saa*⁺ ont été détectées plus fréquemment dans les isolats STEC issus des bovins (32 sur 56) que ceux provenant de cas cliniques (8 sur 91).

✓ Iha (Iron-homologue adhesin), est une protéine de la membrane externe de 67 kDa, identifiée chez certains STEC. Elle confère un phénotype d'adhésion diffuse sur cellules HeLa aux *E. coli* O157:H7 et à certaines souches STEC *eae*-négatives telles que celles de sérotype O113:H21 (Tarr *et al.*, 2000).

✓ D'autres adhésines ont été récemment décrites dans des souches STEC ne possédant pas l'îlot de pathogénicité LEE, telles que des protéines de liaison aux immunoglobulines (EibG), des longs fimbriae polaires (Lpf (O113) par exemple) ou encore les pili type ECP (Doughty *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2006; Rendon *et al.*, 2007).

✓ Le gène chromosomique *efa1* coderait un facteur d'adhésion potentiel chez les EHEC LEE-positifs (Nicholls *et al.*, 2000).

✓ Enfin, la présence de curli a été mise en évidence récemment chez certaines souches STEC (Cookson *et al.*, 2002; Ryu *et al.*, 2004; Jeter et Matthyse, 2005). Chez les *E. coli* commensaux, les curli apparaissent comme un facteur d'adhérence à large spectre, permettant la fixation des bactéries aux surfaces inertes (sable, verre, plastiques, inox...) mais également aux surfaces des cellules végétales et animales, cependant leur implication dans les mécanismes de pathogénie chez les EHEC est encore incertaine (Kim et Kim, 2004 ; Pawar *et al.* 2005). Par ailleurs, la production de curli paraît associée à une résistance accrue des bactéries aux défenses de l'hôte et aux agents antimicrobiens (Ryu et Beuchat, 2005).

2.3. Autres facteurs plasmidiques de virulence

2.3.1. L'entérohémolysine

L'entérohémolysine E-hlyA a été mise en évidence chez les STEC en 1988 (Beutin *et al.*, 1988). La protéine E-hlyA est codée par le gène *ehxA* de l'opéron plasmidique *ehxCABD* (Schmidt *et al.*, 1995). Ce gène présente une homologie de 61 % avec le gène *hlyA* codant l' α -hémolysine d'*E. coli* K12. C'est une hémolysine appartenant à la famille des toxines Rtx (Repeats in Toxin), et son mécanisme d'action est comparable à celui de l' α -hémolysine. L'activité cytolytique de la toxine E-hlyA est liée à sa capacité d'insertion dans la membrane cytoplasmique et à sa capacité à former 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. Cependant, l'activité de E-hlyA est moins puissante que celle de l' α -hémolysine ; en effet, le phénotype hémolytique des STEC se caractérise par une lyse des érythrocytes de mouton sur gélose au sang plus discrète et plus lente (Beutin *et al.*, 1989; Schmidt *et al.*, 1995). De plus les souches isolées chez les malades ne possèdent pas toujours ce gène, et sa présence n'est pas statistiquement corrélée au pouvoir pathogène.

2.3.2. La protéase EspP

Une sérine protéase EspP, capable de cliver le facteur humain V de coagulation et la pepsine A est suspectée de jouer un rôle dans la pathogénie (Brunder *et al.*, 1997). La dégradation du facteur V contribuerait au développement des colites hémorragiques observées chez les patients.

2.3.3. Autres facteurs

D'autres facteurs plasmidiques pourraient jouer un rôle dans la pathogénie : la catalase peroxydase périplasmique KatP de 82 kDa, des toxines de type *Clostridium difficile*-like, ainsi que le système de sécrétion de type II (Brunder *et al.*, 1996; Burland *et al.*, 1998). Par ailleurs, le gène *astA* codant l'entérotoxine East1 a été identifié chez de nombreuses souches STEC (Savarino *et al.*, 1996; Schmidt et Karch, 1996; Morabito *et al.*, 1998; Iyoda *et al.*, 2000). Cette toxine pourrait jouer un rôle dans l'induction de la phase initiale de diarrhée aqueuse.

3. Pathologies humaines associées aux EHEC

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, 1995).

3.1. La colite hémorragique

La colite hémorragique constitue la principale manifestation clinique de l'infection à *E. coli* O157:H7 (Griffin et Tauxe, 1991; Tarr, 1995). Elle se définit par des crampes abdominales, une diarrhée initialement aqueuse puis sanglante chez un patient généralement apyrétique ou subfébrile (Griffin et Tauxe, 1991). La diarrhée sanglante est présente dans 90% des cas diagnostiqués (Tarr, 1995). La période d'incubation de 2 à 10 jours, est plus longue que celle observée pour les autres diarrhées infectieuses (Griffin et Tauxe, 1991; Sharp *et al.*, 1994). L'évolution est généralement spontanément favorable (90% des cas) en quelques jours.

Il n'existe pas de traitement spécifique en dehors de la suppression des apports alimentaires et de la mise en route d'une nutrition parentérale jusqu'à l'évolution positive de l'état de santé du patient (Su et Brandt, 1995). A noter que l'utilisation d'antibiotiques reste à ce jour controversée.

3.2. Le SHU

Le SHU touche surtout l'enfant de moins de 3 ans et survient généralement après une diarrhée prodromique sanglante. Ce n'est qu'en 1983 que Karmali *et al.* (1983) établissent la relation entre une infection intestinale à STEC et la survenue d'un SHU. L'apparition du SHU se fait en moyenne une semaine après le début des symptômes digestifs. L'incidence du SHU est de 10 % chez les enfants de moins de 10 ans et de 10 à 20 % chez les sujets âgés (Griffin et Tauxe, 1991). Le SHU post-diarrhée représente environ 90 % des cas de SHU de l'enfant et constitue la première cause d'insuffisance rénale du nourrisson. Le pronostic rénal est favorable dans environ 2 tiers des cas (Loirat *et al.*, 1992).

Une atteinte d'autres organes (pancréas, foie et système nerveux central) est également possible (Loirat *et al.*, 1992). L'atteinte du système nerveux central est d'ailleurs actuellement la principale cause du décès, comme le montre une enquête Française dans laquelle 4 des 286 enfants atteints de SHU entre 1993 et 1996 sont décédés suite à une atteinte du système nerveux central (Decludt *et al.*, 2000).

Il n'existe pas de traitement spécifique modifiant l'évolution du SHU. Toutefois, la mise en route précoce d'un traitement symptomatique rigoureux a une importance capitale et permet de maintenir actuellement un taux de mortalité inférieur à 5%. Si des vomissements, de la diarrhée et des symptômes de colite persistent, une nutrition parentérale est nécessaire. Enfin lorsque l'enfant est anurique, une dialyse est indiquée, pour pouvoir apporter une nutrition adéquate sans induire de surcharge volémique.

3.3. Le PTT

Le PTT est une entité clinique décrite pour la première fois par Moschcowitz en 1925 (Moschcowitz, 1925). 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 est récente (Kovacs *et al.*, 1990). La diarrhée prodromique est généralement absente (Hofmann, 1993). Le PTT touche essentiellement l'adulte. C'est un syndrome caractérisé par une anémie hémolytique microangiopathique, une thrombocytopénie (diminution du nombre des plaquettes sanguines), une fièvre, des troubles neurologiques avec une insuffisance rénale aiguë.

La durée du PTT est habituellement de quelques jours à quelques semaines, mais il peut parfois se prolonger pendant des mois. Quand la maladie progresse, elle peut toucher le système nerveux central et les reins, et leur atteinte est, dans la plupart des cas, la cause

principale de la mort. Des signes neurologiques sont observés dans 90 % des cas d'évolution fatale.

4. Epidémiologie humaine des STEC

Les enfants en bas âge (<5 ans), les personnes âgées (>65ans) et les personnes ayant pris récemment un traitement antibiotique sont plus susceptibles de développer la maladie (Griffin *et al.*, 1990). Néanmoins, toute personne est potentiellement à risque et peut développer une diarrhée, voire un SHU. En effet, lors de l'épidémie survenue dans le sud de la France en octobre 2005 suite à la consommation de steak haché contaminé par *E. coli* O157:H7, une personne de 42 ans, sans antécédent pathologique avéré, a été infectée. Par ailleurs, d'autres personnes peuvent être considérées à risque du fait de leur exposition fréquente à un réservoir animal de STEC, au travers de leurs activités professionnelles (i.e. éleveurs...) ou de leurs loisirs (enfants en classe verte, ferme pédagogique...).

En France, la surveillance des infections à STEC est basée sur celle des SHU chez les enfants de moins de 15 ans. Elle repose sur un réseau hospitalier de néphrologues pédiatres volontaires et est coordonnée par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS). 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.

4.1. Principaux modes de transmission

Les études d'épidémiologie analytique et les investigations d'épidémie ont permis d'améliorer les connaissances sur les modes de transmission et les sources de contamination à STEC. La Figure 9 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 inter-humaine et le contact avec les animaux de ferme et leur environnement.

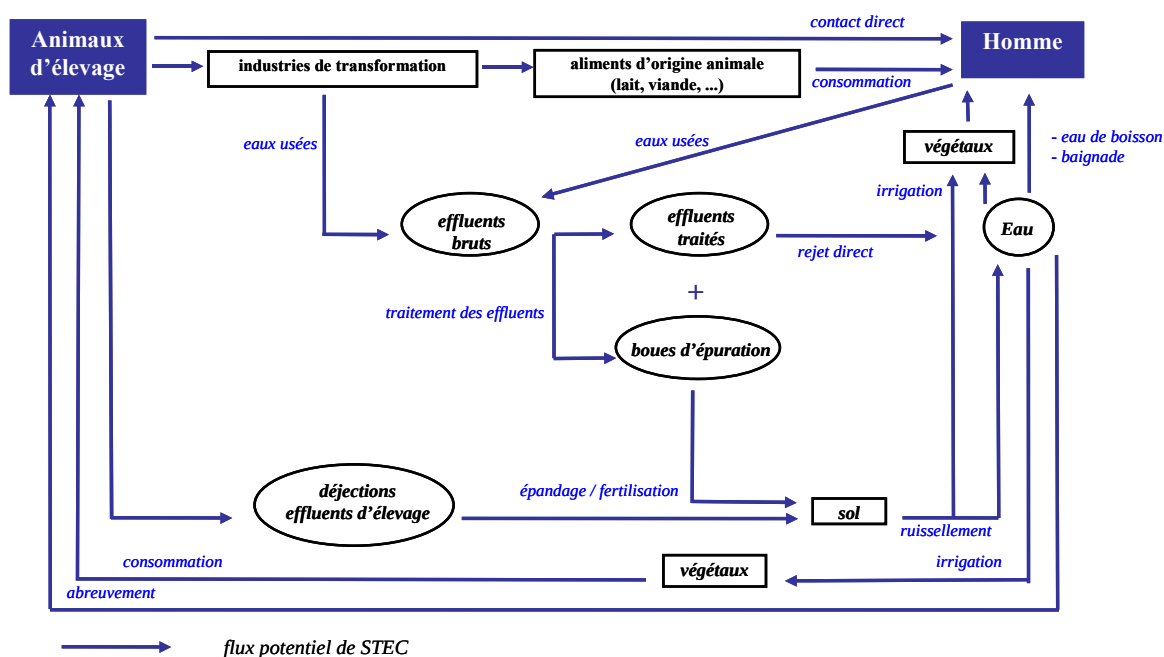


Figure 9 : Flux potentiels de STEC. Les flèches indiquent les flux potentiels de STEC entre le réservoir animal que peuvent représenter les animaux d'élevages et l'homme (AFSSA, 2003).

4.1.1. Transmission alimentaire

Impliquée dans la moitié des épidémies à EHEC, elle est la principale source de contamination humaine.

✓ Les produits carnés sont à l'origine d'un grand nombre d'infections à *E. coli* O157:H7 (Vernozy-Rozand et Montet, 2001). La viande de bœuf constitue la source majeure de contamination suite principalement à une cuisson insuffisante (Roberts *et al.*, 1995). La viande d'autres animaux de boucherie ou de volailles a également été mise en cause (Orskov *et al.*, 1987; Doyle, 1991; Griffin et Tauxe, 1991; Martin *et al.*, 1994; Paton *et al.*, 1996). Les STEC sont généralement introduits dans la chaîne alimentaire par l'intermédiaire de carcasses contaminées provenant elles-mêmes d'animaux porteurs. Le processus de dissémination du pathogène se poursuit ensuite au niveau des étapes de transformation des viandes.

✓ Le lait et les produits laitiers non pasteurisés ont également été à l'origine d'épidémies (Casenave *et al.*, 1993; Morgan *et al.*, 1993; Allerberger *et al.*, 2001). La voie de contamination du lait actuellement retenue est celle de la contamination à partir des matières fécales de bovins lors de la traite. En effet, les conditions de traite et l'environnement dans

lequel elle se réalise jouent un rôle prépondérant dans la contamination du lait par les STEC. Néanmoins, une étude menée *in vitro* a montré l'envahissement des cultures épithéliales mammaires par *E. coli* O157:H7 (Matthews *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent l'existence possible d'une source mammaire de contamination du lait.

✓ Les fruits et légumes crus (salade, radis, épinards, oignons, etc) peuvent être directement contaminés par l'eau d'irrigation, à partir du sol contaminé suite à l'épandage d'effluents d'élevages ou via l'activité de la faune du sol.

4.1.2. 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 1997 et 2004, le système de surveillance des Etats-Unis rapportait que 6% des épidémies d'origine hydrique étaient liées aux EHEC (Barwick *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002b; Blackburn *et al.*, 2004; Yoder *et al.*, 2004; Dziuban *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2006) contre 3% au Royaume-Uni (Smith *et al.*, 2006).

✓ La consommation d'eau de puits, d'eau de source privée et d'eau de distribution non traitées a été à l'origine de cas isolés d'infection (Jackson *et al.*, 1998) et d'épidémies à *E. coli* O157 (Holme, 2003; Mannix *et al.*, 2005). Depuis ces dix dernières années, le nombre d'épidémies associées aux réseaux publics d'eau potable a nettement diminué, notamment grâce à la mise en place de mesures préventives et curatives appropriées. Dans le cas des réservoirs d'eau dédiés à une consommation privée, ces mesures ne sont pas toujours appliquées. Du fait de leur insalubrité et de leur localisation (en aval de terres agricoles pâturées par des ruminants ou fertilisées par les effluents d'élevages), ces réservoirs d'eau peuvent être contaminés par les eaux de percolation et/ou de ruissellement, notamment à la suite d'importants événements pluvieux. Une enquête épidémiologique a pointée l'eau privée comme facteur de risque de contamination par les STEC (Chalmers *et al.*, 2000).

✓ L'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades dans un lac, ou dans une autre étendue d'eau naturelle (Keene *et al.*, 1994; CDC, 1996; Cransberg *et al.*, 1996; Ackman *et al.*, 1997; Paunio *et al.*, 1999) ou dans une piscine (Brewster *et al.*, 1994; Hildebrand *et al.*, 1996; Friedman *et al.*, 1999) a souvent été incriminée. Aux Etats-Unis, les épidémies à *E. coli* O157:H7 d'origine hydrique sont principalement associées aux eaux issues de lacs ou rivières, en raison de la sensibilité des souches, notamment à la chloration des eaux de piscines (Craun *et al.*, 2005).

4.1.3. Transmission inter-humaine

Le portage sain humain de STEC existe mais semble rare et transitoire (Griffin, 1995; Stephan et Untermann, 1999). La majorité des cas résulte d'une contamination indirecte mise en évidence chez les personnes en contact avec les malades.

De plus, cette transmission est 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 (Belongia *et al.*, 1993; Allaby et Mayon-White, 1995; Boudailliez *et al.*, 1997; Swerdlow et Griffin, 1997; Al-Jader *et al.*, 1999; Sugiyama *et al.*, 2005), les centres de soins journaliers (Reida *et al.*, 1994) et dans les centres psychiatriques (Pavia *et al.*, 1990). Ce mode de transmission est aussi responsable de l'extension de l'infection au sein des familles (Ludwig *et al.*, 1998) et dans les hôpitaux (Karmali *et al.*, 1999; Bolduc *et al.*, 2004). La durée du portage serait en moyenne de 13 jours lors de colite hémorragique et de 31 jours lors de SHU (Karch *et al.*, 1995).

4.1.4. Transmission par le contact avec les animaux de ferme et leur 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 (Renwick *et al.*, 1994; Coia, 1998; Kassenborgh *et al.*, 1998; Parry et Salmon, 1998; Trevena *et al.*, 1999; Beutin *et al.*, 2000; O'Brien *et al.*, 2001a) mais aussi lors d'épidémies (Shukla *et al.*, 1994; Louie *et al.*, 1999; Milne *et al.*, 1999; Crump *et al.*, 2002). 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). Par exemple, chez les éleveurs Anglais, la séroprévalence à O157 varie de 1,6% à 5% (Chalmers *et al.*, 1999). 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).

4.2. Principales épidémies

Pendant les années 80, la plupart des infections à EHEC étaient essentiellement associées à la consommation de denrées d'origine animale. L'épidémiologie des infections à EHEC a

considérablement changé depuis ces dix 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. Ceci s'explique sans doute par (i) une recherche plus exhaustive des sources potentielles de contamination lors d'une épidémie à EHEC, (ii) une multiplication des élevages bovins intensifs, (iii) et par une modification du régime alimentaire chez l'homme, avec une consommation accrue de fruits et légumes crus dans les pays développés. 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, 48% des épidémies survenues entre 1982 et 2002 n'étaient pas d'origine alimentaire, avec une nette augmentation des épidémies d'origine environnementale après 1995 (Rangel *et al.*, 2005). Les principales épidémies survenues depuis 1995 ont été répertoriées dans les Tableaux 2 et 3.

Les EHEC constituent la cause majeure de diarrhée hémorragique et de SHU dans les pays à climat tempéré (Caprioli et Tozzi, 1998; Griffin, 1998; Smith *et al.*, 1998). En France, le taux d'incidence du SHU est d'environ 0,7 pour 100 000 enfants âgés de moins de 15 ans (soit 76 cas notifiés) et de 2,1 pour 100 000 enfants âgés de moins de 2 ans (Haeghebaert *et al.*, 2003). Il existe une variation saisonnière marquée de l'infection, avec une recrudescence des épidémies d'origine environnementale pendant la période estivale (Tozzi *et al.*, 2001). Le sérotype le plus fréquemment mis en cause lors d'épidémies est O157:H7 (Bitzan *et al.*, 1993; Siegler, 1995; Meyer-Broseta *et al.*, 2001). 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 Australie, Argentine, Afrique du sud, Thaïlande, Israël, Chine et Japon (Lopez *et al.*, 1989; Griffin et Tauxe, 1991; Lerman *et al.*, 1992; Paton *et al.*, 1996; Soderstrom *et al.*, 2005; Doorduyn *et al.*, 2006; Espie *et al.*, 2006; Rivas *et al.*, 2006). En France, il est impliqué dans 86% des cas de SHU (Haeghebaert *et al.*, 2003). Toutefois, les sérotypes autres que O157:H7 ont très certainement été sous-estimés. La communauté scientifique met régulièrement en évidence des STEC non-O157:H7 chez les malades atteints de SHU ou de colite hémorragique avec en ordre décroissant de fréquence les sérotypes O111:H- et O111:H2, O26:H11 et O26:H-, et O103:H2 et O103:H-. Cependant, cette liste n'est pas exhaustive et n'indique que les sérotypes majeurs isolés chez les malades. Ainsi d'autres sérogroupes peuvent être impliqués tels que O55, O82, O105, O113, O145, O171, etc (Caprioli *et al.*, 1994; Tarr, 1995; Paton *et al.*, 1996; Gerber *et al.*, 2002), mais leur fréquence

réelle est difficile à estimer du fait de méthodes de détection le plus souvent inadaptées ou d'absence de recherche (Griffin *et al.*, 2000).

Tableau 2 : Principales épidémies à STEC suite à la consommation de divers aliments et enregistrées dans le monde depuis 1995. Les épidémies françaises sont indiquées en gras.

Année	Pays	Sérogroupe de STEC	Nombre de malades (nb de SHU, nb de décès)	Aliments suspectés ou confirmés	Références
Origine : viande					
1995	Australie	O111:H-	23 (23 SHU, 1 décès)	Saucisse sèche fermentée	(Paton <i>et al.</i> , 1996)
1995	Angleterre	O157	14 (2 SHU)	Plats préparés à base de viande crue (bœuf, porc)	(Stevenson et Hanson 1996)
1996	Écosse	O157:H7	512 (34 SHU, 17 décès)	Viande de bœuf	(Cowden <i>et al.</i> , 2001)
2000	Espagne	O157:H7	181 (6 SHU)	Saucisse	(Martinez <i>et al.</i> , 2001)
2000	États-Unis	O157:H7	55 (4 SHU)	Viande de boeuf hachée	(Proctor <i>et al.</i> , 2002; Smith <i>et al.</i> , 2002)
2002	France	O148:H8	11 (2 SHU)	Viande de mouton	(Espié et Vaillant 2003)
2005	France	O157:H7	70 (17 SHU)	Viande de boeuf	(Mailles <i>et al.</i> , 2006)
Origine : produits laitiers					
1997	Écosse	O157:H-	37	Gâteau à la crème	(O'Brien <i>et al.</i> , 2001b)
1998	États-Unis	O157:H7	55	Fromage frais caillé	(CDC, 2000a)
2000	Angleterre	O157	6 (1 SHU)	Lait non pasteurisé	(CDC, 2000b)
2001	Colombie Britannique	O157:H7	5 (2 SHU)	Lait de chèvre non pasteurisé	(McIntyre <i>et al.</i> , 2002)
2005	France	O26	16 (16 SHU)	Camembert	(Espié <i>et al.</i> , 2006a)
Origine : végétaux crus					
1995	États-Unis	O157:H7	> 70 (1 SHU)	Laitue	(Ackers <i>et al.</i> , 1998)
1996	Japon	O157:H7	9 451 (12 décès)	Radis blanc	(Michino <i>et al.</i> , 1999)
1996	États-Unis	O157:H7	61	Laitue	(Hilborn <i>et al.</i> , 1999)
1997	États-Unis	O157:H7	108 (4 SHU)	Germes de luzerne	(Breuer <i>et al.</i> , 2001)
2002	France	O157:H7	10	Salade de concombres	(Duffell <i>et al.</i> , 2003)
2005	Suède	O157:H7	120	Laitue	(Soderstrom <i>et al.</i> , 2005)
2006	États-Unis	O157:H7	199 (31 SHU, 3 décès)	Epinards	(PHAC, 2006)

Tableau 3 : Principales épidémies à STEC d'origine environnementale et enregistrées dans le monde depuis 1995.

Année	Pays	Séroroupe de STEC	Nombre de malades (nb de SHU, nb de décès)	Aliments suspectés ou confirmés	Références
Origine : hydrique					
1997	Iles canaries	O157:H7	15	Eau de source privée	(Pebody <i>et al.</i> , 1999)
1997	Finlande	O157:H7	14	Eau de lac	(Paunio <i>et al.</i> , 1999)
1998	États-Unis	O157:H7	157	Eau de puits non traitées	(Olsen <i>et al.</i> , 2002)
1999	États-Unis	O157:H7	775	Eau de distribution	(Bopp <i>et al.</i> , 2003)
1999	États-Unis	O121:H19	11 (3 SHU)	Eau de lac	(McCarthy <i>et al.</i> , 2001)
1999	Écosse	O157:H7	7	Eau de rivière	(Harrison et Kinra, 2004)
2000	Canada	O157:H7	2300 (26 SHU, 7 décès)	Eau du reseau municipal	(Hrudey <i>et al.</i> , 2003)
2004	Columbie Britannique	O157:H7	10 (1 SHU)	Eau d'un parc	(PHAC, 2005)
2004	Angleterre	O157 :H7	7	Eau de rivière	(Ihekweazu <i>et al.</i> , 2006)
2005	Irlande	O157:H7	18 (2 SHU)	Eau de source privée	(Mannix <i>et al.</i> , 2005)
Origine : contact avec les animaux d'élevages ou leur environnement					
1996-98	Allemagne	O118	17 (2 SHU)	Contact avec des bovins	(Beutin <i>et al.</i> , 2000)
1997	Angleterre	O157:H7	15	Contact avec des bovins	(Crampin <i>et al.</i> , 1999)
1999-2000	États-Unis	O157:H7	326	Contact avec des animaux de ferme ou leur fèces	(Kennedy <i>et al.</i> , 2002)
2000	États-Unis	O157:H7	56 (8 SHU)	Contact avec des veaux	(Crump <i>et al.</i> , 2002)
2000	Écosse	O157:H7	20	Sol contaminé par des fèces de moutons	(Ogden <i>et al.</i> , 2002)

La prévention des épidémies à EHEC passe par une surveillance des animaux porteurs sains. De nombreuses études ont permis d'évaluer la prévalence et la survie des STEC au sein des élevages bovins. Ceci fera l'objet de la seconde partie de ce mémoire.

Points clés à retenir

- ✓ Les STEC ne sont pas tous pathogènes pour l'homme.
- ✓ Les STEC se caractérisent par la production de Shiga-toxines : Stx1 et/ou Stx2 ; Stx2 étant une toxine plus virulente que Stx1.
- ✓ L'acquisition des facteurs de virulence par *E. coli* s'est faite essentiellement par des mécanismes de transferts génétiques horizontaux, avec un rôle important des bactériophages.
- ✓ De nombreux variants Stx1 et surtout Stx2 ont été identifiés.
- ✓ Les toxines se fixent sur le récepteur Gb3 présent principalement à la surface des cellules endothéliales vasculaires, puis entraînent la mort cellulaire expliquant ainsi les manifestations cliniques (complications rénales ou neurologiques).
- ✓ L'incidence annuelle du SHU pédiatrique en France est de 0.7 cas pour 100000 enfants de moins de 15 ans.
- ✓ Depuis une dizaine d'années l'épidémiologie des STEC a changé et l'ingestion de fruits et légumes crus, ainsi que le contact avec les animaux et leur environnement sont de plus en plus impliqués en clinique humaine.

DEUXIÈME PARTIE : PRÉVALENCE ET SURVIE DES STEC DANS LES ÉLEVAGES BOVINS

Les bovins sont le principal réservoir en STEC. Ils ne possèdent pas les récepteurs Gb3 de liaison des Shiga-toxines et ne présentent par conséquent aucun signe clinique lorsqu'ils hébergent des STEC dans leur tube digestif ; ils sont dits porteurs sains. Ces derniers peuvent abriter une grande diversité de souches STEC. L'excrétion dans l'environnement, via les fèces, de STEC par les animaux porteurs constitue la principale voie d'introduction de ces bactéries en élevage. Les paragraphes suivants font état, d'une part, de la prévalence du portage fécal bovin en STEC et, d'autre part, de la prévalence et de la survie de la bactérie dans les effluents et sur de nombreux supports retrouvés en exploitation.

1. Dans les fèces des bovins

1.1. Données chiffrées du portage fécal bovin en STEC

Le portage sain en STEC des bovins a fait l'objet de nombreuses études. Le tableau 4 présente quelques données de prévalence du portage en STEC chez les bovins laitiers et/ou à viandes de différents pays. A l'échelle internationale, les taux de prévalence des STEC non-O157 varient de 4,7 à 44,8 % pour les troupeaux à l'herbe, de 4,6 à 55,9 % pour les bovins destinés à l'engraissement (« feedlots » ou « factory farming », système d'élevage industriel développé essentiellement en Amérique du nord pour l'engraissement des animaux), et de 2,1% à 70,1% pour les bovins échantillonnés à l'abattoir (Hussein et Bollinger, 2005). Concernant les élevages bovins laitiers, ils oscillent entre 1,7 et 74 % pour les génisses, entre 0,4 et 52 % pour les vaches et entre 1,3 et 68,7 % pour les veaux (Hussein et Sakuma, 2005a). Ainsi, les bovins destinés à l'engraissement présentent logiquement des taux de contamination en STEC plus élevés que ceux mis à l'herbe, du fait de la densité importante des animaux dans les systèmes industriels. En outre, les élevages bovins laitiers peuvent également être fortement contaminés par cet agent zoonotique. Ainsi, Moreira *et al.* (2003) ont étudié au Brésil, 243 cheptels laitiers répartis parmi 60 exploitations laitières. Quatre vingt quinze pourcents des fermes étaient contaminées par des STEC. Le pourcentage d'animaux porteurs sains variait entre les exploitations de 0 à 100%. En France, une récente étude a montré que 62,5% des bovins échantillonnés lors d'une enquête épidémiologique portant sur 152 exploitations laitières étaient porteurs sains en STEC (Raynaud et Heuchel, 2005).

A l'échelle internationale, 77 sérotypes différents de STEC ont été détectés dans les fèces de bovins laitiers, dont 35 ont déjà été isolés chez des patients tels que O103:H2, O26:H11, O145:H⁻ ou encore O111:H⁻ (Hussein et Sakuma, 2005a). En comparaison, une plus grande diversité de sérotypes (250) a été observée dans le cas des bovins à viande, qui s'explique par le chiffre élevé d'échantillons fécaux analysés (près de 75000 contre seulement 15000 pour les élevages bovins laitiers). Parmi eux, 79 ont été impliqués lors d'infections à EHEC chez l'homme (Hussein et Bollinger, 2005).

Tableau 4 : Prévalence du portage des STEC chez différents types de bovins provenant de diverses exploitations. Les données françaises sont indiquées en gras.

Pays	Type de bovins	Prévalence [*]	Référence
Etats-Unis	Bovins à l'herbe	4% (été) à 15% (hiver)	(Thran <i>et al.</i> , 2001)
Australie	Bovins à viande	2,1%	(Hornitzky <i>et al.</i> , 2002)
Inde	Bovins à viande	10,5%	(Pal <i>et al.</i> , 1999)
Angleterre	Bovins à viande	25,2%	(Pearce <i>et al.</i> , 2004)
Brésil	Bovins à viande	53%	(Cerqueira <i>et al.</i> , 1999)
France	Bovins à viande	70,1%	(Pradel <i>et al.</i>, 2000)
Danemark	Bovins laitiers	6,3%	(Rugbjerg <i>et al.</i> , 2003)
Canada	Bovins laitiers	11,1%	(Rahn <i>et al.</i> , 1997)
Australie	Bovins laitiers	16,7%	(Cobbald et Desmarchelier, 2001)
Allemagne	Bovins laitiers	18%	(Zschock <i>et al.</i> , 2000)
Japon	Bovins laitiers	25,7%	(Kobayashi <i>et al.</i> , 2001)
Nouvelle-Zélande	Bovins laitiers	27,3%	(Meyer-Broseta <i>et al.</i> , 2001)
Brésil	Bovins laitiers	49%	(Moreira <i>et al.</i> , 2003)
France	Bovins laitiers	62,5%	(Raynaud et Heuchel, 2005)

* Pourcentage d'animaux porteurs sains dans les élevages investigués

Lorsque l'on ne considère que le sérotype O157:H7, les taux de prévalence 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 %, avec une moyenne de 7 à 8 % pour les troupeaux laitiers. En Europe, les valeurs notées étaient plus faibles puisqu'elles se situaient entre 0 et 3 % des troupeaux étudiés (Meyer-Broseta *et al.*, 2001). Ces dernières années, la multiplicité des enquêtes épidémiologiques à l'échelle internationale a permis de mettre en évidence des taux de prévalence en *E. coli* O157:H7 généralement plus élevés que ceux relevés par ces auteurs. Chez les bovins à viande, les taux de prévalence oscillent entre 0,7 et 27,3 % pour les bovins à l'herbe et entre 0,3 et 19,7 % pour les troupeaux destinés à l'engraissement (Hussein et Bollinger, 2005). Concernant les bovins laitiers, ces taux vont de 0.2 à 16.1% pour les bovins et de 0,4 à 48,8% pour les veaux (Hussein et Sakuma, 2005b).

Les variations observées pour les taux de prévalence sont principalement liées à l'impact des facteurs environnementaux et/ou aux pratiques d'élevages. Cependant, il apparaît que le portage en STEC peut concerner un grand nombre de bovins laitiers et/ou à viande (jusqu'à 100% au sein d'une même exploitation). Il est beaucoup plus faible quand on ne considère que le seul sérotype O157:H7 avec souvent moins de 5% des bovins excréteurs. En outre, ce portage en STEC (notamment en *E. coli* O157:H7) est généralement intermittent, avec des quantités excrétées au cours du temps extrêmement variables. Ainsi, aux Pays-Bas, entre septembre et novembre 1996, 10 fermes laitières ont été visitées pour collecter des échantillons fécaux de bovins (Heuvelink *et al.*, 1998). Sept fermes présentaient des troupeaux positifs pour le sérotype recherché O157, avec une proportion d'animaux excréteurs allant de 0,8 à 22,4%. Lors d'une deuxième étude, des échantillons fécaux de deux exploitations identifiées comme contaminées par O157 au cours de la première étude et deux non contaminées furent de nouveau prélevés à 5 reprises sur une période de 3 mois. La proportion de troupeaux porteurs variait alors au cours du temps de 0 à 61% dans l'ensemble des 4 exploitations étudiées. Cette étude a montré que l'évaluation du portage en STEC O157 d'un élevage bovin ne peut pas être obtenue lors d'une seule visite. Par ailleurs, une récente étude a montré que chez des bovins naturellement contaminés, les durées d'excrétion en STEC O157 et en STEC O26 fluctuaient respectivement de 1 à 10 semaines, et de 1 à 3 semaines selon les animaux. Pour 10 g de fèces analysés, les taux excrétés variaient de 4 à 10⁵ UFC pour les STEC O157 et de 3 à 10³ UFC pour les STEC O26 (Widiasih *et al.*, 2004). Au cours d'une autre étude, Ohya et Ito, (1999) ont contaminé des veaux avec une souche d'*E. coli* O157:H7. Un veau a été désigné comme « *long-term shedder* » lié à une excrétion persistante en *E. coli* O157:H7 de plus de 31 semaines, avec des taux allant de 10 à 10⁴ UFC

g⁻¹. Par la suite, le terme de « *supershedder* » a été utilisé pour désigner les bovins ayant un taux persistant d'excrétion en *E. coli* O157:H7 supérieur à 10⁴ UFC g⁻¹ (Omisakin *et al.*, 2003). L'identification et la neutralisation de ces « *supershedders* » permettraient notamment de réduire efficacement la prévalence du portage d'*E. coli* O157:H7 au sein des troupeaux. Ceux-ci devraient être identifiés sur la base de plusieurs campagnes de prélèvements réalisées au cours d'une même année.

En définitive, le portage en STEC semble varier sous l'action de multiples facteurs dont l'impact individuel est difficile à apprécier. Cependant, il est important de connaître ces facteurs car chacun d'eux peut constituer un levier d'action pour la maîtrise du portage des STEC en élevage.

1.2. Les facteurs de variation du portage sain en STEC

1.2.1. Influence du type d'alimentation

a) Les vaches et/ou jeunes bovins

Le régime alimentaire des bovins conditionne la multiplication ou la survie des STEC dans leur tube digestif. Aux Etats-Unis, les conclusions semblent aller dans le sens d'une plus grande acido-résistance des *E. coli* excrétés dans les fèces chez les bovins nourris avec des céréales, par opposition à ceux ayant une alimentation fourragère (Couzin, 1998; Diez-Gonzalez *et al.*, 1998), l'acido-résistance favorisant la survie des STEC au cours du transit intestinal. Les études de Heuvelink *et al.* (1998), Jonsson *et al.* (2001), Rugbjerg *et al.* (2003) et Synge *et al.* (2003) ont montré qu'une alimentation riche en concentrés (céréales, mélasses...) et pauvre en fibres favorise l'excrétion en STEC O157. Ceci serait dû à une augmentation de la teneur en acides gras volatils et une diminution du pH stomacal qui favoriserait la croissance des STEC O157 dans le côlon et donc favoriserait leur excrétion. De nombreuses études ont mis en évidence la tolérance des STEC, et notamment *E. coli* O157:H7, à l'acidité (Glass *et al.*, 1992; Abdul-Raouf *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 1993). Plusieurs mécanismes de résistance à l'acidité ont été mis en évidence chez *E. coli* O157:H7 : un système oxydatif, un système arginine-dépendant et un système glutamate-dépendant (Lin *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 2000; Price *et al.*, 2000). Des études ont montré que la résistance aux conditions acides, mais également à la chaleur et à la salinité, dépendrait entre autres du régulateur général de réponse au stress codé par le gène *rpoS* (Cheville *et al.*, 1996; Price *et al.*, 2000).

Cependant, il n'existe pas de consensus concernant l'impact du régime alimentaire sur le niveau et la durée d'excrétion en STEC chez les bovins, et quelques études indiquent des résultats contradictoires. Ainsi, certains auteurs ont montré que des bovins nourris avec du fourrage excrètent plus longtemps la bactérie que ceux ayant reçus une alimentation à base de concentrés (Hovde *et al.*, 1999; Van Baale *et al.*, 2004). D'autres ont pointé le passage instantané d'un régime à base de concentrés à celui à base de fourrage comme une méthode efficace pour réduire (d'un facteur 1000) les populations d'*E. coli* excrétées dans les fèces des bovins (Diez-Gonzalez *et al.*, 1998). Ainsi, des études complémentaires sont nécessaires afin d'identifier les mécanismes par lesquels les régimes à base de fibres influent sur l'écologie des microorganismes présents dans le tractus digestif des bovins.

b) Les veaux au sevrage

Le sevrage des veaux est une étape critique sur le portage en STEC. Le risque d'infection serait significativement plus élevé parmi les veaux sevrés que les non sevrés (respectivement 12,4% contre 2,2%) (Rugbjerg *et al.*, 2003). Ces résultats sont similaires aux travaux précédemment effectués par Zhao *et al.* (1995), Garber *et al.* (1995) et Cobbold et Desmarchelier (2000). En Australie, les veaux au sevrage ont même été décrits comme étant les principaux réservoirs en STEC dans les exploitations laitières (Cobbold et Desmarchelier, 2000). L'explication la plus probable serait le changement du type d'alimentation qui entraînerait des modifications de la composition de la microflore intestinale, diminuant ainsi l'effet barrière vis-à-vis de la colonisation par des souches STEC.

1.2.2. Les saisons

Selon Besser *et al.* (1997), Hancock *et al.* (1997) et Garber *et al.* (1999), le pourcentage d'animaux porteurs de STEC O157:H7 serait plus important en été qu'en hiver et qu'au printemps. D'une manière générale, l'excrétion chez les animaux est transitoire et voisine d'un mois. D'autres auteurs ont observé de la même façon un pic d'excrétion en été et l'ont expliqué par un changement de régime alimentaire des animaux mis en pâture combiné à une forte contamination des champs par les fèces des bovins favorisant ainsi la contamination et/ou la recontamination des animaux (Heuvelink *et al.*, 1998). De plus, les conditions climatiques en été sont favorables à la survie et à la croissance des STEC O157 dans l'environnement. Même si la quantité d'animaux excréteurs en STEC serait plus importante en été, la durée de ce portage serait plus longue en hiver. Une étude menée entre 1995 et 1996

dans 4 élevages laitiers du Wisconsin (Etats-Unis) a permis le suivi de l'excrétion des souches d'*E. coli* O157:H7 chez des bovins (Shere *et al.*, 1998). Chez un même animal excréteur, elle pouvait durer pendant 4 mois l'hiver et seulement 1 mois l'été. La quantité d'*E. coli* O157:H7 dans les fèces variait entre 2×10^2 et $8,7 \times 10^4$ UFC g⁻¹ de matière fécale.

1.2.3. L'âge des bovins

De multiples travaux ont montré une association significative entre l'âge des animaux et leur portage en STEC. Wilson *et al.* (1998) ont montré que les veaux avaient un taux d'excrétion en STEC supérieur à celui des vaches. Comme indiqué précédemment, ce sont les veaux qui sont à l'âge du sevrage (entre 1 et 6 mois) qui présentent une excrétion élevée en STEC (Heuvelink *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2002; Rugbjerg *et al.*, 2003).

De plus, Cobbold et Desmarchelier (2000) ont mis en évidence que des jeunes veaux de 48-72 h d'âge peuvent excréter des STEC. Ceci supposerait une exposition accrue des veaux aux STEC, à la naissance. Ainsi, la question est de savoir si une transmission verticale d'une mère porteuse à son veau est possible. Précédemment, Garber *et al.* (1995) ont observé que les veaux qui descendent d'une mère porteuse en *E. coli* O157:H7 ont deux fois plus de chance d'excréter cette bactérie.

En outre, Wilson *et al.* (2002) ont montré que les veaux de plus de deux semaines présentent un portage supérieur par rapport aux veaux de moins de deux semaines. L'hypothèse avancée est que le colostrum consommé les jours suivant la naissance serait riche en immunoglobulines et permettrait une immunisation temporaire des veaux contre les STEC (Nielsen *et al.*, 2002; Rugbjerg *et al.*, 2003).

1.2.4. Les conditions d'alimentation et d'abreuvement des animaux

Les aliments et l'eau de boisson des animaux sont souvent à l'origine de l'introduction régulière de bactéries dans les cheptels (Hancock *et al.*, 2001). C'est au cours de l'alimentation et de l'abreuvement des animaux qu'ont lieu le plus souvent la contamination et la recontamination des animaux par les STEC (Kuhnert *et al.*, 2005). La salive serait à ce titre un vecteur non négligeable de contamination (Cobbold et Desmarchelier, 2002).

L'importance du portage fécal serait corrélée positivement à l'utilisation de seaux communs pour l'alimentation des bovins. Pour les jeunes veaux, l'utilisation de biberons de

lait ayant des tétines à titre individuel ou une alimentation via la mamelle de leur mère serait préférable à des abreuvoirs de lait collectifs (Wilson *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2002).

Les abreuvoirs d'eau destinée au bétail sont une source potentielle de contamination et de re-contamination des animaux (Faith *et al.*, 1996; Hancock *et al.*, 1998b; Shere *et al.*, 1998; Van Donkersgoed *et al.*, 2001). La survie d'*E. coli* O157:H7 dans les biofilms formés dans les abreuvoirs peut atteindre 245 jours (Hancock *et al.*, 2001; LeJeune *et al.*, 2001a).

Afin de limiter la contamination des animaux via les abreuvoirs, un accès individuel à l'eau serait préférable. Ainsi l'utilisation de tétine individuelle permettrait de diminuer le risque de transmission (Rugbjerg *et al.*, 2003). Enfin, la surchloration de l'eau pourrait induire une réduction du taux de contamination en STEC chez les bovins (Garber *et al.*, 1999).

1.2.5. Les conditions de logement des bovins

Les conditions d'hébergement jouent un rôle prépondérant dans l'importance de la prévalence du portage fécal en STEC des troupeaux de bovins. Ainsi, Garber *et al.* (1995), Synge *et al.* (2003) et Cobbold et Dermaschlier (2002) ont constaté une augmentation du risque de contamination lorsque les animaux sont groupés au sein d'un même enclos. De mauvaises conditions de logement telles que l'accumulation de fumier ou un sol humide dans les étables (Smith *et al.*, 2001), ainsi que le nettoyage des aires de stabulation des animaux par l'utilisation de jet d'eau et non par raclage à sec (Garber *et al.*, 1999) seraient associés à une excrétion accrue en STEC.

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 excrétaient encore la bactérie alors que ceux mis au pré n'en excrétaient plus (Jonsson *et al.*, 2001). Parmi les hypothèses avancées pour expliquer la persistance de l'excrétion chez les veaux gardés à l'étable, une réinfection régulière des veaux par transmission des STEC entre animaux a été suggérée. D'après Cobbold et Desmarchelier (2002), les sources de contamination les plus probables seraient la peau des bovins ainsi que les sols souillés.

1.2.6. Le stress des bovins

Le stress que subissent les animaux peut modifier l'écosystème intestinal. Ainsi, certains auteurs ont montré que de mauvaises conditions de logement, une carence nutritive

ou un stress lié au transport entraînent une augmentation de l'excrétion en STEC (Cray *et al.*, 1998).

1.2.7. L'introduction d'un animal extérieur au troupeau

L'apport d'animaux nouveaux au sein d'un troupeau augmenterait le portage fécal global des veaux ou des vaches de ce troupeau, probablement lié à une inter-contamination horizontale (Wilson *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2002). Cette transmission horizontale implique par conséquent que la bactérie survive lorsqu'elle est excrétée dans la matière fécale des bovins et dans l'environnement immédiat du troupeau.

1.3. Survie et croissance des STEC dans les fèces

L'activité microbienne dans les fèces de bovins ainsi que dans les effluents qui en dérivent (fumier et lisier) est régie par de nombreux paramètres : (i) les caractéristiques physico-chimiques de l'effluent telles que le pH ou le taux d'humidité ; (ii) la composition de l'effluent (pourcentage en fibres par exemple) ; (iii) l'importance des activités biologiques (antagonisme, compétition ou prédation), (iv) les facteurs climatiques avec entre autres les fluctuations de températures, les radiations solaires (UV) ou les événements de pluies ; (v) l'addition régulière de matières premières qui permet un renouvellement des éléments nutritifs et des populations microbiennes. Tous ces facteurs n'ont pas fait l'objet d'études approfondies, seul l'impact de quelques uns sur la survie des STEC dans les effluents d'élevages a été investigué.

Ainsi, Duffy (2003) a décrit que la survie d'*E. coli* O157:H7 dans des fèces de bovins est comprise entre 49 et 126 jours selon les conditions expérimentales. Une seule étude a décrit la persistance de STEC non O157 i.e. O26:H11 et O111:H, qui sont capables de survivre respectivement durant 16 et 10 semaines dans des fèces incubés à une température de 15°C (Fukushima *et al.*, 1999). Récemment, la survie d'*E. coli* O157:H7 a été investiguée dans des fèces de bovins directement inoculés en laboratoire ou après passage de la souche à travers le tractus digestif du bovin (Scott *et al.*, 2006). Les auteurs ont démontré que l'agent zoonotique est capable de survivre pendant plus de 97 jours dans la matière fécale, quelque soit la méthode d'inoculation employée.

Par ailleurs, le régime alimentaire des bovins semblerait avoir une influence sur la survie des STEC dans la matière fécale excrétée dans l'environnement. Wells *et al.* (2005) ont

montré qu'une forte teneur en acides phénoliques, composés communs aux fourrages, diminue significativement le taux de cellules viables d'*E. coli* O157:H7 dans les fèces de bovins. D'autres auteurs ont inoculé des fèces de bovins nourris avec du maïs ou de l'orge avec une souche d'*E. coli* O157:H7. Les fèces ont ensuite été incubés à 3 températures différentes : -10°C, 4°C et 22°C (Bach *et al.*, 2005). A -10°C, *E. coli* O157:H7 a été détecté pendant 35 jours dans les fèces des bovins nourris avec du maïs contre 49 jours dans les fèces des bovins alimentés avec de l'orge. Cette différence est principalement associée à la forte teneur en acides gras volatiles combinée à un pH < 6,5 dans les fèces des bovins nourris avec du maïs. A 4°C, *E. coli* O157:H7 est capable de survivre pendant au moins 56 jours quelque soit le traitement subi. Enfin à 22°C, *E. coli* O157:H7 est capable de survivre plus longtemps qu'aux deux autres températures, probablement du fait d'une diminution de la teneur en acides gras volatiles plus prononcée à cette température. Dans des conditions expérimentales bien différentes, Wang *et al.* (1996) ont décrit qu'*E. coli* O157:H7 survit mieux dans des fèces stockés 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.

En bref, les STEC ont la capacité de survivre durant de longues périodes dans les fèces des bovins. Les déjections des animaux émises dans les exploitations sont récupérées sous forme de lisier ou de fumier. Ainsi, il est important de définir la survie des STEC dans ces effluents.

2. Dans le lisier et le fumier d'origine bovine

Le lisier est un mélange de déjections animales solides et liquides avec quelques déchets de litière (ou sans litière), et sa teneur en matière sèche varie de 10 à 20%. Le fumier est quant à lui défini par un mélange de déjections animales solides et liquides avec de la litière. Ce mélange contient plus de 20 % de matière sèche (Conseil des appellations agroalimentaires du Québec, 2004). Dans cette partie, seules les données concernant la survie des STEC dans les effluents n'ayant subi aucun traitement spécifique ont été rapportées. Les traitements des effluents ainsi que le devenir des STEC au cours de ces procédés seront détaillés dans la 4^{ème} partie de ce manuscrit.

2.1 Prévalence des STEC dans le lisier et le fumier de bovins

Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la prévalence des STEC dans les effluents d'élevages bovins. En France, lors d'une étude visant à établir la prévalence des STEC dans différents types de déchets organiques, 10% (3/30) des échantillons de lisier ainsi que 11% (5/45) des échantillons de fumier testés étaient positifs pour les gènes *stx* après enrichissement (Vernozy-Rozand *et al.*, 2002). Aux Pays-Bas, Franz *et al.* (2007) ont obtenu des taux de prévalence beaucoup plus élevés après échantillonnage de fumier dans 25 exploitations laitières. Ils s'élevaient à 52% pour le gène *rfbE* (gène spécifique d'*E. coli* O157), 67% pour le gène *stx1* et 70 % pour le gène *stx2*. En comparaison, un taux plus faible a été obtenu en Suède pour le sérotype O157, puisque sur 125 fermes laitières visitées, seulement 16 possédaient du fumier contaminé par une souche STEC O157. Dans environ 8 % des cas, un isolat STEC O157 a pu être retrouvé (Eriksson *et al.*, 2005). De plus, lors d'une étude réalisée entre 2000 et 2002 en Angleterre, *E. coli* O157:H7 a été détecté dans 13,2 % des effluents bovins (non traités) testés, à un taux moyen de $1,2 \times 10^3$ UFC g⁻¹ (Hutchison *et al.*, 2005).

2.2 Survie des STEC dans le lisier et le fumier de bovins

Aucune donnée n'est actuellement disponible concernant la survie des STEC non-O157 dans le lisier et le fumier de bovins. Les données présentées ci-dessous concernent uniquement *E. coli* O157:H7.

2.2.1. Dans le lisier

E. coli O157:H7 est capable de survivre pendant un laps de temps important dans du lisier bovin. En conditions de laboratoire, McGee *et al.* (2001) ont montré qu'*E. coli* O157:H7 peut survivre durant au moins 12 semaines dans du lisier incubé à 10°C. De même, Nicholson *et al.* (2005) ont montré qu'*E. coli* O157:H7 persiste pendant plus de 3 mois dans du lisier bovin inoculé à un taux de 5,2 log UFC ml⁻¹ et stocké à une température inférieure à 20°C. Comme dans les fèces, les basses températures favorisent la survie d'*E. coli* O157:H7 dans le lisier. En effet, Kudva *et al.* (1998) ont montré que le nombre de cellules viables d'*E. coli* O157:H7 diminue de 10⁷ UFC ml⁻¹ à des taux non détectables en 5 jours dans du lisier bovin incubé à 23°C contre 28 jours dans du lisier incubé à 4 ou -20°C. Dans des conditions environnementales, Hutchison *et al.* (2005) ont montré au contraire que le déclin d'*E. coli* O157:H7 dans différents types de lisiers bovins est similaire quelque soit la saison de

stockage (D-values de 21,6 en hiver contre 24,9 jours en été) et le taux d'humidité des lisiers testés. Par ailleurs, la composition chimique globale du lisier semble influencer significativement la survie des bactéries (Avery *et al.*, 2005). Ces travaux n'ont cependant pas permis de cibler un élément chimique en particulier du fait de la grande disparité des lisiers utilisés. Ainsi, après 64 jours de stockage à 10°C, *E. coli* O157:H7 inoculé à 10^7 UFC cm⁻³ était encore détecté dans la plupart des lisiers testés à des taux de 10^2 UFC cm⁻³.

2.2.2. Dans le fumier

Là encore, *E. coli* O157:H7 montre une grande capacité à survivre dans ce type d'effluent. Ainsi, il peut se multiplier dans du fumier humide de bovin maintenu à 37°C : après inoculation à un niveau de $7,84 \pm 0,1 \log_{10}$ UFC g⁻¹, la quantité de bactéries dénombrées après 3 jours est de $6,52 \pm 0,32$ UFC g⁻¹, et de $8,25 \pm 0,05 \log_{10}$ UFC g⁻¹ après 5 jours (Delazari *et al.*, 1998). A des échelles de temps plus importantes, la bactérie est progressivement inhibée au cours du temps. Ainsi, il a été montré que des cellules d'*E. coli* O157:H7 sont capables de survivre pendant plus d'un an dans du fumier d'ovins exposé à des conditions environnementales (Kudva *et al.*, 1998). Contrairement aux lisiers et aux fèces, *E. coli* O157:H7 survivrait plus longtemps dans du fumier incubé à température ambiante. Une étude réalisée dans des conditions de laboratoire a permis d'évaluer le temps de réduction décimale pour une population d'*E. coli* O157:H7 inoculée dans du fumier bovin maintenu à différentes températures (Himathongkham *et al.*, 1999). A 4°C, le temps de réduction décimale est évalué à 9 jours en surface et à 18,5 jours en profondeur. A 20°C, les valeurs sont respectivement de 21,6 jours et 13,5 jours ; à 37°C, elles sont de 8,9 jours et 3,58 jours. Cependant les conditions de laboratoire sont assez éloignées des conditions *in situ*, notamment pour le fumier où l'élévation de température consécutive à la dégradation aérobie de la matière organique joue un rôle important dans l'inactivation des bactéries pathogènes. Ce procédé ne pouvant se faire que dans des tas de fumier de volume raisonnable.

La prédation par les protozoaires joue un rôle important dans la régulation des populations bactériennes présentes dans le fumier. En grand nombre, ils constituent de véritables réservoirs pour les bactéries pathogènes, notamment pour *E. coli* O157:H7. En effet, une étude a montré que cet agent zoonotique est capable de survivre durant une période conséquente après avoir été ingéré par des protozoaires (Barker *et al.*, 1999).

La composition du fumier semble affecter la survie d'*E. coli* O157:H7. Dans du fumier de bovins ayant reçu un régime à base d'ensilage d'herbe, la bactérie a été détectée pendant plus

de 133 jours contre 84 jours dans du fumier de bovins nourris avec de la paille (Franz *et al.*, 2005). Dans cette étude, le déclin du pathogène est positivement corrélé avec des pH élevés ($P=0,003$) ainsi qu'avec l'importante quantité du contenu en fibres ($P=0,017$).

En conclusion, les STEC, et en particulier *E. coli* O157:H7, possèdent une importante capacité à survivre dans les effluents. Ceci est un pré-requis indispensable à leur dissémination dans l'environnement immédiat de la ferme. Plusieurs études ont apprécié le degré de contamination en STEC des exploitations laitières et ont observé la survie de ces microorganismes sur de nombreux supports rencontrés dans les exploitations.

3. Dissémination et survie des STEC au sein des exploitations bovines

3.1. Prévalence et diversité des supports contaminés par les STEC

En France, aucune donnée n'est à l'heure actuelle disponible sur ce point. Aux Etats-Unis (Rahn *et al.*, 1997) et en Australie (Cobbold et Desmarchelier, 2000), 14,1% et 4,1% des supports échantillonnés au sein des exploitations étaient respectivement contaminés par des STEC. Récemment, le sérotype O157:H7 a été isolé dans 9 des 594 (1,5%) échantillons environnementaux prélevés dans une même exploitation laitière (Schouten *et al.*, 2005).

De nombreux supports sont colonisés par les STEC dans une même exploitation (Cobbold et Desmarchelier, 2000). Wilson *et al.* (1992) ont montré que le niveau de contamination de l'environnement de la ferme serait corrélé positivement à la prévalence de la contamination en STEC du troupeau. Ainsi, plus le portage fécal en STEC serait quantitativement important, plus la contamination environnementale des exploitations serait elle-même importante. La dissémination des STEC dans l'environnement de la ferme peut impliquer un contact direct entre les animaux et suggère fortement l'intervention de différents substrats dans la contamination des animaux. Les abreuvoirs constituent des sources majeures de contamination et de re-contamination des bovins, notamment par la salive qui jouerait le rôle de vecteur de contamination (Faith *et al.*, 1996; Hancock *et al.*, 1998b; Shere *et al.*, 1998; Van Donkersgoed *et al.*, 2001; Cobbold et Desmarchelier, 2002). D'autres, ont mis en évidence différentes sources de contamination tels le cuir des bovins, les aires de couchage des animaux ou encore les bacs d'alimentation collectifs (Shere *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998; Cobbold et Desmarchelier, 2002; Wilson *et al.*, 2002; Das *et al.*, 2005; Doane *et al.*, 2007). Les autres circulations des souches entre les diverses matrices étudiées s'expliqueraient essentiellement par des pratiques d'hygiène défectueuses au sein des exploitations.

3.2. Survie des STEC dans l'environnement de la ferme

Les données présentées ci-dessous concernent uniquement *E. coli* O157:H7. Elles montrent notamment que la bactérie est capable de persister plusieurs semaines voire plusieurs mois dans l'environnement de la ferme, notamment dans de l'ensilage et dans les sédiments d'abreuvoirs.

Ainsi dans de la litière à base de pailles de cèdre incubée à une température ambiante de 25°C, *E. coli* O157:H7 préalablement inoculé à 10^6 - 10^7 UFC g⁻¹ serait capable de survivre pendant 35 jours. Dans les mêmes conditions, il persisterait pendant 60 jours dans de l'ensilage d'herbe (Davis *et al.*, 2005). Des travaux précédents ont suggéré que la contamination de l'herbe par des fèces d'animaux couplée à de mauvaises conditions d'ensilage, favorise la persistance d'*E. coli* O157. Ainsi, une étude réalisée sur des ensilages artificiellement contaminés à un niveau de 10^3 UFC g⁻¹ a permis de mettre en avant la capacité d'*E. coli* O157 à croître lorsque de mauvaises conditions de stockage sont utilisées (humidité importante par exemple) (Fenlon et Wilson, 2000). Les échantillons analysés ont été préparés dans des sacs plastiques et incubés à 20°C. En conditions d'aérobiose et en 1 semaine, le nombre de cellules d'*E. coli* O157 est passé de 10^3 à 10^7 UFC g⁻¹. Cette tendance à l'augmentation du nombre de pathogènes s'inverse légèrement au fur et à mesure que le pH s'abaisse.

En outre, sur de l'ensilage d'herbe contaminé par *E. coli* O157 (contamination artificielle à environ 3×10^3 UFC g⁻¹), et dans des conditions permettant une dégradation aérobie, à 20°C, *E. coli* O157 peut se multiplier jusqu'à des valeurs de l'ordre de 10^6 UFC g⁻¹ (Fenlon *et al.*, 2000). Une autre étude montre que le lactate produit par deux souches bactériennes, appartenant aux espèces *Pediococcus pentosaceus* et *Propionibacterium jensenii*, provoquerait une diminution du pH durant l'ensilage, ce qui accélérerait l'élimination d'*E. coli* O157:H7 (Bach *et al.*, 2002). Dans les conditions testées, *E. coli* O157:H7 n'est plus détectable après 7 jours. Dans des conditions identiques mais en absence de ces souches productrices de lactate, *E. coli* O157:H7 a été détecté jusqu'à une période de 15 jours.

Finalement, des essais ont été réalisés pour mimer la survie d'*E. coli* O157 dans les sédiments d'un réservoir d'eau pour animaux (Hancock *et al.*, 2001; LeJeune *et al.*, 2001a). Les *E. coli* O157:H7 présents à 9.10^8 UFC g⁻¹ dans un mélange « sédiments et fèces » ont survécu pendant au moins 245 jours. Une autre étude évoque la possibilité de prolifération bactérienne dans les sédiments des abreuvoirs (LeJeune *et al.*, 2001b) à une température de 20°C.

Des études plus approfondies visant à comprendre pourquoi tel ou tel substrat favorise la survie des STEC devraient être conduites. Certaines structures permettraient une protection physique des STEC vis-à-vis des microorganismes antagonistes ou de tout stress environnemental. Il est probable que la présence d'une flore indigène influence favorablement ou négativement la survie des STEC sur certains substrats. Enfin, l'apport régulier d'éléments nutritifs (via les matières fécales) aux cellules bactériennes joue un rôle important dans le maintien des populations de STEC.

Les STEC semblent pouvoir survivre pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois dans l'environnement de la ferme, mais quel est leur devenir dans les sols, les végétaux et l'eau ? Cette question est débattue dans la partie suivante.

Points clés à retenir

- ✓ **Les études réalisées chez les bovins montrent un portage en STEC élevé. Au sein d'une même exploitation jusqu'à 100% des bovins peuvent être porteurs sains. Les veaux constituent un réservoir important de la bactérie (notamment au cours du sevrage). L'identification des « *supershedders* » permettrait de maîtriser le risque STEC au sein des élevages.**
- ✓ ***E. coli* O157:H7 survie pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois dans les effluents d'élevages bovins.**
- ✓ **Aucune donnée n'est disponible concernant la survie des STEC non-O157 dans le lisier et le fumier de bovins.**
- ✓ **L'environnement de la ferme représente un important réservoir de souches STEC. Aucune donnée n'est actuellement disponible concernant la prévalence et la dissémination des STEC dans les exploitations bovines laitières en France.**

TROISIÈME PARTIE : SURVIE ET TRANSFERT DES STEC DANS LES COMPARTIMENTS ENVIRONNEMENTAUX : LE SOL, L'EAU ET LES VÉGÉTAUX

La contamination fécale est la principale source de contamination de l'environnement principalement par le biais des déjections des ruminants. Les animaux domestiques ainsi que la faune sauvage tels les pigeons (Morabito *et al.*, 2001), les lapins (Scaife *et al.*, 2006) ou les cerfs (Asakura *et al.*, 1998) constituent également d'importants réservoirs de ces bactéries (Beutin, 2006).

De plus, la longue survie des STEC dans les fèces des bovins, laquelle peut atteindre 18 semaines à 15°C (Fukushima *et al.*, 1999), contribue au risque de dissémination du pathogène dans l'environnement, notamment à travers l'épandage des fumiers ou des lisiers. Actuellement, cette procédure est devenue une pratique courante dans la plupart des exploitations. Plus qu'un moyen d'entreposage des déchets organiques associés aux troupeaux, cela permet de fertiliser les sols destinés aux cultures maraîchères (Pell, 1997).

Cette partie a donc pour objectif de définir en détail les facteurs clés de la survie des STEC dans les sols, l'eau et les végétaux. Un accent particulier sera également mis sur la dynamique de transfert des STEC dans et entre ces différents compartiments. Encore une fois, outre le peu de données disponibles, la plupart des études existantes ne portent que sur *E. coli* O157:H7.

1. Survie des STEC dans l'environnement

1.1 Survie des STEC dans le sol

Les sols, constitués d'un mélange de sables minéraux inertes (silicates, carbonates, etc.), de limons, de particules colloïdales inorganiques (argiles) ou organiques (humus, fragments végétaux ou animaux en décomposition), forment un milieu extrêmement favorable au développement des microorganismes.

Durant ces dix dernières années, de nombreux travaux de recherche ont permis d'enrichir la littérature concernant l'écologie des STEC et plus particulièrement d'*E. coli* O157:H7 dans le sol. Il apparaît que cet agent zoonotique est capable de persister dans cet écosystème pendant plusieurs mois. Les principales données disponibles, concernant la survie d'*E. coli* O157:H7 dans du sol modifié ou non par ajout de matière organique, ont été répertoriées dans

le Tableau 5. Elles diffèrent considérablement selon les conditions expérimentales, allant de 25 à plus de 231 jours. Ces données corréleront positivement avec celles obtenues pour des *E. coli* commensaux qui sont capables de survivre dans des sols argileux/limoneux (AL) et limoneux (L) exposés à des cycles de températures de 22°C pendant 10h et de 9°C pendant 14 h (Lau et Ingham, 2001). Ces auteurs ont ainsi montré que juste après l'inoculation (1 jour), les bactéries se multiplient de 1 à 2 log₁₀ UFC g⁻¹ puis leurs nombres diminuent respectivement de 1 et 2 log₁₀ UFC g⁻¹ dans les sols AL et L durant les 12 semaines d'expérimentation.

Tableau 5 : Survie d'*E. coli* O157:H7 dans différents types de sols fertilisés ou non par des déjections animales.

Type et/ou texture du sol	Inoculum (UFC g ⁻¹)	Apport de déjections animales	Survie STEC (jours)	Références
Argileux	10 ⁵	-	175	(Fenlon <i>et al.</i> , 2000)
Argileux/limoneux	10 ³ -10 ⁴	+	31	(Nicholson <i>et al.</i> , 2005)
Limoneux-sableux	<10 ²	+	105	(Ogden <i>et al.</i> , 2002)
Sableux-limoneux	10 ⁶	+	> 213	(Islam <i>et al.</i> , 2004b)
Sableux	10 ⁵	-	56	(Fenlon <i>et al.</i> , 2000)
Sableux	10 ³ -10 ⁴	+	31	(Nicholson <i>et al.</i> , 2005)
Sol (texture non définie)	10 ⁸	-	> 130	(Maule 2000)
Sol de prairie (texture non définie)	10 ⁸	+	> 99	(Bolton <i>et al.</i> , 1999)
Sol de prairie (texture non définie)	10 ⁷	+	231	(Jiang <i>et al.</i> , 2002)
Sol en jachère (limoneux, argileux ou sableux)	10 ⁶	-	25 à 41	(Gagliardi et Karns 2002)
Sol cultivé avec du seigle (limoneux, argileux ou sableux)	10 ⁶	-	92 à 96	(Gagliardi et Karns 2002)
Sol cultivé (texture non définie)	10 ³ -10 ⁴	+	69	(Mukherjee <i>et al.</i> , 2006)
Terreau	10 ⁵	-	175	(Fenlon <i>et al.</i> , 2000)

En général, les populations bactériennes allochtones dans les sols sont affectées par de multiples facteurs dont :

- ✓ les propriétés édaphiques du sol, notamment : teneur du sol en eau et en oxygène, en argiles et sables (texture), taux de matière organique, pH ;
- ✓ les facteurs climatiques, notamment : humidité de l'air, température, radiations solaires, pluies ;
- ✓ les interactions biotiques, notamment : la compétition, l'antagonisme et la prédation.

La plupart de ces paramètres vont être repris et détaillés ci-dessous.

1.2 Facteurs affectant la survie des STEC dans le sol

1.2.1. La texture et la structure du sol

Un sol est d'abord caractérisé par sa texture et sa structure. La texture d'un sol est la résultante du mélange argile, sable, limon, dont les pourcentages varient d'un sol à l'autre. La structure correspond quant à elle à la façon dont les minéraux sont agencés. On distingue notamment la structure fragmentaire, particulaire et compacte. Ces deux paramètres vont fortement conditionner les propriétés physiques et chimiques d'un sol (notamment celles liées à l'eau) et par la même influencer la biocénose qu'il abrite. Ainsi, le taux d'humidité d'un sol tout comme la disponibilité des éléments nutritifs dépendent fortement de la texture du sol, plus particulièrement de la distribution et de la taille des particules, mais également du taux de matière organique (Jamieson *et al.*, 2002). En effet, des niveaux élevés de matière organique et/ou d'argile augmentent la rétention des éléments nutritifs et des particules d'eau au niveau des microagrégats du sol (Figure 10), et favorise par la même l'adhérence et la survie des microorganismes en leur sein. Berry et Miller (2005) ont démontré que l'apport de fumier modulerait la quantité d'eau libre disponible pour la croissance d'*E. coli* O157:H7. A un taux d'humidité de $0,43 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$ dans du sol mélangé à 25% de fumier, les populations bactériennes augmentent de $2 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ en 3 jours alors qu'en présence d'un taux de fumier de 75%, les populations restent stables pendant toute la durée de l'expérimentation (14 jours).

De plus, la matière organique et tout autre agent stabilisant permettent de maintenir la structure d'un sol, notamment la porosité et l'arrangement des particules de sable, de limon et d'argile. Dans les sols présentant une bonne circulation de l'air, de l'eau et des nutriments à travers ces pores, la disponibilité de ces éléments pour les microorganismes est favorisée

(Acton et Gregorich, 1995). A l'inverse les sols de type sableux sont généralement composés de particules non cohésives qui retiennent très peu la matière organique et sont par conséquent défavorables à la survie des microorganismes. Nicholson *et al.* (2005) et Fenlon *et al.* (2000) ont montré que la survie d'*E. coli* O157:H7 est inférieure dans un sol sableux par rapport à des sols argileux ou limoneux. Dans des conditions environnementales, *E. coli* O157:H7 est capable de survivre pendant 4 mois dans des sols argileux et limoneux contre seulement 8 semaines dans un sol sableux (Fenlon *et al.*, 2000).

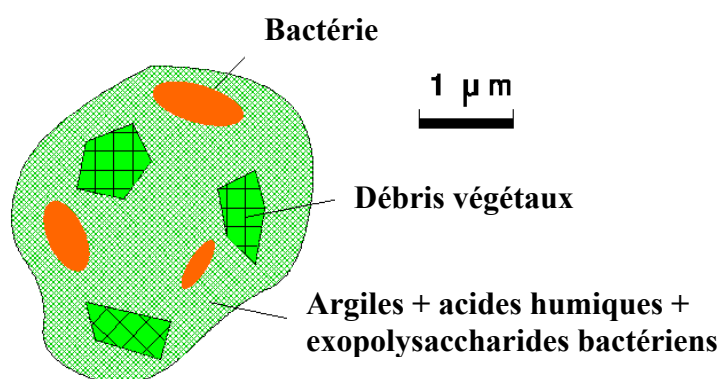


Figure 10 : Détails d'un microagrégat de sol.

1.2.2. Les propriétés physico-chimiques du sol

a) Le taux d'humidité

De nombreux chercheurs ont suggéré que le principal facteur affectant la survie des entérobactéries dans le sol est le taux d'humidité (Crane *et al.*, 1981; Entry *et al.*, 2000). Tate (1978) a montré que la survie des populations d'*E. coli* est plus élevée dans du sol régulièrement inondé. Cependant, bien qu'un faible taux d'humidité du sol soit probablement un facteur limitant du développement des STEC, il ne semble pas l'être pour leur survie. Berry et Miller (2005) ont testé l'impact de différentes teneurs en eau d'un sol incubé à 19°C sur la survie d'*E. coli* O157:H7. Jusqu'à une valeur seuil de 0,25 g H₂O g⁻¹, aucune différence significative n'a été observée entre les cinétiques de survie. Lors d'une autre étude, *E. coli* O157:H7 était encore détecté dans du sol fertilisé avec du fumier même à des teneurs en eau inférieures à 1% (Jiang *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'eau, même dans des sols apparemment secs, peut-être présente en quantité suffisante, pour les microorganismes. En effet, une partie de l'eau, généralement non disponible pour les plantes, est adsorbée en un film fortement adhérent à la surface des particules du sol, permettant l'établissement des microorganismes.

b) Le pH

Peu d'études se sont penchées sur l'effet du pH du sol sur la survie des STEC. Jiang *et al.* (2002) suggèrent que des valeurs basiques de pH (autour de 8 unités) semblent favoriser la survie d'*E. coli* O157:H7. De même, Sjogren (1994) a montré qu'*E. coli* survit mieux dans des sols présentant des valeurs de pH neutre ou basique que dans des sols acides présentant des textures et des taux de matières organiques identiques.

1.2.3. L'apport d'éléments nutritifs

Les populations de STEC dans le sol vont être dans la plupart des cas affectées par le type et la quantité d'effluents amendés sur le sol. Cependant, l'apport de fumier ne va pas systématiquement favoriser la survie des entérobactéries, notamment dans le cas d'un sol riche en éléments nutritifs. Gagliardi et Karns (2002) ont montré que l'ajout de fumier sur un sol en jachère n'a aucun effet significatif sur la survie d'*E. coli* O157:H7, que ce soit dans un sol argileux, limoneux ou sableux, en particulier du fait de leurs teneurs élevées en éléments nutritifs. De plus, l'application intensive de fumier au sol résulte généralement en une forte inactivation d'*E. coli* O157:H7, étroitement liée à l'augmentation des flores prédatrice, compétitive et/ou antagoniste (Jiang *et al.*, 2002). Peu de travaux ont été réalisés afin de définir la survie des STEC dans un même sol traité avec différents types d'effluents. Islam *et al.* (2004a) n'ont décrit qu'une légère différence entre les taux de survie d'*E. coli* O157:H7 obtenus dans un sol fertilisé avec différents types de compost (i.e. compost issu de bovins laitiers, compost stabilisé par traitement chimique alcalin ou compost de volailles). Au contraire, Williams *et al.* (2007b) ont montré que la survie d'*E. coli* O157:H7 est supérieure dans du sol fertilisé avec du contenu d'estomac que dans ceux traités avec du lisier bovin, bien que cette différence s'annulait au cours du temps.

1.2.4. Les conditions climatiques

Les aléas climatiques tels que les fluctuations de températures et les radiations solaires (UV) (Yaun *et al.*, 2003) peuvent affecter négativement la survie des STEC dans le sol. De plus, les événements de pluies (responsables de transfert des bactéries à travers les eaux de ruissellement ou de percolation) peuvent mobiliser une importante quantité du stock bactérien présent dans les sols.

De nombreux auteurs ont décrit un effet positif des faibles températures sur la survie d'*E. coli* O157:H7 dans le sol, principalement due à un ralentissement du métabolisme cellulaire

du pathogène et par la même de toutes les activités compétitives et/ou antagonistes des bactéries indigènes du sol (Ogden *et al.*, 2001; Gagliardi et Karns, 2002; Islam *et al.*, 2004a). Au contraire, Jiang *et al.* (2002) ont montré qu'*E. coli* O157:H7 inoculé dans un mélange sol/fumure n'est plus détectable après 231 jours à 21°C contre seulement 77 jours à 5°C. De même, Mukherjee *et al.* (2006) ont montré que le déclin de ce sérotype est plus élevé à 4°C qu'à température ambiante (10 contre 92 jours). Mais il est possible que d'autres facteurs que la température aient influencé la survie du pathogène dans ces différentes études.

1.2.5. Les interactions microbiennes

a) La compétition et l'antagonisme

La survie des STEC dans le sol est plus ou moins contrôlée par des interactions complexes de type compétitive et/ou antagoniste avec les microorganismes indigènes du sol.

La compétition peut résulter de l'utilisation commune par plusieurs microorganismes de substrats azotés ou carbonés. Lors d'une récente étude, le déclin d'*E. coli* O157:H7 était plus faible dans un mélange sol/fumier autoclavé que dans un système non autoclavé (Jiang *et al.*, 2002). D'autres travaux ont montré que la co-inoculation d'*E. coli* O157:H7 et d'un compétiteur *Enterobacter asburiae* au niveau des racines de plantules d'*Arabidopsis thaliana* entraîne une diminution significative du nombre de cellules d'*E. coli* O157:H7 (Cooley *et al.*, 2003).

L'antagonisme, interaction impliquant la synthèse par l'un des microorganismes d'une substance présentant un caractère antimicrobien, est plus rarement évoqué. Cependant, c'est un mécanisme mis en place par de nombreuses bactéries du sol associées ou non aux plantes. Par exemple, certaines bactéries telluriques telles que les *Pseudomonas* fluorescents (Keel *et al.*, 1992; Isnansetyo *et al.*, 2003; Weller *et al.*, 2007) ou les *Streptomyces* (Yuan et Crawford, 1995) sont capables de produire une large gamme de molécules aux propriétés antibiotiques. Outre, la production d'antibiotiques, de nombreuses PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) sont de plus capables d'induire une résistance systémique chez la plante, ce qui diminue le développement des microorganismes phyto-pathogènes (Keel *et al.*, 1992).

Ces phénomènes d'interactions sont amplifiés dans la rhizosphère. Elle constitue la région du sol directement influencée par les racines des plantes et les microorganismes associés. C'est une zone riche en éléments nutritifs exsudés (protéines, sucres...) par la plante par le biais d'un processus appelé rhizodéposition. Dans cet écosystème où les interactions biotiques sont nombreuses, la persistance d'*E. coli* O157:H7 semble cependant peu altérée. En effet,

une étude a montré des temps de survie quasiment identiques d'*E. coli* O157:H7 dans un sol nu et dans un sol rhizosphérique de maïs (Williams *et al.*, 2007b).

b) La prédation

L'importance de la prédation par les protozoaires dans le sol et leur activité de contrôle sur les différentes populations bactériennes du sol ont été largement décrites depuis ces dernières décennies. Cependant, *E. coli* O157:H7 est capable de survivre et de se multiplier dans différents organismes de la mésofaune du sol. Plusieurs études ont permis de le localiser dans un protozoaire fréquemment retrouvé dans l'environnement, *Acanthamoeba polyphaga* (Barker *et al.*, 1999) ou dans un nématode du sol, *Caenorhabditis elegans* (Kenney *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2006). Les protozoaires étant largement répandus dans l'environnement, ils constituent par conséquent un important réservoir environnemental pour la transmission d'*E. coli* O157:H7. Des études réalisées sur d'autres bactéries pathogènes ont montré qu'après libération des cellules par les protozoaires, elles peuvent acquérir des propriétés de résistance aux conditions extérieures (King *et al.*, 1998), aux agents biocides (Barker *et al.*, 1992) et aux antibiotiques (Barker *et al.*, 1995), et que leurs propriétés de virulence et d'adhésion sont stimulées (Cirillo *et al.*, 1999).

1.3 Survie des STEC dans l'eau

Les différentes épidémies impliquant l'eau ont motivé les chercheurs à évaluer la survie des STEC dans le milieu aquatique.

1.3.1. Dans les eaux d'abreuvoir

L'eau de boisson des animaux peut jouer un rôle important lors de la dissémination horizontale du pathogène dans les troupeaux de bovins. Hancock *et al.* (1998a) ont étudié la survie d'*E. coli* O157:H7 dans de l'eau d'abreuvoir de plusieurs fermes aux Etats-Unis. Cette survie est d'au moins 4 mois. D'autres études ont montré des taux de survie plus faibles. Ainsi, dans l'eau de boisson de bovins laitiers, la persistance du pathogène préalablement inoculé à 5×10^3 UFC ml⁻¹ est de 16 jours (durée de l'étude) aux deux températures d'incubations testées i.e. 5°C et 15°C (Rice et Johnson 2000). De même, McGee *et al.* (2002) ont montré que dans de l'eau de ferme stockée à l'extérieur, *E. coli* O157:H7 inoculée à 10^6 UFC ml⁻¹ est capable de survivre pendant 14 jours à des températures n'excédant pas 15°C. Récemment, Scott *et al.* (2006) ont montré que la survie d'*E. coli* O157:H7 dans de l'eau

d'abreuvoir est supérieure lorsque les cellules ont transité dans l'appareil digestif des bovins, avec des temps de survie atteignant près de 4 mois (109 jours).

1.3.2. Dans les eaux de surface et l'eau potable

a) Dans l'eau de mer

Certaines études ont montré la présence des gènes *stx1* et *stx2* dans l'eau de mer (Miyagi *et al.*, 2001), mais aucune souche n'a pu être isolée. L'une des hypothèses avancées fût le passage à un état viable mais non cultivable des cellules, comme l'ont précédemment rapporté Kogure et Ikemoto (1997) ainsi que Wang et Doyle (1998) dans de l'eau douce. Par ailleurs, le matériel détecté pourrait être de l'ADN libre ou des bactériophages portant les gènes *stx*.

De manière surprenante, des taux de survie assez élevés ont été obtenus dans de l'eau présentant une forte salinité. En effet, Miyagi *et al.* (2001) ont montré qu'*E. coli* O157:H7 survit pendant au moins 15 jours dans de l'eau de mer et qu'il peut même se multiplier dans un milieu contenant 5% de NaCl. Néanmoins, l'activité métabolique du pathogène diminue avec l'augmentation de la concentration en sel du milieu (Williams *et al.*, 2007a).

b) Dans l'eau des cours d'eau, lacs et réservoirs d'eau potable

De nombreux travaux ont mis en évidence la survie d'*E. coli* O157:H7 dans les réservoirs d'eau douce. La survie de 5 souches d'*E. coli* O157:H7 inoculées à 10^3 UFC ml⁻¹ dans des échantillons d'eau potable ou d'eau de lac entreposée à 8, 15 et 25°C a été évaluée par Wang et Doyle, (1998). La survie du pathogène est d'autant plus longue que la température de stockage est elle-même plus basse confirmant les conclusions apportées par une étude précédente de Rice *et al.*, (1992). A 8°C, la population d'*E. coli* O157:H7 diminue de 2 unités décimales après 91 jours d'incubation alors qu'à 15 et 25°C, le pathogène ne serait pas détecté après 14 et 21 jours. De plus, Wang et Doyle (1998) ont observé une plus longue survie dans de l'eau municipale filtrée et autoclavée, mettant ainsi en évidence l'effet inhibiteur de la microflore indigène de l'eau sur la survie d'*E. coli* O157:H7. Lors d'une récente étude, un effet significatif de la prédation par les protozoaires sur la survie d'*E. coli* O157:H7 dans de l'eau de puits a été révélé (Rebekka et Artzaa, 2002).

En outre, Lisle (1998) a montré que des cellules d'*E. coli* O157:H7 placées dans des conditions de carence nutritive peuvent devenir plus résistantes à la désinfection au chlore, ce qui pose un sérieux problème en santé publique car une telle résistance pourrait se développer

dans les sources d'eau potable. Lisle (1998) a évoqué également la possibilité qu'a *E. coli* O157:H7 de survivre à des procédés utilisés en routine pour la purification de l'eau tels que la coagulation, la floculation, la filtration et la désinfection. Ces résultats suggèrent que la bactérie pourrait survivre facilement dans les systèmes de distribution d'eau potable.

c) Dans l'eau commercialisée en bouteille

Warburton *et al.* (1998) ont mis en évidence la survie prolongée d'*E. coli* O157:H7 dans de l'eau embouteillée. Cette eau a étéensemencée avec 10 souches différentes d'*E. coli* O157:H7 à des niveaux de 10^3 et 10^6 UFC ml^{-1} et entreposée à 22°C. Il est possible de dénombrer des cellules viables d'*E. coli* O157:H7 dans l'eau minérale ou l'eau de source après plus de 300 jours. Les auteurs ont supposé que la survie de ce pathogène dans des milieux avec très peu d'éléments nutritifs est rendue possible par la capacité de l'organisme à former des biofilms sur la surface interne des bouteilles en polyéthylène. Cette adhésion est clairement visible lors d'observations réalisées en microscopie électronique. Une fois installées dans des biofilms, les bactéries *E. coli* O157:H7 seraient capables d'utiliser des éléments nutritifs relargués suite à la lyse des microorganismes constitutifs du biofilm. De plus, Kerr *et al.* (1999) ont confirmé également la survie prolongée d'*E. coli* O157:H7 dans l'eau minérale. Cette survie semble être plus importante dans l'eau minérale naturelle que dans l'eau distillée désionisée et l'eau minérale naturelle stérilisée. Lorsque l'inoculum est de 10^3 UFC ml^{-1} , la persistance du pathogène à 15°C est de 70 jours pour l'eau minérale naturelle, 49 jours pour l'eau minérale naturelle stérilisée et de 21 jours pour l'eau distillée désionisée. Ces auteurs indiquent que la surveillance d'*E. coli* dans l'eau minérale naturelle embouteillée devrait être réalisée par les industriels compte tenu de la dose infectieuse basse et de la survie prolongée du pathogène dans des milieux très pauvres en éléments nutritifs.

Le sol et l'eau constituent deux vecteurs potentiels de contamination des végétaux par les STEC, déjà à l'origine de nombreuses épidémies. L'écologie des STEC sur les végétaux est décrite dans le paragraphe ci-dessous.

1.4 Survie, adhérence et internalisation des STEC dans les végétaux

1.4.1. Survie des STEC sur les végétaux

En général, les plantes sont considérées comme un habitat hostile pour les bactéries entériques (Brandl, 2006). Cependant, de nombreuses études effectuées en conditions de

laboratoire ont montré une survie élevée d'*E. coli* O157:H7 à la surface ou dans une large variété de fruits et légumes (Islam *et al.*, 2004b; Jablasone *et al.*, 2005; Stine *et al.*, 2005), mais aussi sur de nombreuses herbes aromatiques (Hsu *et al.*, 2006). Sur les parties comestibles des oignons et des carottes, le nombre de cellules d'*E. coli* O157:H7 diminue respectivement de 2 log₁₀ UFC g⁻¹ en 64 jours et de seulement 1,7 log₁₀ UFC g⁻¹ en 84 jours (Islam *et al.*, 2004b). Enfin, Jablasone *et al.* (2005) ont inoculé des graines de divers fruits et légumes « prêts à être consommés » (carottes, laitues, radis, épinards et tomates) avec une souche d'*E. coli* O157:H7 à un taux de 3,3-4,7 log₁₀ UFC g⁻¹. Les graines ont ensuite été placées dans un tube en verre contenant un milieu nutritif hydroponique. Le pathogène se multiplie dans un laps de temps très court après la germination des graines, pour atteindre des concentrations de l'ordre de 5,5-6,5 log₁₀ UFC g⁻¹. Quelque soit le type de graines utilisé, il persiste à des valeurs de plus de 6 log₁₀ UFC g⁻¹ durant 49 jours à la surface des plantes.

Par ailleurs, les conditions de stockage influent également sur la survie d'*E. coli* O157:H7 sur les végétaux. Ainsi, l'influence de la température ambiante et du taux d'humidité a été investiguée par quelques chercheurs. Alors que la survie d'*E. coli* O157:H7 n'est pas uniformément affectée par de faibles (autour de 45%) ou forts (autour de 90%) taux d'humidité (Stine *et al.*, 2005), deux études ont montré que l'inhibition d'*E. coli* O157:H7 est supérieure à la surface de feuilles de laitues et sur des oranges incubées à des basses températures par rapport à celles exposées à des températures ambiantes de 15-20°C (Abdul-Raouf *et al.*, 1993; Eblen *et al.*, 2004).

Enfin, Jablasone *et al.* (2005) ont récemment isolé une souche d'*Enterobacter cloacae* dans la rhizosphère de laitues, qu'ils ont co-inoculé avec *E. coli* O157:H7 sur les parties foliaires de plants de laitues. En présence d'*E. cloacae*, le nombre de cellules d'*E. coli* O157:H7 est réduit d'1 log₁₀ UFC g⁻¹ par rapport au système témoin inoculé qu'avec *E. coli* O157:H7. Récemment, une étude similaire a par ailleurs confirmé ces résultats (Cooley *et al.*, 2006).

1.4.2. Adhérence des STEC sur les tissus des végétaux

L'aptitude d'*E. coli* O157:H7 à adhérer à la surface de nombreuses plantes a été démontrée sur une large variété de végétaux. Par exemple, Janes *et al.* (2005) ont observé la présence de microcolonies d'*E. coli* O157:H7 sur des tissus de pommes, causant par la même des dommages cellulaires. Par microscopie confocale, *E. coli* O157 a également été observé à la surface des feuilles de laitues, notamment au niveau des trichomes et des stomates, à la

surface des tiges (Figure 11) (Takeuchi *et al.*, 2000; Wachtel *et al.*, 2002), mais également au niveau des racines (Cooley *et al.*, 2006). Une autre étude a montré que le pathogène colonise les racines latérales et le pourtour des vaisseaux conducteurs chez *A. thaliana* (Figure 12) (Cooley *et al.*, 2003).

Récemment, Brandl (2006) a rapporté que de longs fimbriae agrégatifs qui interviendraient dans l'attachement et l'invasion des cellules épithéliales par *E. coli* O157:H7, pourraient jouer un rôle dans le processus d'attachement du pathogène à la surface de plantules de radis. Toutefois, les facteurs d'adhésion aux cellules végétales n'ont pas clairement été identifiés chez les STEC. Par ailleurs, plusieurs facteurs environnementaux semblent favoriser l'adhérence des cellules d'*E. coli* O157:H7, notamment au niveau de tissus nécrosés des végétaux, tels qu'un fort pourcentage en oxygène (21% versus 2,7%) ou des températures voisines de 22°C versus 4°C ou 37°C (Takeuchi *et al.*, 2001).

Néanmoins, il a été montré qu'*E. coli* O157:H7 peut être facilement détaché de la paroi des végétaux, par des lavages des plantules dans de l'eau (Barak *et al.*, 2002). Cependant, ceci ne suggère en aucun cas l'absence de risque d'infection chez l'homme. En effet, d'autres travaux ont clairement montré que de faibles populations en *E. coli* O157:H7 (i.e. 10^0 à 10^1 UFC) peuvent se multiplier durant les processus de stockage des végétaux.

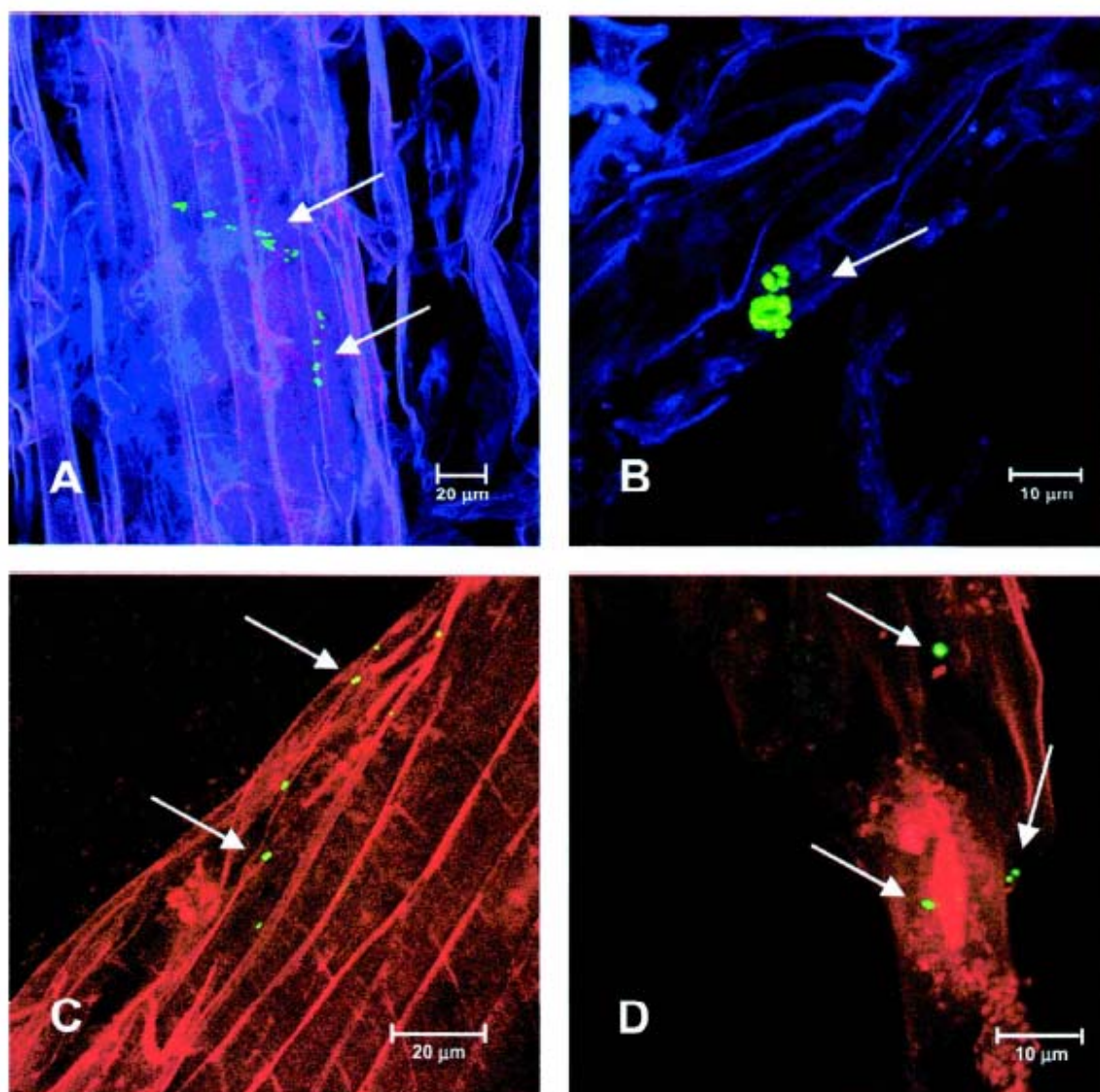


Figure 11 : Microscopie confocale des tissus de plants de laitues cultivés dans du sol irrigué à l'aide d'eau contaminée par la souche 96A13466 d'*E. coli* O157:H7 (pGFP_{uv}). Les flèches indiquent la présence du pathogène (en vert). (A) Présence de cellules isolées et de (B) microcolonies d'*E. coli* O157:H7 associées à la racine. (C) Présence de cellules isolées d'*E. coli* O157:H7 adhérant aux cotylédons et (D) localisés à proximité d'un stomate (d'après Wachtel *et al.*, 2002).

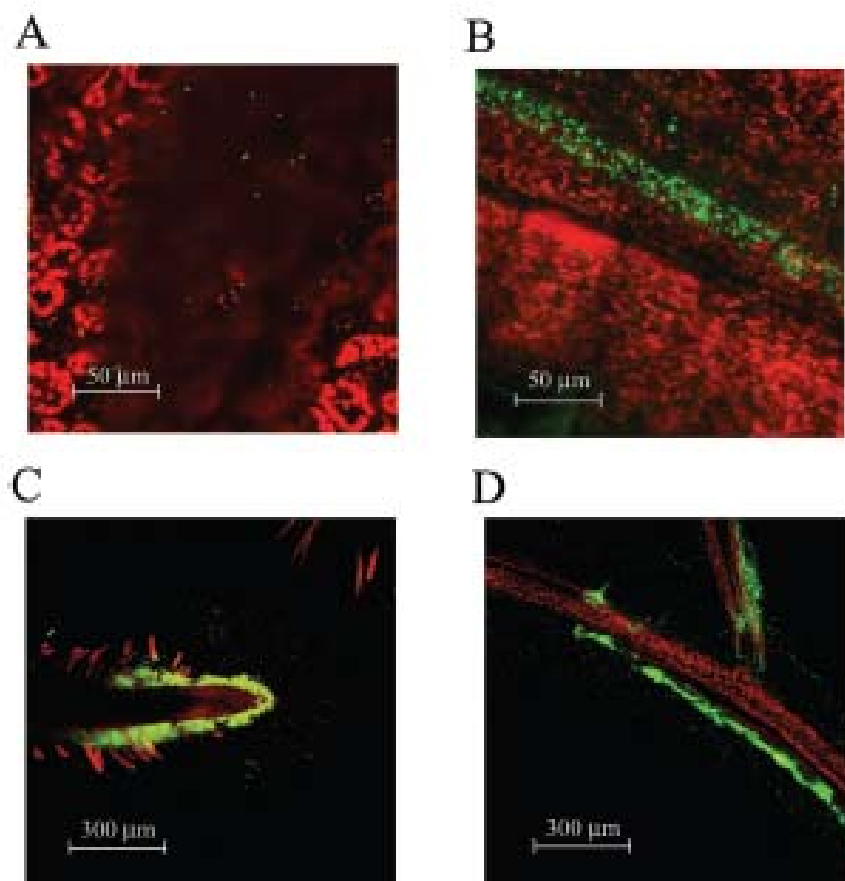


Figure 12 : Colonisation de feuilles d'*A. thaliana* par *E. coli* O157:H7 marqué avec une protéine fluorescente verte (GFP). Localisation dans certains interstices (A) et aux pourtours des vaisseaux conducteurs (B). La colonisation des racines est visible au niveau de l'apex (C) et au niveau des points d'émergence des racines latérales (D) (d'après Cooley *et al.*, 2003).

1.4.3. Internalisation des STEC dans les végétaux

La pénétration d'*E. coli* O157:H7 à l'intérieur des végétaux a été observée chez plusieurs plantes maraîchères : radis (Itoh *et al.*, 1998), laitues (Solomon *et al.*, 2002b), carottes (Seo et Frank, 1999; Auty *et al.*, 2005) jusqu'à des profondeurs supérieures à 50 µm. Takeuchi *et al.* (2000) ont montré que le pathogène pénétrait à l'intérieur des tissus via des sites de blessure présents au niveau des tiges. Cependant, d'autres voies d'entrée sont possibles telles que les points d'émergence des racines latérales ou les tissus endommagés des racines, les stomates ou le système vasculaire de la plante (Quadt-Hallman *et al.*, 1997). Par ailleurs, Cooley *et al.* (2003) ont montré qu'*E. coli* O157:H7 était capable de pénétrer à l'intérieur des racines d'*Arabidopsis thaliana* puis de migrer vers diverses localisations telles

que les bourgeons ou les sépales de fleurs (Figure 13). Il semblerait qu'aucune protéine particulière ne soit nécessaire pour permettre la pénétration des tissus par le pathogène. En effet, suite à l'irrigation de plants de laitues avec de l'eau inoculée avec une souche d'*E. coli* O157:H7 et, parallèlement, avec de l'eau contenant des FluoSpheres (particules inertes fluorescentes), un nombre similaire de cellules bactériennes et de FluoSpheres a été observé à l'intérieur des racines (Solomon et Matthews, 2005). Par conséquent, l'entrée du pathogène dans la laitue serait plutôt assimilée à un événement passif, indépendant de la bactérie, et dépendant plus particulièrement de la plante.

L'internalisation du pathogène dans les tissus, le rend inaccessible aux agents hygiénisants et le protège des interactions potentielles avec les flores compétitives ou antagonistes mais également de la prédation par les protozoaires. Ceci accroît par conséquent la survie des bactéries au sein de la plante et pose un véritable problème dans la maîtrise du risque associé à la présence d'*E. coli* O157:H7 dans les végétaux.

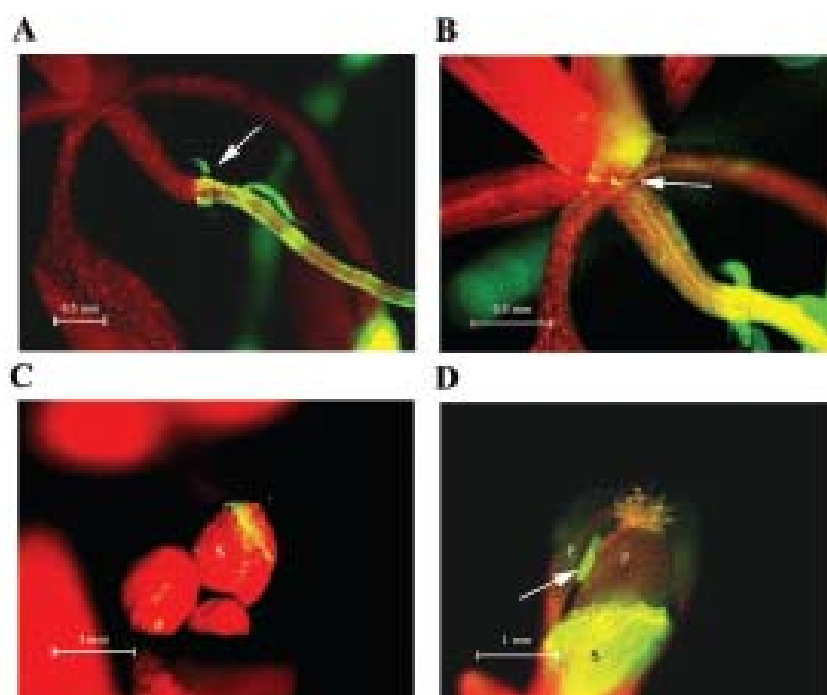


Figure 13 : Migration d'*E. coli* O157:H7 marqué à la GFP jusqu'à une fleur de *A. thaliana*. Visualisation des bactéries migrant à l'intérieur de la tige jusqu'à un noeud (indiqué par une flèche) (A), la base d'un pétiole (indiqué par une flèche) (B), 3 bourgeons de fleurs (C), et d'un sépale de fleur (indiqué par une flèche) (D) (d'après Cooley *et al.*, 2003).

L'importante persistance des STEC dans l'environnement est un pré-requis à leur transfert dans et entre les différents compartiments : sol, eau et végétaux.

2. Transfert des STEC dans l'environnement

2.1 Transfert vertical des STEC dans le sol à partir d'effluents d'élevages

Le transfert de la bactérie à partir d'effluents d'élevage dans le sol est régi par de nombreux paramètres (Figure 14). Le principal facteur d'introduction des bactéries fécales à partir des déjections animales dans le sol est leur mobilisation par les eaux de percolation (Vansteelant, 2004). Ces flux d'eau sont fortement contrôlés par la texture et la structure du sol mais dépendent également des caractéristiques physico-chimiques du sol. En dehors des périodes de pluies, le déplacement des bactéries dans le sol, par dispersion via la faune du sol ou par mouvement flagellaire, est très limité. Certains auteurs ont cependant mis en évidence le fait que certains vers de terre pourraient favoriser les déplacements verticaux d'*E. coli* O157:H7 dans le sol (Artz *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2006). Enfin, la dynamique des bactéries fécales arrivant dans le sol, est également régulée à plus ou moins long terme par les phénomènes de mortalité des cellules (Trevisan *et al.*, 2002). Ces différents éléments vont être repris et détaillés ci-dessous.

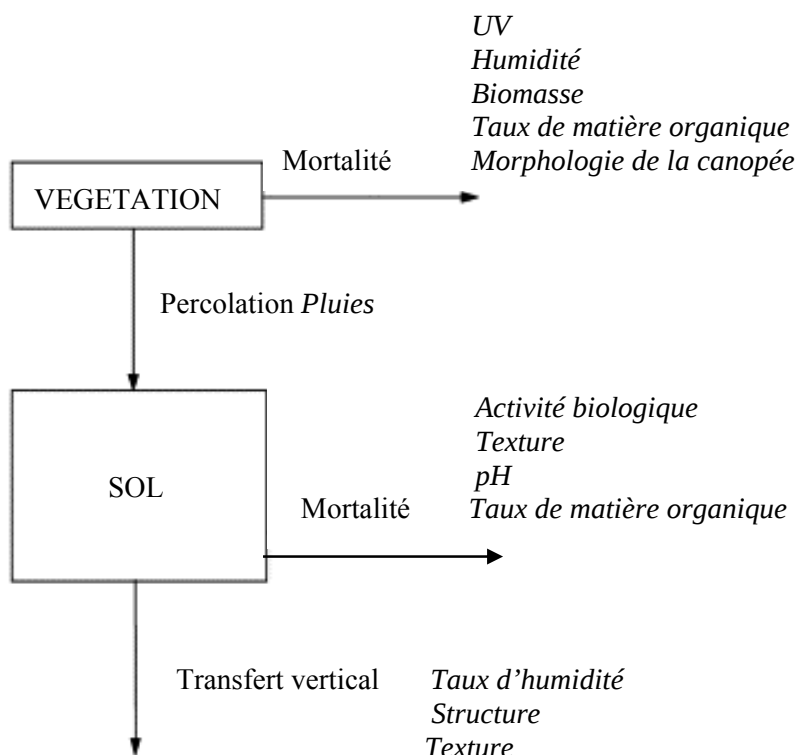


Figure 14 : Mortalité et transfert des bactéries fécales dans le sol. Les principaux facteurs contrôlant le transfert sont notés en italique (d'après Trevisan *et al.*, 2002).

2.1.1. Les événements de pluies

Comme évoqué ci-dessus le transfert des bactéries fécales (dont les STEC) dans le sol est fortement dépendant des événements pluvieux. Il semble cependant que seule une faible partie de ces populations bactériennes soit à même de migrer à travers les flux hydriques (Crane, 1983). Ainsi, lors d'expérimentations réalisées *in situ*, une concentration en *E. coli* de seulement 4,5 log UFC g⁻¹ a été observée dans les premiers centimètres de sol rhizosphérique i.e. [0-3cm] après application de lisier contaminé en *E. coli* à un niveau de 6,5 log UFC g⁻¹ (Figure 15) (Vansteelant, 2004). Cette concentration est faible si l'on considère un bruit de fond initial en *E. coli* à la surface du sol de 2 log UFC g⁻¹. Or, les sols présentent une capacité biotique qui régit l'optimum de la densité microbienne par volume de sol (Dejonghe *et al.*, 2001). Cette capacité d'hébergement est maximale au niveau des premiers centimètres du sol, dans le mat racinaire, tandis qu'elle décroît généralement avec la profondeur. Ainsi, dans des couches de sol situées à des profondeurs comprises entre 4 et 25 cm, des effectifs en *E. coli*, tous inférieurs à 2 log UFC g⁻¹, ont été observés suite à l'épandage de lisier (Figure 15).

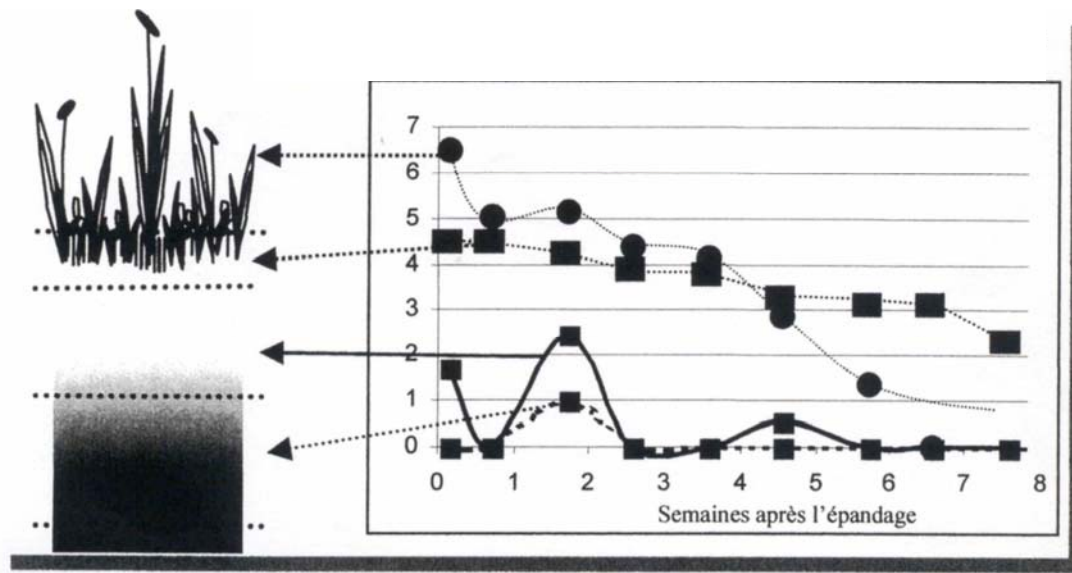


Figure 15 : Evolution des concentrations en *E. coli* observées après épandage de lisier dans les divers compartiments : végétation, sol de surface, horizons A et B (d'après Vansteelant, 2004).

2.1.2. La porosité du sol

Les particules solides qui composent le sol déterminent sa texture (compacte, poreuse) et sa structure (les particules dispersées donnent un sol plus asphyxiant que des particules agrégées). Au final, le sol agit comme un véritable filtre qui va par conséquent influencer le flux hydrique et donc la dispersion des bactéries dans le sol (Jamieson *et al.*, 2002). Artz *et al.* (2005) ont démontré que la porosité constitue un élément majeur du contrôle du transfert des populations d'*E. coli* O157:H7 dans le sol. *In vitro*, les auteurs ont notamment montré qu'en colonnes de sol le niveau de bactéries dans le lixiviat diminue significativement avec l'augmentation de la densité effective du sol. Certains travaux ont démontré que dans des sols limoneux, argileux et sableux, le taux d'*E. coli* O157:H7 dans le lixiviat recueilli oscille de 10^5 à 10^8 UFC le jour de l'inoculation, et de 10^4 à 10^6 UFC après 18 jours de pluies continues, excepté dans le sol argileux pour lequel le flux hydrique fut rompu après 3 jours de manipulation, du fait de l'obturation des pores (Gagliardi et Karns, 2000). Par ailleurs, Williams *et al.* (2007a) ont montré une rapide propagation d'*E. coli* O157:H7 d'un sol sableux à l'eau de mer, après une succession de marées simulées sur 5 jours, principalement due à la texture poreuse du sol testé.

2.1.3. Le taux de matière organique

Les travaux de Gagliardi et Karns (2000) ont montré que l'ajout de matière organique (fumier ou lisier) favorise le transport d'*E. coli* O157:H7 dans les sols. En effet les bactéries peuvent se lier aux particules de matières fécales et/ou de sols, lesquelles vont servir de vecteurs pour le transport des cellules bactériennes à travers le flux hydrique, et contribuer ainsi à leur dissémination dans le sol, notamment après de fortes précipitations. Cependant, une hypothèse contradictoire a été rapportée par Gerba et Bitton (1984). Elle est essentiellement basée sur le fait que les particules composées de bactéries, matière fécale et/ou sol, peuvent interagir entre elles pour former des ponts obturant les pores et prévenir par conséquent la dispersion des cellules dans le sol via les eaux de percolation.

2.2 Transfert des STEC dans l'eau à partir des sols contaminés

La pollution biologique des eaux souterraines (nappes phréatiques) et de surface (cours d'eau, rivières, lacs) est étroitement associée à des sources de pollution ponctuelles et/ou diffuses. A cause de la difficulté de travailler avec des bactéries pathogènes et le risque d'une contamination environnementale, aucune donnée expérimentale n'est actuellement disponible

concernant le transfert des STEC dans les nappes phréatiques, les cours d'eau ou les lacs. Seules les investigations épidémiologiques ont permis de mettre en évidence le transfert d'EHEC dans les eaux. Par ailleurs, de récentes études ont tenté de simuler le devenir des bactéries fécales entraînées par les eaux de pluies, notamment à l'échelle d'un bassin versant. Un bassin versant (ou bassin hydrographique) est une portion de territoire délimitée par des lignes de crête dont les eaux alimentent un exutoire commun : cours d'eau ou lac. Il se caractérise par différents paramètres géométriques (surface, pente), pédologiques (nature et capacité d'infiltration des sols), mais aussi biologiques (type et répartition de la couverture végétale).

Lors d'événements de pluies, les bactéries mobilisées par les eaux de ruissellement et/ou de percolation vont pouvoir être drainées jusqu'aux nappes phréatiques, les rivières ou les lacs, dans lesquels elles vont être soit emprisonnées dans les sédiments soit restées à l'état libre (Pachepsky *et al.*, 2006). Comme évoqué ci-dessus, le sol absorbe et filtre un bon nombre de contaminants, et seule une faible proportion de microorganismes sera retrouvée dans les nappes souterraines (Pachepsky *et al.*, 2006). Cependant, la présence de bactéries pathogènes dans ces eaux représente un risque important pour la santé humaine lorsqu'elles vont servir de source d'approvisionnement en eau potable pour les populations alentours. Par ailleurs, lors de fortes pluies, le lessivage des sols souillés par les déjections animales ainsi que la resuspension des bactéries enfouies dans les sédiments augmentent la concentration en bactéries fécales des eaux de surface. Nagels *et al.* (2002) ont montré que 30% des bactéries peuvent être libérées des sédiments et resuspendues dans l'eau après de fortes précipitations. Dans ces conditions et en présence d'agents pathogènes, le risque d'infection humaine est accentué lors des activités de baignade (Meyer *et al.*, 2005; Thurston-Enriquez *et al.*, 2005).

2.3 Transfert potentiel des STEC vers les cultures de végétaux

Les voies les plus fréquemment impliquées dans la contamination des végétaux sont multiples. Parmi les voies potentielles de contamination présentées dans la Figure 16, certaines ont été décrites comme voies majeures de contamination par les STEC et notamment par *E. coli* O157:H7. Ce sont l'eau d'irrigation, le sol fertilisé avec des effluents plus ou moins bien traités et l'activité de la faune du sol.

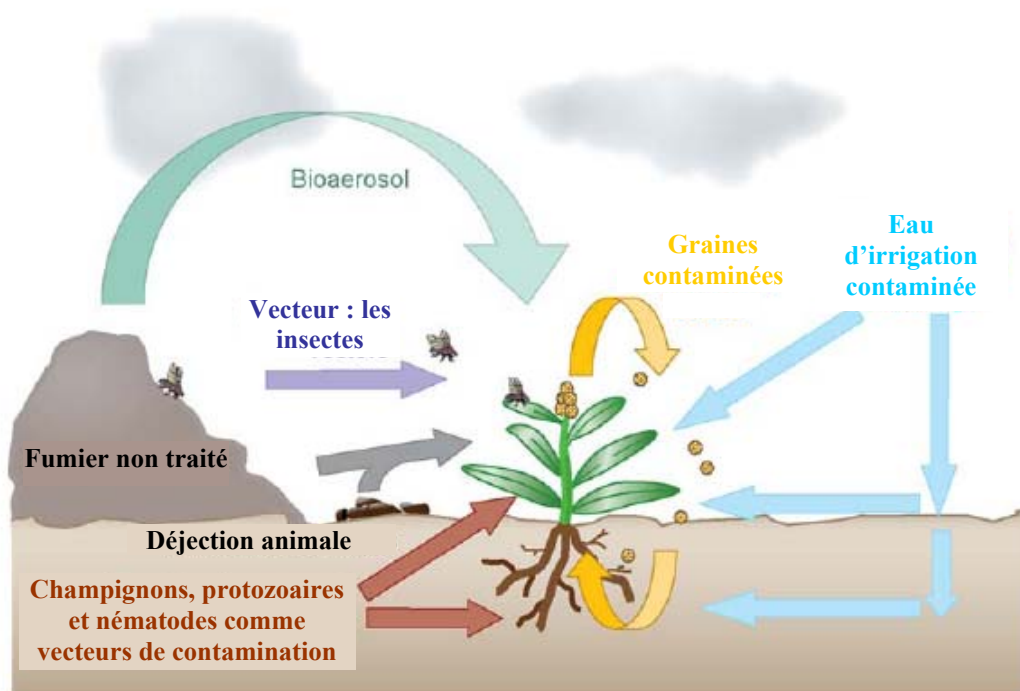


Figure 16 : Illustration des facteurs contribuant à la contamination des végétaux par les bactéries fécales (d'après Brandl, 2006).

2.3.1. L'eau d'irrigation

L'eau d'irrigation est relativement bien décrite comme voie potentielle de transmission des STEC sur les végétaux, notamment pour les systèmes d'irrigation reliés à des réservoirs d'eau privés. Ibekwe *et al.* (2004) ont déterminé la distribution spatiale d'*E. coli* O157:H7, marqué avec une protéine de fluorescence verte (GFP), sur des plantules de laitues traitées avec de l'eau d'irrigation contaminée. Les concentrations en *E. coli* O157:H7 étaient plus élevées dans la rhizosphère et la phyllosphère que dans la partie non-rhizosphérique du sol. Au sein de ces 3 compartiments, la bactérie a cependant été détectée pendant 45 jours. De même, Wachtel et Charkowski (2002) ont démontré *in vitro* la possibilité d'une contamination croisée des laitues par le biais de l'eau d'irrigation. Ainsi, des graines de laitues ont été irriguées avec de l'eau contaminée en *E. coli* O157:H7 à divers taux d'inoculation i.e. 10^8 , 10^6 , 10^4 et 10^2 UFC ml⁻¹. Les résultats ont montré que les doses d'inoculation les plus élevées entraînent une importante colonisation de la plante par les bactéries, notamment au niveau des racines, 10 jours après l'inoculation. Enfin, Solomon *et al.* (2002a) ont montré la présence d'*E. coli* O157:H7 sur les parties foliaires de plants de laitues après une seule irrigation en aspersion (29/32 plantes positives) ou après une seule

irrigation de surface (6/32). *E. coli* O157:H7 persistait sur 9 des 11 plants suivis durant 20 jours après aspersion par de l'eau contaminée.

2.3.2. *Le sol amendé par des effluents*

La transmission de bactéries fécales pathogènes vers les végétaux a également été mise en évidence après un traitement inapproprié des effluents entreposés sur les sols. Ceci a été démontré pour les laitues, dont les parties comestibles ont été contaminées suite à une exposition à du fumier contaminé par *E. coli* O157:H7 (Solomon *et al.*, 2002b). De même, Islam *et al.* (2004a) ont observé le pathogène sur des plants de laitues et de persils cultivés dans un sol fertilisé avec du fumier contaminé à un taux de 10^7 UFC g⁻¹. Ainsi, il fut détecté pendant 77 jours sur des laitues et 177 jours sur du persil. Cependant, les niveaux de contamination en *E. coli* O157:H7 utilisés dans ces études sont loin de ceux habituellement retrouvés en exploitations. Ainsi, Johannessen *et al.* (2004) ont réalisé une expérience qui consistait à semer des graines de laitues dans du sol amendé par du fumier naturellement contaminé par *E. coli* O157:H7. Au contraire des études réalisées *in vitro*, aucune cellule d'*E. coli* O157:H7 n'a été retrouvée à partir des laitues échantillonnées, alors que le pathogène fut retrouvé dans le fumier et le sol pendant respectivement 8 et 7 semaines. Lors d'une étude complémentaire, ces auteurs ont ensemencé des graines dans du sol fertilisé avec du fumier bovin préalablement inoculé avec *E. coli* O157:H7 à un taux de 10^4 UFC g⁻¹. Après 50 jours d'incubation en chambre climatisée, la bactérie n'a été détectée ni sur les feuilles ni sur les racines des plantes.

2.3.3. *La faune*

Il est évident que les insectes peuvent servir de vecteurs de transmission pour les *E. coli* pathogènes, cette voie reste cependant mineure par rapport aux deux autres évoquées précédemment. Récemment, Gibbs *et al.* (2005) ont montré qu'un nématode (*Diploscapter*) communément trouvé dans le sol et le compost servirait de vecteur permettant le transfert d'*E. coli* O157:H7 jusqu'à la surface de différents fruits et légumes en contact avec le sol. D'autres auteurs ont montré que les mouches (ex. : *Ceratitis capitata*) pourraient également véhiculer des bactéries pathogènes (Brandl, 2006).

A cause de la difficulté de contrôler les STEC une fois déposés dans l'environnement, des mesures visant à prévenir toute entrée dans le milieu naturel devraient être suivies.

Points clés à retenir

- ✓ Les durées de survie d'*E. coli* O157:H7 dans les sols vont de 25 à plus de 231 jours. Comme précédemment aucune donnée n'est actuellement disponible concernant la survie des STEC non-O157.
- ✓ Une température basse (4°C), un pH neutre ou légèrement basique, la présence d'argiles, de matières organiques et un taux d'humidité suffisant semblent favoriser la survie d'*E. coli* O157:H7 dans les sols.
- ✓ De nombreuses études montrent une persistance d'*E. coli* O157:H7 dans l'eau pendant plusieurs semaines, notamment aux basses températures.
- ✓ *E. coli* O157:H7 est capable d'être internalisé à l'intérieur des tissus de la plante, le rendant inaccessible aux agents hygiénisants.
- ✓ Le transfert d'*E. coli* O157:H7 dans les sols est positivement lié à la porosité des sols, les événements de pluies et le taux de matière organique.
- ✓ L'eau d'irrigation et le sol constituent deux vecteurs importants de contamination des végétaux par *E. coli* O157:H7.

Ces deux dernières parties ont fait l'objet de la rédaction d'une synthèse intitulée « Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an updated review » actuellement en révision favorable dans *Veterinary Microbiology*. Celle-ci est présentée dans la partie annexe à la page 234 de ce manuscrit.

QUATRIÈME PARTIE : MAÎTRISE DE LA DISSÉMINATION DES STEC DANS L'ENVIRONNEMENT

Lorsque les STEC arrivent dans l'environnement et plus précisément dans le sol, il serait intéressant de pouvoir contrôler leur devenir. Quelques études ont montré l'effet inhibiteur sur les STEC de certains agents phénoliques ou polyphénoliques produits par une large gamme de plantes (Hara-Kudo *et al.*, 2004; Islam *et al.*, 2004b) ou de la flore indigène présente dans la rhizosphère (Schuenzel et Harrison, 2002). Cependant à l'heure actuelle, aucune étude n'a obtenu des résultats probants et applicables à grande échelle. Ainsi, il est impératif d'agir en amont, en mettant en place des mesures préventives visant à limiter l'entrée des STEC dans l'environnement. La maîtrise des STEC passe donc essentiellement par le contrôle du réservoir bovin et par un traitement approprié des effluents d'élevages.

1. Limitation du portage bovin en STEC

Il existe trois types de stratégies afin de réduire le portage sain en STEC des bovins (LeJeune et Wetzel, 2007) :

- ✓ Celles visant à limiter l'intercontamination des animaux par la mise en place de pratiques d'élevages adaptées.
- ✓ Celles visant à inhiber le pathogène. Cette catégorie inclue l'administration de bactériophages, de composés antimicrobiens et la vaccination.
- ✓ Celles visant à prévenir la colonisation de l'appareil digestif des bovins ou à expulser le pathogène par modification de la microflore digestive. Cette catégorie inclue l'utilisation de probiotiques ou de composés nutritionnels spécifiques.

1.1 Pratiques d'élevages adaptées

De bonnes pratiques d'élevages sont nécessaires pour limiter l'intercontamination des animaux et pour le maintien de l'hygiène au sein des exploitations, comme indiqué dans la partie 2 de ce mémoire. Les moyens de maîtrise des STEC dans les élevages nécessitent un nettoyage approfondi des surfaces (nettoyage à la chaux, curage des litières etc...), une bonne étanchéité des locaux ainsi qu'une alimentation et un abreuvement à titre individuel des

animaux (Hancock *et al.*, 2001). De plus, la réduction de la densité des animaux placés dans un même enclos (Vidovic et Korber, 2006), le contrôle de l'accès de la faune sauvage (rongeurs, oiseaux etc...) et des animaux domestiques aux bacs d'alimentation et d'abreuvement (Wetzel et Lejeune, 2006), ainsi que le traitement de l'eau d'abreuvement par ozonation ou chloration seraient positivement corrélés à une diminution de la prévalence en STEC dans les élevages bovins laitiers.

En outre, des enquêtes épidémiologiques visant à identifier les supports sur lesquels la charge de contamination en STEC est la plus importante seraient également nécessaires. Ces différents substrats constitueraient dès lors des sources d'inter-contamination qu'il faudrait tarir. Cette approche est indispensable à l'appréciation du risque de la persistance et de la contamination par ces pathogènes dans chacune des exploitations (Ibekwe *et al.*, 2002; Fegan *et al.*, 2004). Il faudrait également évaluer la diversité des souches au sein d'une même matrice. Cela permettrait par comparaisons croisées de déterminer quelles sont les matrices représentant les véritables plaques tournantes de la circulation des STEC dans les élevages. Ces matrices seraient ainsi les échantillons idéaux à prélever en priorité pour établir si une exploitation est contaminée ou non en STEC.

1.2 Stratégies d'inhibition des STEC

Afin de tarir les différentes sources environnementales de contamination, il serait indispensable de contrôler dans un premier temps le principal réservoir en STEC, à savoir le tube digestif des bovins.

1.2.1. Utilisation des bactériophages

Les bactéries peuvent être dégradées par un large nombre de virus appelés bactériophages, et parmi eux un certain nombre sont communément retrouvés dans la flore intestinal des bovins mais aussi dans l'environnement (LeJeune et Wetzel, 2007). Ils constituent par conséquent des agents assainissants potentiels permettant une élimination sélective des pathogènes présents dans le tractus intestinal des bovins. Quelques études ont montré l'effet négatif des bactériophages sur *E. coli* O157:H7 (Tanji *et al.*, 2005; Sheng *et al.*, 2006). Les récents travaux de Sheng *et al.* (2006) démontrent que l'application simultanée de phages lytiques KH1 et SH1 spécifiques d'*E. coli* O157 directement sur la muqueuse située au niveau de la jonction recto-anale (à un ratio phage/bactéries $\geq 10^2$) et dans l'eau de boisson (à 10^6 PFU ml⁻¹) réduit le nombre de cellules d'*E. coli* O157:H7, sans pour autant inhiber

complètement le pathogène. Des investigations supplémentaires sont à l'heure actuelle nécessaires afin de déterminer l'efficacité réelle de cette méthode chez les bovins. De plus, leur utilisation pour le traitement des STEC chez les animaux devrait faire l'objet d'une réglementation adaptée et requiert l'approbation des consommateurs (LeJeune et Wetzel, 2007).

1.2.2. Utilisation de composés antimicrobiens

Certains auteurs ont démontré une importante prévalence de souches STEC multirésistantes aux antibiotiques. Ainsi, Mora *et al.* (2005) ont mis en évidence au cours d'une étude épidémiologique que près de 40% des souches STEC O157:H7 (58/141) et non-O157:H7 (240/581) provenant de diverses origines (cas cliniques, troupeaux ovins et bovins, aliments) sont capables de résister à au moins un des 26 antibiotiques testés dans cette étude. Notamment, 10 (7%) souches STEC O157:H7 et 71 (12%) souches non-O157 étaient résistantes à au moins 5 antibiotiques. Cependant, d'autres auteurs s'accordent à dire qu'*E. coli* O157:H7 ne montre pas de résistance particulière à tel ou tel antibiotique, contrairement aux autres pathogènes alimentaires comme par exemple *Salmonella enterica* (LeJeune et Wetzel, 2007). Il a été montré que la néomycine sulfate diminue fortement les populations d'*E. coli* O157:H7 dans les fèces de bovins (Elder *et al.*, 2002). Cependant, à cause du risque d'apparition de résistance spontanée, son utilisation dans les troupeaux reste controversée aux Etats-Unis. Rappelons qu'en France, l'ajout d'additifs à action anabolisante ou antibiotique dans les aliments distribués aux bovins est interdit. D'autres molécules antibiotiques tels que la Bicozamycine (BCM) ont été identifiées comme agents efficaces contre les STEC (Misawa *et al.*, 2000). Une quinzaine de veaux naturellement infectés par des STEC ont été traités avec 10 mg/kg/jour de BCM, quotidiennement, durant 5 jours et quinze autres n'ont pas été traités. Les STEC n'ont pas été détectés dans 86.6% des veaux traités (13/15), contre 0% pour le groupe témoin non traité. L'utilisation de polymyxine B et de chlorhedixine permettrait également de réduire l'excrétion des STEC chez les bovins (Naylor *et al.*, 2007).

De plus, une supplémentation en chlorate de sodium à travers l'alimentation et l'abreuvement des animaux permettrait de réduire efficacement la colonisation par *E. coli* O157:H7 du tractus intestinal des bovins (Callaway *et al.*, 2002). Après une contamination artificielle des bovins avec 3 souches d'*E. coli* O157:H7, le traitement avec du chlorate de sodium réduit le niveau du pathogène par 2 log (10^4 à 10^2 UFC) dans le rumen et 3 log (10^6 à 10^3 UFC) dans les déjections. Le mode d'action de ce composé, serait la production de

chlorite (métabolite antibactérien) grâce à la nitrate réductase de la microflore digestive. Là encore son utilisation chez les animaux n'a pas encore été approuvée aux Etats-Unis et en Europe. D'autres traitements chimiques à base de divers acides ont également permis d'obtenir d'importantes réductions des populations de STEC O157:H7, O26:H11 et O111:NM dans de l'eau contenant du rumen ou des matières fécales (Zhao *et al.*, 2006).

1.2.3. La vaccination

L'utilisation de la vaccination pour prévenir la colonisation des pathogènes et leur excrétion dans l'environnement est basée sur la stimulation du système immunitaire des bovins et de la production d'anticorps contre des antigènes spécifiques responsables de l'adhésion des cellules à la muqueuse intestinale. Ceux-ci incluent les protéines du système de sécrétion de type III, Tir, l'intimine, ou le lipopolysaccharide O157 (LeJeune et Wetzel, 2007). Cependant, aucun vaccin n'est actuellement disponible pour réduire les taux de STEC et plus spécifiquement d'*E. coli* O157 chez les bovins.

1.3 Stratégies d'exclusion des STEC

1.3.1. Type d'alimentation

Ce point sera peu développé ici car il a déjà été évoqué dans la partie 2 (paragraphe 1-2). Rappelons simplement que selon le type d'aliments ingérés par l'animal, le régime alimentaire influence et/ou modifie directement les conditions biotiques et abiotiques de l'écosystème intestinal. Il s'avère que des études complémentaires sont nécessaires afin de statuer sur l'impact de tel ou tel régime alimentaire.

1.3.2. Utilisation de probiotiques

Une autre stratégie prometteuse vis-à-vis de la réduction du portage sain en STEC chez les bovins serait l'utilisation de probiotiques. Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. Les probiotiques sont des bactéries ou levures, ajoutées comme compléments à certains produits alimentaires.

De nombreuses études ont été récemment réalisées dans le but d'évaluer l'effet inhibiteur potentiel de certaines bactéries contre les STEC. Beaucoup de bactéries lactiques ont été isolées du tractus intestinal des bovins et décrites comme d'excellents compétiteurs qui

permettraient l'exclusion des STEC (Zhao *et al.*, 1998; Brashears *et al.*, 2003; Gough *et al.*, 2006). Les espèces de *Lactobacillus* sont relativement bien décrites comme responsables d'une forte diminution de l'excrétion en *E. coli* O157:H7 après leur administration à des bovins. Une souche efficace de *Lactobacillus acidophilus* (NP51) a été testée chez des bovins. Ceux dont le régime alimentaire était supplémenté chaque jour avec une dose élevée de NP51 (10^9 UFC) présentaient une importante réduction de la prévalence en *E. coli* O157 dans leurs fèces mais aussi sur leurs cuirs (Younts-Dahl *et al.*, 2004; Younts-Dahl *et al.*, 2005). L'efficacité de la souche NP51 sur l'excrétion d'*E. coli* O157:H7 par les bovins a également été évaluée lors d'une seconde étude qui se déroulait sur 2 années consécutives (Peterson *et al.*, 2007). Quotidiennement la souche NP51 a été ajoutée à l'eau et à la nourriture des bovins à un niveau de contamination de 10^9 UFC par bovin. Après 2 ans d'étude, le taux d'excrétion était réduit de 35% chez les bovins traités avec le probiotique par rapport au groupe témoin non traité. De même, chez les animaux recevant la souche *L. acidophilus* NPC747, *E. coli* O157:H7 a été 2 fois moins détecté que chez les animaux témoins non supplémentés (Brashears *et al.*, 2003). L'efficacité de cette souche a aussi été démontrée en présence d'autres microorganismes tels que *L. acidophilus*, *Streptococcus faecium*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus plantarum* (Lema *et al.*, 2001). Enfin, l'utilisation combinée de *Lactobacillus gallinarum* avec une souche de *Streptococcus bovis* LCB6 entraîne une diminution significative de l'excrétion en *E. coli* O157:H7 chez les veaux (Ohya *et al.*, 2000). En effet, chez des veaux contaminés avec *E. coli* O157:H7 à un niveau de 10^{10-11} UFC g⁻¹, l'excrétion du pathogène est complètement inhibée pour l'ensemble des veaux traités avec le probiotique après 28 jours d'étude.

Par ailleurs, certaines souches d'*E. coli* capables de limiter la croissance des STEC par compétition ou antagonisme ont été isolées dans le côlon des bovins (Schamberger *et al.*, 2004; Etcheverria *et al.*, 2006). Ainsi, une supplémentation en *E. coli* productrice d'une colicine spécifique E7 (DNase) dans l'alimentation des bovins diminue l'excrétion fécale d'*E. coli* O157:H7 (Schamberger *et al.*, 2004). De même, des veaux traités avec une souche d'*E. coli* (à un niveau de 10^{10} UFC) contre *E. coli* O157:H7 et *E. coli* O111:NM administrés à un niveau identique, réduit leur durée d'excrétion respective de 30 à 8 jours et de 12 à 6 jours. Cependant aucun changement n'a été observé pour les veaux infectés par *E. coli* O26:H11 et traités avec le même probiotique (Tkalcic *et al.*, 2003).

2. Gestion raisonnée des effluents d'élevages bovins contaminés par les STEC

2.1. Les données chiffrées de la production en France et le cadre réglementaire

Les modes de stabulation des bovins sont complexes et aboutissent à la production d'effluents très différents, allant du lisier dilué au fumier très compact. Les quantités et la composition des déjections varient également selon les types d'animaux, le type d'alimentation, le niveau de paillage etc... Le tableau 6 présente la nature des déjections récupérées en élevages bovins. La France produit en moyenne chaque année plus de 300 millions de tonnes (chiffre ADEME) de déchets animaux (correspondant à 40 millions de tonnes de matière sèche). Près de 80 % de ces déchets correspondent aux déjections de vaches (environ 240 millions de tonnes).

Tableau 6 : Nature des déjections récupérées en élevages bovins en fonction du type de production et du mode d'élevage (d'après Leroux, 2003).

Production	Mode d'élevage	Type de déjection
Vaches laitières Fumier 85.5% Lisier 15.5%	Stabulation entravée avec litière 34%	Fumier
	Stabulation libre avec pente paillée 15%	
	Stabulation libre avec litière accumulée 31%	
	Stabulation entravée sans litière 2%	Lisier
	Stabulation libre à logettes 7%	
	Systèmes mixtes 11%	50% fumier 50% lisier
Vaches allaitantes Fumier 94% Lisier 6%	Stabulation entravée avec litière 55%	Fumier
	Stabulation libre avec pente paillée 26%	
	Stabulation libre avec litière accumulée 11%	
	Stabulation entravée sans litière 4%	Lisier
	Systèmes mixtes 4%	50% fumier 50% lisier
Taurillons Fumiers 94% Lisier 6%	Stabulation entravée avec litière 21%	Fumier
	Stabulation libre avec pente paillée 57%	
	Stabulation libre avec litière accumulée 13%	
	Stabulation entravée sans litière 1%	Lisier
	Stabulation libre avec caillebotis 2%	
	Systèmes mixtes 6%	50% fumier 50%lisier
Veaux de boucherie Lisier 100%	Stabulation entravée sans litière ou libre avec caillebotis 100%	Lisier de veau

Les effluents d'élevages sont une source certaine de pathogènes et il est crucial de limiter leur dissémination dans l'environnement. La loi prévoit des mesures à cet effet. Les élevages et leurs bâtiments doivent répondre aux critères officiels des installations classées ; les

modalités de stockage et d'épandage des effluents sont entre autres strictement réglementées. La loi n° 76-663 du 19 juillet 1976 est relative aux installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE) et le décret n°77-1133 du 21 septembre 1977 a pris pour application le centre de cette loi. L'objectif principal est de mettre en œuvre tous les moyens nécessaires pour éviter la pollution des eaux de surface et souterraine. Ainsi, des distances minimales d'implantation des bâtiments de stockage et de traitement des effluents sont à respecter par rapport aux habitations (100 m), aux lieux de baignade (200 m) et aux sources destinées à l'alimentation en eau potable ou à l'arrosage des cultures maraîchères (35 m).

Le stockage des fumiers à l'extérieur des bâtiments doit être réalisé sur une aire étanche (généralement bétonnée) munie au moins d'un point bas (collecte des liquides). La superficie de l'aire de stockage doit pouvoir recevoir les fumiers durant 4 mois. Pour le stockage des effluents liquides, il est nécessaire de construire une fosse imperméable permettant le stockage des effluents liquides pendant 4 mois minimum. De plus, le décret n°96-540 du 12 juin 1996 relatif au déversement et à l'épandage des effluents d'exploitations agricoles (JO du 19 juin 1996), impose de ne pas épandre les effluents pendant les périodes de forte pluviosité, lorsque les sols sont gelés ou enneigés, et sur les zones en dehors des terres régulièrement travaillées et des prairies normalement exploitées. Les exploitations agricoles doivent donc comporter des installations de stockage leur permettant de respecter les périodes d'interdiction d'épandage de leurs effluents. Par ailleurs, les épandages doivent être effectués de telle sorte que la capacité d'absorption des sols ne soit pas dépassée, et que des distances minimales par rapport aux cours d'eau (50 m), aux lieux de baignades (200 m) et aux habitations (50 m) soient respectées.

En France, les effluents d'élevages bovins sont dans 90% des cas simplement entreposés sur un emplacement approprié puis épandus en l'état, et seulement 10% subiront un traitement spécifique. Le fait que les effluents bovins soient en France généralement non traités s'explique par une surface au sol extérieure importante des exploitations de bovins laitiers ou à viande (contrairement aux exploitations hors-sol) permettant de recevoir l'ensemble des effluents produits par l'exploitation. Ainsi, ce n'est qu'en présence d'un excédent structurel, que les effluents seront traités. Les traitements permettront notamment d'accélérer la dynamique d'hygiénisation d'un effluent liquide ou solide qui est très lente lors d'un simple stockage, d'autant plus que les concentrations en microorganismes pathogènes et en éléments nutritifs sont généralement alimentés par un apport régulier de déjections animales. Ainsi, le fumier sera généralement composté et le lisier pourra être digéré en conditions aérobie ou non. L'utilisation de composés chimiques pourrait éventuellement être envisageable.

2.2. Traitement des effluents d'élevages

2.2.1. Traitements biologiques

Les traitements biologiques des effluents d'élevages bovins restent actuellement les plus utilisés dans les exploitations, à cause du moindre coût nécessaire à leur mise en application.

a) Digestion aérobie

Le principal objectif de la digestion aérobie est de transformer l'azote du lisier en azote gazeux atmosphérique (N_2). Cependant, ce dispositif permet également de réduire les populations de bactéries pathogènes. En pratique, le traitement aérobie (injection d'oxygène) des effluents liquides a lieu en phases psychrophile et mésophile (0-30°C) (Levasseur et Dutréme, 2007). Certains auteurs proposent d'y associer l'action de la température pour accroître son efficacité hygiénisante (Juteau, 2006). Dans ce type de procédé, la température, le stress oxydatif, la concentration en ammoniac et surtout la compétition bactérienne sont les principaux paramètres induisant une réduction du nombre de pathogènes. Il semblerait également qu'il y aurait une moindre efficacité hygiénisante des dispositifs d'oxygénation de surface, vraisemblablement due à une moindre élévation de température par rapport aux réacteurs équipés d'oxygénateurs de fond de fosse (Strauch, 1991).

Ce même procédé peut-être utilisé pour la fraction solide (fumier). Le compostage aérobie a lieu en présence d'une grande quantité d'oxygène. Le compostage se subdivise en trois phases : une phase mésophile, une phase thermophile et enfin une phase de maturation (Figure 17). Au cours de ce processus, les microorganismes aérobies décomposent la matière organique et produisent du gaz carbonique (CO_2), de l'ammoniac, de l'eau, de la chaleur et de l'humus, qui est le produit organique final relativement stable. Plus précisément, des organismes mésophiles (dont la température de croissance optimale est comprise entre 20 et 45°C) se multiplient rapidement en présence d'oxygène grâce aux sucres et acides aminés facilement disponibles. Ils produisent de la chaleur via leurs activités métaboliques conduisant à une élévation de la température à un point tel que leurs propres activités peuvent ensuite être inhibées. De nombreuses bactéries thermophiles (dont la température de croissance optimale est comprise entre 50 et 70°C) poursuivent alors le processus, en augmentant la température du compost à 65°C, voire plus. Cette hausse de température est cruciale pour la qualité du compost car la chaleur inhibe la plupart des bactéries pathogènes (Misra *et al.*, 2005).

L'augmentation du pH et de la concentration en ammoniac, à l'issue de la dégradation des acides aminés et des protéines, a également un effet dépressif sur les concentrations en pathogènes. Cette phase active de compostage est suivie par une période de maturation, pendant laquelle la température du tas diminue graduellement.

Par ailleurs, la phase thermophile peut être réactivée par retournements des tas de fumier à des intervalles de temps réguliers. Pour que le compostage soit reconnu comme un procédé hygiénisant, au plan législatif en France, la circulaire du 17 janvier 2002 précise qu'il doit comporter au minimum 2 retournements (ou une aération forcée), le maintien d'une température supérieure à 55°C pendant 15 jours ou à 50°C pendant 6 semaines (Levasseur et Dutréme, 2007).

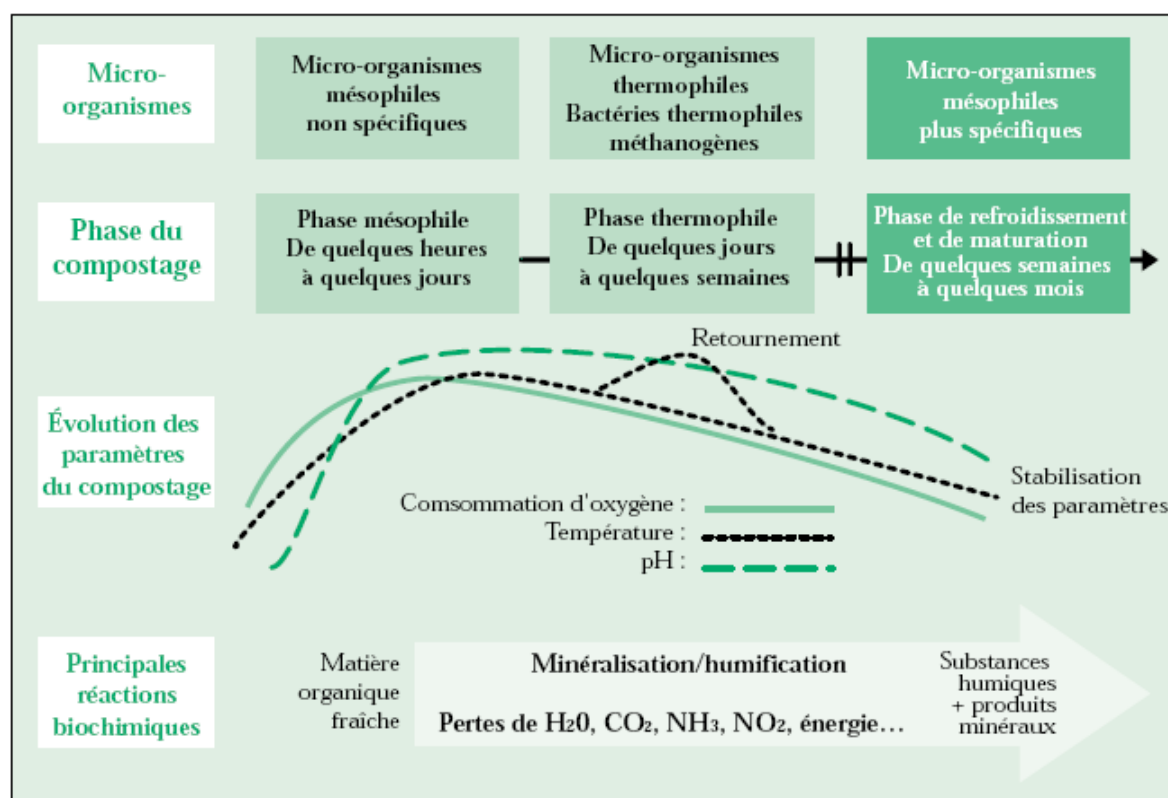


Figure 17 : Le processus de compostage (d'après Peigné et Girardin, 2001)

De nombreuses études ont montré l'effet négatif du compostage sur la survie d'*E. coli* O157:H7. Kudva *et al.* (1998) ont détecté la bactérie pendant 47 jours dans des tas de fumier bovin retournés. D'autres études décrivaient des taux de survie d'*E. coli* O157:H7 beaucoup plus faibles, à savoir 8 jours dans des tas de fumier non retournés contre 4 jours dans ceux retournés (Nicholson *et al.*, 2005). La disparité de ces résultats pourrait être due à l'utilisation

de protocoles expérimentaux différents, notamment en ce qui concerne la taille de l'inoculum et celle des tas de fumier. Jiang *et al.* (2003b) et Nicholson *et al.* (2005) ont mis en évidence une corrélation positive entre les températures élevées ($\geq 65^{\circ}\text{C}$) enregistrées lors du compostage et le déclin du pathogène. Dans un bioréacteur, Jiang *et al.* (2003a) ont montré que les populations d'*E. coli* O157:H7 diminuent de $3,5 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ au pied du bioréacteur et de $2 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ au milieu et au sommet pendant 36 jours de compostage à 21°C . Quand le fumier est chauffé à 50°C , *E. coli* O157:H7 est rapidement inactivé et n'est plus détectable après 14 jours de traitement. En comparaison, 16,3 et 28,8 min seraient respectivement nécessaires pour réduire les populations d'*E. coli* K12 et *E. coli* O157 de 10^8 UFC g^{-1} à 1 UFC g^{-1} dans du compost chauffé à 60°C (Gong *et al.*, 2005).

b) Digestion en anaérobiose

Le principe consiste à introduire des effluents fermentescibles dans un digesteur clos (milieu anaérobie, Figure 18), chauffé et brassé afin de favoriser le développement d'une biomasse microbienne permettant la production de méthane. La combustion de ce gaz produit de la chaleur seule ou de la chaleur et de l'électricité lorsqu'un co-générateur est utilisé. Les unités de méthanisation fonctionnent généralement en mode mésophile ($37\text{-}41^{\circ}\text{C}$). Pour du lisier bovin, le traitement se déroule généralement à $30\text{-}35^{\circ}\text{C}$ pendant 20 jours. Un fonctionnement en mode thermophile (plus de 60°C) non rentable sur le plan énergétique, peut s'avérer indispensable pour l'hygiénisation de certains co-substrats à risque. Dans ce cas, le traitement thermique de ce co-substrat a généralement lieu en amont du digesteur (Levasseur et Dutréme, 2007). Quelques auteurs ont obtenu une hygiénisation satisfaisante avec une digestion anaérobie en mode mésophile voire en mode psychrophile. Aitken *et al.* (2007) ont évalué l'inactivation d'*E. coli* O157:H7 dans du fumier de bovins placé dans un digesteur anaérobie et réglé à une température de 50 ou 55°C . Les temps de réduction décimale étaient de l'ordre de 10 min à 55°C et de 1 à 3 h à 50°C . En comparaison, Cote *et al.* (2006) ont mis en évidence une destruction totale des *E. coli* en 20 jours dans du fumier de porc placé dans un digesteur anaérobie psychrophile (20°C).



Figure 18 : Digesteur anaérobie

2.2.2. Traitements chimiques

La chaux est le principal produit chimique utilisé à des fins d'hygiénisation. Cependant, de nombreux autres produits, tels que l'acide formique, la cyanamide calcique, le sulfate d'ammonium, l'urée ou encore la soude caustique ont fait l'objet d'études. Malgré les excellents résultats que la soude caustique et la cyanamide calcique procurent, elles rendent les produits impropres à une utilisation agronomique et représente un risque pour la santé et l'environnement.

Le pH alcalin ($\text{pH} > 12$), la réaction exothermique ainsi que la libération d'ammoniac sont les principaux facteurs hygiénisant associés à l'emploi de la chaux (Bujoczek *et al.*, 2001). Une récente étude a montré que l'ammoniac est l'un des éléments majeurs de l'inhibition d'*E. coli* O157:H7 dans du fumier bovin (Himathongkham *et al.*, 2000). Par ailleurs, d'autres auteurs ont investigué l'effet des traitements alcalins, notamment des concentrations en ions carbonate et ammonium, sur *E. coli* O157:H7 présent dans du fumier bovin. Ainsi, à un pH ajusté à 9,5 en présence de soude, des concentrations respectives de 5 et 30 mmol l⁻¹ en CO et NH₃ inhibent plus de 10⁶ cellules g⁻¹ en 7 jours (Park et Diez-Gonzalez, 2003). Il semblerait également que l'apport de carbonate de sodium favorise l'effet inhibiteur de la soude en augmentant les concentrations en ions CO₃⁻² et NH₃ du milieu. Enfin, l'urée semblerait être une alternative intéressante à l'utilisation de la chaux. L'ajout de 100 mmol l⁻¹ d'urée produirait d'importantes quantités d'ions CO₃⁻² et NH₃, lesquels seraient associés à une diminution du pathogène de 10⁶ cellules g⁻¹ de fumier après 7 jours.

Points clés à retenir

- ✓ **La digestion en aérobiose (compostage) et celle en anaérobiose sont des traitements efficaces, écologiques et peu coûteux afin d'assainir les effluents d'élevages bovins. Leur application doit cependant se faire en conformité avec le cadre réglementaire afin d'éviter toute dissémination de bactéries potentiellement pathogènes dans l'environnement.**
- ✓ **L'impact du traitement des effluents (compostage du fumier notamment) sur la survie des STEC non-O157 n'a jamais été évalué.**
- ✓ **Le contrôle des STEC au sein même du réservoir bovin reste cependant une piste prometteuse. Des études complémentaires sont cependant nécessaires afin de mettre au point une stratégie efficace, facilement applicable et sans conséquence néfaste pour l'animal.**

CONCLUSION DU MÉMOIRE BIBLIOGRAPHIQUE

Il apparaît assez nettement à travers ce mémoire bibliographique que les STEC et plus particulièrement *E. coli* O157:H7 s'adaptent remarquablement bien à leur environnement. Ce réservoir environnemental permet d'entretenir le cycle épidémiologique à l'origine du portage intestinal périodique des STEC chez les bovins. Ainsi, l'ensemble des mesures d'hygiène permettant d'éviter la propagation de la bactérie dans l'environnement devraient être systématiquement et rigoureusement appliquées. En France, aucune donnée n'est actuellement disponible concernant la prévalence et la dissémination des STEC dans les exploitations laitières. La caractérisation de la situation des exploitations par rapport aux STEC est un préalable à la mise en place d'actions spécifiques ciblées. Par ailleurs, de nombreuses interrogations subsistent concernant l'écologie des STEC non-O157 dans les effluents d'élevages et le sol. Le travail expérimental réalisé et présenté ci-dessous avait donc pour objectif d'apporter des réponses à ces différents éléments.

MÉMOIRE EXPÉRIMENTAL

**PREMIÈRE PARTIE : DISSÉMINATION ET PERSISTANCE
DES STEC DANS LES EXPLOITATIONS LAITIÈRES EN
FRANCE**

Publication N°1

**Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing
Escherichia coli (STEC) strains on French dairy farms**

B. Fremaux, S. Raynaud, L. Beutin et C. Vernozzy-Rozand

Article publié dans *Veterinary Microbiology* (2006), **117** :180-191

Présentation de la Publication n°1

1. Contexte et objectif de l'étude

Les produits laitiers à base de lait cru ont été à l'origine de plusieurs foyers épidémiques à *E. coli* entérohémorragique (EHEC) dans le monde. Deux récentes épidémies associées à la consommation de fromages au lait cru contaminés par des EHEC ont été rapportées en France. La première impliquait des fromages au lait cru de chèvre contaminés avec *E. coli* O157:H7 (Espié *et al.*, 2006a) et la seconde était liée à la consommation de camemberts contaminés par des EHEC de sérotype O26 (Espié *et al.*, 2006b).

Dans ce contexte, il paraissait important d'estimer la prévalence de la contamination en STEC au sein des exploitations laitières françaises et les modalités de circulation de cet agent zoonotique afin de proposer la mise en place de moyens de surveillance et de maîtrise des STEC au sein des élevages bovins laitiers. Pour atteindre cet objectif, des fèces et des laits provenant de 151 exploitations ont donc été analysés lors d'une étude préliminaire (données non présentées ici). Parmi elles, 13 exploitations ont été sélectionnées et ont fait l'objet d'une enquête approfondie avec réalisation d'une multitude de prélèvements (eau d'abreuvoirs, chiffonnage de mamelles, chiffonnage de trayons, chiffonnage des murs des enclos...). Tous les échantillons ont été testés par PCR pour la recherche des gènes *stx* et une caractérisation biochimique et génétique des isolats STEC a été réalisée. La dissémination et la persistance des souches STEC ont été évaluées par comparaison des profils de restriction obtenus pour les isolats STEC par champ-pulsé (« Pulse Field Gel Electrophoresis », PFGE).

2. Matériels et méthodes

Parmi 151 exploitations laitières françaises, 13 fermes ont été sélectionnées et échantillonnées. Cette sélection s'est principalement basée sur la présence des gènes *stx* dans le lait de mélange ou dans les échantillons fécaux et sur la présence de sérogroupes communément retrouvés en clinique humaine (O157, O26, O111 etc...). Dans ces 13 exploitations, entre Janvier 2003 et Août 2004, 1309 échantillons ont été collectés, incluant 415 prélèvements de matières fécales de bovins et 894 échantillons dits « environnementaux » (eau d'abreuvoirs, chiffonnage de mamelles, chiffonnage de trayons, chiffonnage des murs des enclos...).

Dès leur arrivée au laboratoire (moins de 48 h), les échantillons ont été enrichis dans de l'eau peptonée puis incubés à 37°C pendant 18 à 24 h. Après enrichissement, les échantillons ont été criblés pour les gènes *stx* par PCR. Sur les échantillons *stx*⁺, des isolats STEC ont été isolés par une technique d'hybridation ADN-ADN sur colonies, à l'aide d'une sonde froide *stx*. Une caractérisation biochimique par utilisation de galeries API 20E et d'antisérums O26, O55, O111 et O157 a été réalisée, suivie d'une caractérisation génétique des isolats pour les gènes de virulences : *stx1*, *stx2*, *eae* et *ehx*. Certaines souches STEC non sérotypées avec nos antisera ont été envoyées au laboratoire national de référence pour *E. coli* (Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Allemagne), afin d'être sérotypées en utilisant des gammes plus larges d'anticorps i.e. anti O1-O181 et anti H1-H56. Enfin les différents isolats ont été comparés par PFGE afin d'établir d'éventuels liens de clonalité entre eux.

3. Résultats et discussion

Les gènes *stx* ont été détectés dans 145 (35%) échantillons de fèces et 179 (20%) échantillons environnementaux, et un total de 118 isolats a été obtenu. La prévalence des STEC sur les chiffonnages des trayons et des mamelles des bovins était assez élevée (environ 30%). Pourtant, ces derniers ont rarement été décrits dans la littérature comme sources majeures de contamination en STEC. D'autres supports se sont révélés positifs au sein d'une même exploitation tels que les abreuvoirs, les murs et le sol des enclos ou encore la machine à traire. Par ailleurs, 16% des laits de mélange échantillonnés étaient positifs pour les gènes *stx*.

Parmi les 118 isolats STEC, 46% portent le gène *stx1*, 86% le gène *stx2*, 29% le gène *eae* et 92% le gène *ehx*. Au total 16% des isolats possèdent les 4 facteurs de virulence testés. Or, une étude a montré que la présence combinée des gènes *stx2*, *eae* et *ehx* est positivement corrélée avec une sévérité des signes cliniques chez l'enfant (Boerlin, 1999). Ainsi, ces données suggèrent que certaines souches STEC isolées au cours de cette étude sont potentiellement pathogènes pour l'homme.

De plus, la prévalence des gènes *stx2* et *ehx* était relativement élevée dans les 13 exploitations échantillonnées. Au contraire, la distribution des gènes *stx1* et *eae* variait selon l'exploitation testée, ce qui souligne l'existence d'une diversité des profils de virulence des STEC entre les élevages. Parmi les 61 souches STEC sérotypées, au moins 35 sérotypes différents ont été détectés, dont 2 souches O26:H11, 1 souche O55 et 3 souches O157:H7, toutes isolées de fèces. D'autres sérotypes ont été fréquemment détectés dans les différentes exploitations tels que O91:H21, O113:H4 et O179:H8. La plupart des sérotypes isolés dans

notre étude ont déjà été rapportés en élevages bovins lors de précédentes enquêtes épidémiologiques réalisées dans d'autres pays, notamment en Espagne, au Japon ou au Brésil. D'autres, comme O117:H28, O179:H8 ou O45:H16, n'ont jamais été identifiés en élevages bovins. Ceci suggère notamment que le transfert horizontal des phages portant les gènes *stx* est possible entre des souches appartenant à de nombreux sérotypes.

L'électrophorèse en champ-pulsé a révélé une grande diversité des isolats au sein d'une même exploitation. L'arrivée de nouveaux animaux et le contact avec la faune sauvage pourraient être les facteurs explicatifs de ce phénomène. Par ailleurs, aucun lien de clonalité n'a pu être observé entre les souches STEC issues d'élevages différents. Au contraire, le pulstypage a fait apparaître, au sein de chaque exploitation, des liens de clonalité entre des souches STEC isolées de matières fécales et sur différents matériels de l'exploitation au cours d'une même visite, ou à plusieurs semaines voire plusieurs mois d'intervalle. Par exemple, un clone persistant a pu être isolé dans 2 échantillons fécaux de bovins prélevés à 1 an d'intervalle. De plus, un même clone a été retrouvé dans des fèces de bovins et dans de l'eau prélevée dans un marais accessible au troupeau, ou dans les fèces d'un veau et dans de l'eau d'abreuvoir, échantillonnés à 1 mois d'intervalle. Le transfert horizontal de la bactérie se fait en grande partie par les matières fécales et les différents substrats souillés par ces dernières. Les supports tels que les abreuvoirs, les bacs d'alimentation collective, les surfaces des enclos ou encore les mamelles et les trayons des bovins constituent de véritables plaques tournantes de la circulation des STEC dans les élevages.

4. Conclusion

Au vu des résultats de cette étude, il est illusoire de viser une éradication totale des STEC dans les exploitations. Cependant, il est fondamental de respecter des règles d'hygiène élémentaires rigoureuses et d'avoir des pratiques d'élevage adaptées afin de limiter la contamination du lait en STEC. De plus, afin de limiter la dissémination de cet agent zoonotique dans l'environnement, il est crucial de mieux contrôler les effluents issus des exploitations bovines avant leur épandage sur les sols.

Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms

B. Fremaux^{a,*}, S. Raynaud^b, L. Beutin^c, C. Vernozy Rozand^a

^a *Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, BP 83, 1, Avenue Bourgelat, F-69280 Marcy l'Etoile, France*

^b *Institut de l'Elevage, 149, rue de Bercy, F-75595 Paris Cedex 12, France*

^c *National Reference Laboratory for Escherichia coli (NRL-E. coli), Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Diedersdorfer Weg 1, D-12277 Berlin, Germany*

Received 14 June 2005; received in revised form 21 April 2006; accepted 21 April 2006

Abstract

Some Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains (STEC), and in particular *E. coli* O157:H7, are known to cause severe illness in humans. STEC have been responsible for large foodborne outbreaks and some of these have been linked to dairy products. The aim of the present study was to determine the dissemination and persistence of STEC on 13 dairy farms in France, which were selected out of 151 randomized dairy farms. A total of 1309 samples were collected, including 415 faecal samples from cattle and 894 samples from the farm environment. Bacteria from samples were cultured and screened for Shiga toxin (*stx*) genes by polymerase chain reaction (PCR). STEC isolates were recovered from *stx*-positive samples after colony blotting, and characterized for their virulence genes, serotypes and *Xba*I digestion patterns of total DNA separated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Stx* genes were detected in 145 faecal samples (35%) and 179 (20%) environmental samples, and a total of 118 STEC isolates were recovered. Forty-six percent of the STEC isolates were positive for *stx1*, 86% for *stx2*, 29% for intimin (*eae*-gene) and 92% for enterohemolysin (*ehx*), of which 16% of the STEC strains carried these four virulence factors in combination. Furthermore, we found that some faecal STEC strains belonged to serotypes involved in human disease (O26:H11 and O157:H7). PFGE profiles indicated genetic diversity of the STEC strains and some of these persisted in the farm environment for up to 12 months. A large range of contaminated samples were collected, in particular from udders and teats. These organs are potential sources for contamination and re-contamination of dairy cattle and constitute an important risk for milk contamination.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Escherichia coli*; Shiga toxin; Farm; Cattle; Milk

1. Introduction

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are emerging foodborne pathogens. STEC strains have

* Corresponding author. Tel.: +33 4 78 87 25 50;

fax: +33 4 78 87 25 54.

E-mail address: b.fremaux@vet-lyon.fr (B. Fremaux).

been associated with sporadic cases and outbreaks of hemorrhagic colitis (HC) and with hemolytic uraemic syndrome (HUS) in humans, with children and the elderly as high risk groups (O'Brien and Kaper, 1998; Riley et al., 1983). In addition to Shiga toxins *Stx1* and/or *Stx2* (encoded by the *stx1* and *stx2* genes, respectively), STEC may possess other virulence factors associated with attaching and effacing lesions, such as intimin encoded by *eae* and enterohemolysin encoded by *ehx* (Jerse et al., 1990; Schmidt et al., 1995). Although *E. coli* O157:H7 is currently the most frequently isolated serotype from human patients, STEC belonging to other serogroups, such as O26, O103 and O111 are frequently isolated in Europe (Caprioli et al., 1997) and North America (Brooks et al., 2005). Cattle are an important reservoir for these microorganisms and consumption of undercooked beef contaminated with faecal material is a frequent source of human STEC infection (Orr et al., 1994; CDC, 2002, 2005). Worldwide faecal testing of dairy cattle has shown a wide range of incidence of STEC O157 (0.2–48.8%) and non-O157 (0.4–74.0%) strains (Hussein and Sakuma, 2005a). Through faecal contamination from ruminants, STEC can be found in some environmental reservoirs, e.g. drinking troughs, collective feeders or soil pens (Cobbold and Desmarchelier, 2000; Rahn et al., 1997; Van Donkersgoed et al., 2001). Two outbreaks linked to raw milk cheeses contaminated by enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) were recently reported in France. One was associated with consumption of unpasteurized goat's cheese contaminated with *E. coli* O157:H7 (Espie et al., 2006), resulting in two cases of HUS. The other occurred in December 2005 and was attributed to Camembert-type cheeses contaminated by EHEC belonging to the O26 serogroup (unpublished).

Little is known about the prevalence of STEC on dairy farms in France. In order to set up good control strategies for preventing contamination of dairy products by STEC, information is required regarding the distribution of this pathogen on such farms. To this end, our study has been carried out within the framework of the French "Aliment Qualité Sécurité, 2002" program. The present study was designed to determine the prevalence, persistence and diversity of STEC strains in French dairy cattle. Samples from faeces, udder swabs, ruminant food and other locations were collected on 13 French dairy farms.

These samples were then cultured and screened by polymerase chain reaction (PCR) for the *stx* genes. STEC isolates were recovered from *stx*-positive samples after colony blotting, and were characterized for their virulence genes and serotypes. The dissemination routes of some STEC strains in the farm environment were investigated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of STEC isolates.

2. Material and methods

2.1. Sampling design and sample collection

One hundred and fifty-one dairy farms were selected in the course of a longitudinal study in the French regions of Normandie and Rhône-Alpes. The criteria designed for randomization of farms are listed in Table 1. Factors such as feeding, bedding or seasons of the year (either winter or summer) were not used because they would have led to a very small number of candidate farms. From the 151 dairy farms chosen, 13 farms (noted A–M) were selected and sampled by means of two criteria: (1) presence of *stx* genes in samples from bulk tank milk or faecal samples, and (2) presence of serogroups commonly known to be linked to human disease such as O157:H7, O26, O111 and the like.

Between January 2003 and August 2004, 1309 samples were collected and were composed of 415 faecal samples and 894 farm environmental samples from udder swabs, ruminant food, bulk tank milk and others. Several sampling series were carried out during this time period. Cooled samples were transported to

Table 1
Characterization of the 151 dairy farms initially selected for this study

Criteria	Total of farms selected
Presence of drop calf	6
Surface waters in cowshed and field, and presence of sheeps or goat	10
Surface waters in cowshed and field	24
Surface waters in cowshed or field	53
Absence of surface waters	52
Farms tests not randomized	6
Grand total	151

the laboratory of the Veterinary School of Lyon (France) for further investigation.

2.2. Enrichment procedure

Upon arrival at the laboratory, all samples were analysed immediately or were kept at 4 °C for a maximum of 48 h before analysis. Twenty-five grams of faecal or solid environmental material were collected and placed in a stomacher bag with 250 ml of buffered peptone water (BPW) (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), mixed using a stomacher and incubated at 37 °C overnight. Liquid samples and swabs were mixed with 125 ml of BPW and incubated at 37 °C overnight. The milk samples were mixed with 125 ml of BPW supplemented with acriflavine (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France; 12 µg ml⁻¹ final concentration), in order to inhibit the growth of Gram+ bacteria.

2.3. DNA extraction from enriched samples

For DNA preparation, 1 ml of the enrichment culture was centrifuged at 13,000 × g for 3 min. The pellet was washed three times with phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS) containing 4% Tween 20, followed by two washes with PBS only. After centrifugation, the pellet was resuspended in 400 µl of Instagene Matrix (Bio-Raz Laboratories, Hercules, California), and the mixture was incubated for 30 min at 56 °C and for 15 min at 100 °C. After incubation, the mixture was vortexed for 15 s and centrifuged at 11,000 × g for 3 min. The supernatant fluid was used directly for PCR, except for faecal samples, which were diluted (1000-fold dilution) in sterile water, due to a high rate of PCR inhibitors.

2.4. PCR detection of *stx* genes and of *E. coli* ribosomal 16S DNA

A total of 1309 samples were analyzed by PCR. PCR detection of *stx* genes was performed with the degenerative primers ES149 and ES151, as described by Read et al. (1992). Forty cycles of amplification reactions were processed in a T3 thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany). PCR products were separated by gel electrophoresis on 2.5% agarose and visualized by ethidium bromide staining.

Moreover, an internal control PCR using specific primers for ribosomal 16S DNA of *E. coli* was performed for each mix to determine the presence of inhibitors of *Taq* DNA polymerase.

2.5. Colony hybridisation

Enriched samples that gave a positive result for *stx* by PCR were subjected to colony hybridisation, as previously described by Bouvet et al. (2002) with slight changes. The different stages of the hybridisation procedure were carried out in a hybridisation oven (Hybaid, UK). Pre-hybridisation was performed with 10 ml of Dig Easy Hyb solution (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) at 42 °C for 1 h. Hybridisation was carried out overnight at 42 °C with 2 ml of hybridisation solution containing 100 ng of freshly heat-denatured, digoxigenine labelled *stx* probe, using a DIG-High Prime kit (Roche Diagnostics). Thus, the hybridised probe was detected with antibody conjugated to alkaline phosphatase (Roche Diagnostics). *Stx*-positive colonies were revealed by a colorimetric reaction (NBT, X-Phosphate, Roche Diagnostics), as described by the manufacturer (Roche Diagnostics). Finally, the STEC isolates corresponding to coloured spots were picked from hybridisation plates and grown overnight in nutrient broth.

2.6. Identification and characterization of STEC isolates

All isolates were biochemically identified as *E. coli* by the API 20E test (bioMérieux) and were further characterized by PCR for the presence of the *stx1*, *stx2*, *uidA* genes as described (Cebula et al., 1995), as well as for the *eae* (Reid et al., 1999) and *ehx* genes (Paton and Paton, 1998). Sequences for the primers are shown in Table 2. Vero cell toxicity and the expression of hemolysin were investigated, as previously described (Beutin et al., 1996, 1998, 1999).

2.7. Serotyping of STEC isolates

Serotyping of STEC isolates detected by hybridisation was performed using O26, O55 and O111 antisera (Bio-Rad). The *E. coli* O157 isolates previously identified by amplification of the *uidA*

Table 2
Oligonucleotide primers used in PCR reactions

Gene	Primers	Sequence (5'–3')	PCR product size (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>stx</i>	ES149	CGA AAT (CT)C(CT) CTC TGT AT(CT) TG(CT) C	323	49
	ES151	GA(AG)C(AG)A AAT AAT TTA TAT GT		
DNAr 16S <i>E. coli</i>	SA	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AGA	1500	50
	S17	GTT ACC TTG TTA CGA CTT		
<i>stx1</i>	LP30	CAG TTA ATG TGG TGG CGA AGG	348	64
	LP31	CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG		
<i>stx2</i>	LP43	ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G	584	64
	LP44	GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C		
<i>eae</i>	B52	AGG CTT CGT CAC AGT TG	570	50
	B53	CCA TCG TCA CCA GAG GA		
<i>ehx</i>	hlyAF	GCA TCA TCA AGC GTA CGT TCC	534	60
	hlyAR	AAT GAG CCA AGC TGG TTA AGC T		
<i>uidA</i>	PT2	GCG AAA ACT GTG GAA TTG GG	252	64
	PT3	TGA TGC TCC ATC ACT TCC TG		

gene were confirmed with anti-O157 agglutinating serum (Oxoid, Basingstoke, UK). Serotyping of STEC which were not identified with these antisera was performed at the National Reference Laboratory for *E. coli* (NRL-*E. coli*) in Berlin, Germany using antisera O1–O181 and H1–H56, as described by Beutin et al. (2005).

2.8. Pulsed-field gel electrophoresis

Each bacterial isolate was subject to molecular typing by PFGE, using the methods previously described by Bouvet et al. (2002) with minor changes. Equal volumes of each bacterial suspension and 1.8% agarose (InCert agarose, BMA, Rockland, USA) were mixed with 50 mg ml⁻¹ proteinase K, 10 mg ml⁻¹ lysozyme and 10% SDS, and were immediately added into block formers. After solidification, agarose blocks were incubated overnight at 55 °C in 1 ml of the TE1 buffer. The agarose blocks were then washed with TE1 supplemented with phenyl methyl sulfonyl fluoride and two washings in TE1, each for 1 h at 42 °C. Digestion of genomic DNA embedded in agarose blocks was carried out using *Xba*I endonuclease (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Electrophoresis was performed with the CHEF DR II system (Bio-Rad Laboratories) at 14 °C in 0.5× TBE, with a pulse ramp of 5 s at the beginning and 40 s at the end,

for 24 h at constant voltage of 6 V cm⁻¹. A PFGE Marker I (Promega, Madison, USA) was included in each agarose run.

2.9. Statistical analysis

Prevalence data was analysed using commercially available software (Microsoft Excel). Statistical comparisons between STEC strains isolated from calves and cows were performed using the χ^2 -test for independence, with statistical significance set at the 95% confidence level ($p < 0.05$). The binomial test was performed to calculate the confidence interval for each contaminated substrate from all dairy farms.

3. Results

3.1. Prevalence of STEC in environmental and faecal samples from dairy farms

Out of 1309 samples tested, 324 (145 faecal (35%), 179 environmental samples (20%)) proved to be *stx*-positive by PCR. In particular, the highest rate of contamination by STEC was obtained for teats (49 positive/161 tested) and udders (54/175) with good confidence intervals, 23.44–38.17% and 24.11–38.27%, respectively. The lowest numbers of PCR

Table 3
List of the *stx*-positive materials on each dairy farm A, B, C and D

Material	Farm			
	A	B	C	D
Bovine faeces	+	+	+	+
Water trough				
Water	+		+	+
Swab		+		+
Soil, pond	+	+		
Milking				
Teat swab	+			+
Udder's swab	+	+	+	+
Milking swab		+		
Stall				
Wall	+	+		+
Cow trap	+	+	+	+

positive samples were found for milking swabs (6/28), water troughs (16/81), pen walls (7/44), bulk tank milk (10/64) and cow traps (15/114). At the farm scale, different environmental sites were shown to be contaminated by STEC (Table 3). A typical example on farm A demonstrated that faeces, water troughs, udders, pen walls, the milking machine and the soil were found contaminated with STEC.

Isolation of STEC was successful from 80 faecal samples and 38 environmental samples that were *stx*-positive by PCR, allowing the isolation of one STEC isolate (118 isolates were recovered).

3.2. Virulence of STEC isolates

Different virulence traits were associated with the STEC strains. Among faecal STEC, 39 (49%) isolates carried the *stx1* gene, 70 (87.5%) the *stx2* gene, 27 (34%) the *eae* gene and 76 (95%) the *ehx* gene. Thirty (37.5%) STEC isolates were *stx2*⁺ and *stx1*⁺, and 13 (16%) were *stx1*⁺ or *stx2*⁺, *eae*⁺ and *ehx*⁺. Fourteen

(17.5%) STEC isolates possessed all the virulence factors tested: *eae*, *stx1*, *stx2* and *ehx*. The virulence profiles of STEC from faecal samples of calves and cows were significantly similar ($p > 0.05$) (Table 4).

Among the 38 environmental STEC isolates, 15 (39%) were *stx1*⁺, 32 (84%) *stx2*⁺, 7 (18%) *eae*⁺ and 33 (87%) *ehx*⁺. Eleven (29%) STEC isolates possessed the *stx1* and *stx2* genes and 5 (13%) were *stx1*⁺, *stx2*⁺, *eae*⁺ and *ehx*⁺. No dominating virulence pattern was recovered from environmental or faecal STEC isolates.

All farms showed a high rate for both *stx2* and *ehx* genes. At the farm level, the distribution of *stx1* and *eae* genes varied (Table 5). Specifically, farm B showed a high rate of carriage for *stx1* and *eae* genes, which was the converse to farm D in which *stx1* was only harboured by 40% of the STEC isolates and *eae* was scarcely noted. Furthermore, the four virulence factors were frequently observed in STEC isolates from farm B as opposed to other farms.

3.3. Serotypes of STEC strains

The serotypes of representative (61) STEC strains from this study are shown in Table 6. All STEC isolates were screened for major O-groups (O26, O55, O111 and O157) associated with human pathogenicity and two O26, one O55 and three O157 STEC were identified. The STEC O157 strains were negative for fermentation of sorbitol and negative for beta-glucuronidase activity, showing the same *uidA* genotype as typical EHEC O157:H7 strains. All O26, O55 and O157 STEC isolates were taken from faecal samples.

Sixty-one of the STEC isolates were thoroughly investigated for their serotypes with all available O- and H-antisera. As a result, some serotypes were more frequently detected on different farms: O91:H21 (6/61), O113:H4 (4/61) and O179:H8 (5/61).

Table 4
Comparison of virulence profiles for STEC isolates recovered from faecal samples of cows and calves

STEC strains origin	Genes						
	<i>stx1</i> ⁺	<i>stx2</i> ⁺	<i>eae</i> ⁺	<i>ehx</i> ⁺	<i>stx1</i> ⁺ <i>stx2</i> ⁺	<i>stx1</i> ⁺ or <i>stx2</i> ⁺ and <i>eae</i> ⁺ <i>ehx</i> ⁺	<i>stx1</i> ⁺ <i>stx2</i> ⁺ <i>eae</i> ⁺ <i>ehx</i> ⁺
Cows ($n = 43$)	18 (42%) ^a	37 (86%)	12 (28%)	41 (95%)	13 (30%)	7 (16%)	4 (9%)
Calves ($n = 37$)	21 (57%)	33 (89%)	16 (43%)	35 (95%)	17 (46%)	6 (16%)	8 (22%)

^a Number of isolates that carried the specific gene(s) and percentage obtained with respect to the total STEC isolates number.

Table 5
Comparison of virulence profiles for STEC isolates recovered from farms A, B, C and D

Virulence profile	Farm			
	A	B	C	D
<i>stx1</i>	5/14 (36%) ^a	7/11 (64%)	3/6 (33%)	4/10 (40%)
<i>stx2</i>	13/14 (93%)	10/11 (91%)	5/6 (83%)	10/10 (100%)
<i>eae</i>	7/14 (50%)	8/11 (73%)	3/6 (50%)	2/10 (20%)
<i>ehx</i>	14/14 (100%)	10/11 (91%)	6/6 (100%)	8/10 (80%)
<i>stx1</i> + <i>stx2</i> + <i>eae</i> + <i>ehx</i>	3/14 (21%)	5/11 (45%)	1/6 (17%)	1/10 (10%)
<i>stx1</i> + <i>stx2</i>	4/14 (29%)	6/11 (55%)	2/6 (33%)	4/10 (40%)
<i>stx1</i> or <i>stx2</i> + <i>eae</i> + <i>ehx</i>	4/14 (29%)	2/11 (18%)	2/6 (33%)	1/10 (10%)

^a Positive STEC isolates/total STEC isolates recovered on the farm, and the corresponding percentage.

Table 6
Phenotypes and genotypes of some STEC isolates recovered from various dairy farms (*n* = 61)

Serotype or serogroup	Farm (PFGE isolate) ^a	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehx</i>	VT	Hem
ONT:H2	B (2)	–	+	+	+	+	E-hly
ONT:H2	B (14)	–	+	+	+	+	E-hly
ONT:H4	C	+	–	+	+	ND	–
ONT:H19	D	–	+	–	–	+	α-hly
ONT:H19	D	–	+	+	+	+	α-hly
ONT:H21	D	+	+	–	+	+	–
ONT:H21	D	+	+	–	+	+	–
ONT:H21	D	+	+	–	+	+	–
ONT:H21	G	–	+	–	+	ND	–
orough:H21	C	+	+	+	+	+	–
ONT:H30	E	+	+	–	+	+	E-hly
ONT:H39	A (9)	–	+	–	+	ND	–
ONT:H40	B (10–11)	+	–	–	+	+	–
O2:H27	E	–	+	–	+	+	E-hly
O6:H10	F	–	+	–	+	+	–
O15:H21	E	+	+	+	+	–	–
O22:H8	B (3)	+	+	+	+	+	E-hly
O26:H11	A (3)	+	+	+	+	+	E-hly
O26:H11	D	+	+	+	+	+	E-hly
O45:H3	E	–	+	–	+	+	–
O45:H16	E	–	+	–	+	+	–
O55	I	+	+	+	+	ND	ND
O68/O73:H31	B (5)	+	+	–	+	+	–
O84:H11	A (2)	+	+	–	+	+	E-hly
O91:H21	E	+	+	+	+	+	E-hly
O91:H21	B (8–9)	+	+	+	+	+	E-hly
O91:H21	B (12)	+	+	+	+	+	E-hly
O91:H21	B (7)	–	–	–	+	+	E-hly
O91:H21	G	+	–	+	+	+	E-hly
O91:H21	G	+	–	+	+	+	–
O105:H2	C	+	+	–	+	+	E-hly
O105:H18	A (13–14)	+	–	–	+	+	E-hly
O105:H18	F	+	+	–	+	+	E-hly
O110:H2	D	–	+	–	–	+	α-hly
O113:H4	E	+	+	–	+	+	–
O113:H4	B (13)	–	+	–	+	+	–

Table 6 (Continued)

Serotype or serogroup	Farm (PFGE isolate) ^a	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehx</i>	VT	Hem
O113:H4	C	–	+	+	–	+	–
O113:H4	D	–	+	–	–	+	–
O113:H11	A (10)	–	+	–	+	+	–
O113:H21	B (4)	+	+	–	+	+	E-hly
O113:H21	A (5)	–	+	–	+	+	E-hly
O113:H21	A (12)	–	+	–	+	+	E-hly
O117:H28	E	+	+	–	+	+	E-hly
O117:H28	E	+	+	–	+	+	E-hly
O136:H12	G	+	–	–	+	+	–
O145:H28	A (11)	+	+	+	+	+	E-hly
O157:H7	H	–	+	+	+	ND	ND
O157:H7	H	–	+	+	+	ND	ND
O157:H7	I	–	+	+	+	ND	ND
O174:H2	A (7)	–	+	–	+	+	E-hly
O174:H16	A (16)	–	+	+	+	+	E-hly
O174:H21	D	–	+	–	–	+	–
O174:H21	D	–	+	–	–	+	–
O175:H16	A (8)	–	+	–	+	+	E-hly
O175:H16	A (15)	–	+	–	+	+	E-hly
O179:H8	E	+	+	+	+	+	E-hly
O179:H8	C	–	+	+	+	+	E-hly
O179:H8	C	–	+	–	+	+	E-hly
O179:H8	A (4)	–	+	+	+	+	E-hly
O179:H8	A (6)	+	+	+	+	+	E-hly
O179:H40	B (6)	–	+	–	+	+	E-hly

NT, non-typable; ND, non-determined; VT, vero cell toxicity; Hem, hemolysin.

^a Corresponding to PFGE isolate number as shown in Figs. 1 and 2.

Although 13 isolates presented non-typable (NT) O antigens, at least 35 distinct serotypes were detected among the 61 STEC isolates investigated within the entire range of antisera tested.

3.4. PFGE comparisons for STEC isolates

PFGE is a very powerful tool that allows the comparison between individual isolates and the determination of a possible clonal relationship. PFGE of *Xba*I-digested DNA fragments isolated from the 118 STEC isolates generated 74 unrelated *Xba*I-PFGE subtypes from 118 STEC isolates. Individual PFGE patterns consisted of approximately 20 DNA fragments ranging from 50 to 800 kb in size.

The PFGE patterns of various (29) isolates recovered from two dairy farms investigated in this study are shown in Figs. 1 and 2, and their corresponding serotypes are shown in Table 6. A large diversity of REDP (19 different PFGE patterns) were found on both farms and during different

sampling periods. Some isolates with distinct patterns were only detected once (e.g. isolates 3 or 14 from farm A). Other STEC types representing possible clones were recovered several times on the same farm. In most cases, a STEC clone was isolated from different animals living on the same farm. This was the case on farm A (Fig. 1), in which isolates four and six shared identical REDPs. A persistent clone of serotype O113:H2 (REDP nos. 2 and 14) was also isolated from different faecal samples collected 1 year apart on farm B (Fig. 2). The transmission of STEC from bovine faecal samples to many farm materials (udders, teats, pen walls, cow traps, etc.) was also noted, and farm A was representative of this. The same REDP was recovered from bovine faecal samples (REDP no. 7) and a pond (REDP no. 16), or from bovine faecal samples (REDP no. 8) and an udder (REDP no. 15). Moreover, a persistent clone (nos. 5 and 12) of serotype O113:H21 was also recovered from a calf faecal sample and a water trough, sampled 1 month apart. The dissemination and persistence of some

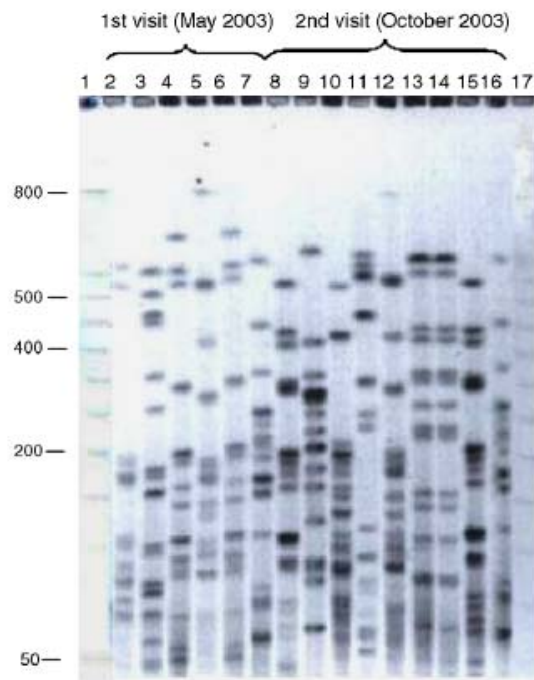


Fig. 1. PFGE comparing restriction profiles for STEC isolated from dairy farm A. Lanes 1 and 17: λ molecular weight markers (numbers on the left are kb weights). Lanes 2–6: isolates recovered from bovine faeces collected in the first visit. Lanes 7–11 and 12–16: isolates recovered from bovine faeces and environmental sites (12: a water trough, 13 and 14: a same teat, 15: an udder, 16: a pond), respectively, during the second visit.

STEC strains was also noted between different farm materials. For example, an identical isolate of serotype O91:H21 (REDP nos. 8, 9 and 12) was isolated from a water trough and also from an udder sampled 8 months apart on farm B. No dissemination of the same STEC clone has been observed between the 13 dairy farms investigated in this study.

4. Discussion

The presence of STEC in milk is mainly due to contamination during the milking step (Hussein and Sakuma, 2005b). Therefore, the present work was intended to study the persistence of STEC in the dairy farm environment and to determine the routes of STEC contamination. We observed that the contamination rate of the French dairy farm environment by

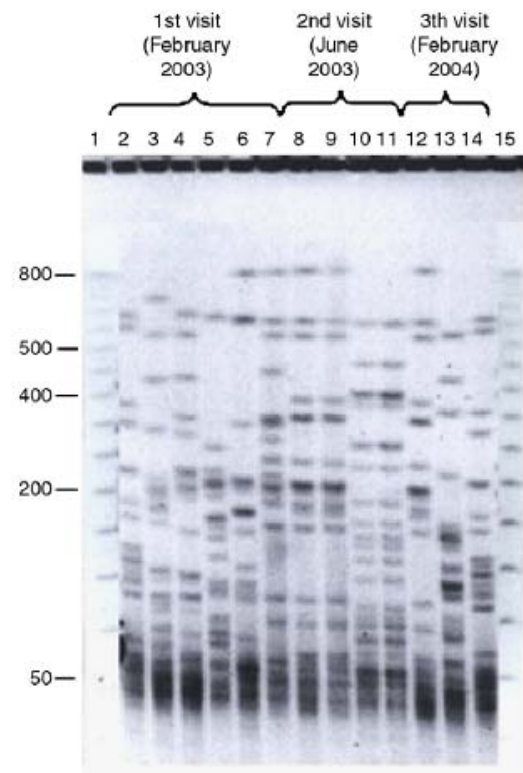


Fig. 2. PFGE comparing restriction profiles for STEC isolated from dairy farm B. Lanes 1 and 15: λ molecular weight markers (numbers on the left are kb weights). Lanes 2–7: isolates recovered from faeces during the first visit. Lanes 8–11: isolates recovered from environmental sites during the second visit (8–9: a same teat, 10–11: a same cow trap). Lanes 12–14: isolates recovered from an udder (12) and faeces (13–14) collected in the third visit.

STEC is 20%. This rate is higher than those obtained by Rahn et al. (1997) in the United States or Cobbold and Desmarchelier (2000) in Australia, with STEC contamination levels of 14.1% and 4.1% for those studies, respectively. We have two plausible explanations for these discrepancies. The first explanation may be due to the fact that different enrichment protocols have been used by the cited authors. The performance of different enrichment protocols could therefore lead to false negative results. The second explanation could be linked to different farm practices or a seasonal effect.

Similarly to previous studies, many different types of environmental samples were positive for the *stx* genes (Cobbold and Desmarchelier, 2000; Rahn et al.,

tel-00200118, version 1 - 20 Dec 2007

tel-00200118, version 1 - 20 Dec 2007

tel-00200118, version 1 - 20 Dec 2007

tel-00200118, version 1 - 20 Dec 2007

tel-00200118, version 1 - 20 Dec 2007

et al., 1998); O26:H11 in Germany (Geue et al., 2002); and O2:H27, O136:H12 in France (Pradel et al., 2000). In contrast, STEC belonging to other serotypes such as O117:H28, O179:H8, O45:H3, O174:H16, O45:H16 and O157:H7 have never been detected from cattle. Of the 61 STEC isolates serotyped in the present study, 13 remained O non-typeable while using all available antisera. Previous reports showed that rough or untypeable STEC isolates were commonly isolated from food and animal faeces (Blanco et al., 2004b), and highlighted the emergence of new STEC serogroups.

Pulsed field electrophoresis with *Xba*I endonuclease is currently considered by the scientific community as being a highly discriminatory method for molecular typing of STEC (CDC, 1995; Martin et al., 1996). This epidemiological tool is often used to compare STEC isolates recovered from various sources. In the present study, different REDP were obtained from each farm and suggested the dissemination of STEC clones. This dissemination within the same cattle (farms A and B) sheds light on the horizontal transmission mechanism proposed by Cobbold and Desmarchelier (2002). This can imply a direct contact between the animals and various materials such as drinking and feeding troughs could constitute the most probable sources of contamination between bovines. In particular, this may occur through saliva which could act as a route of transmission (Cobbold and Desmarchelier, 2002). In addition, bovine skin and pen floors in contact with animals should also be considered (Cobbold and Desmarchelier, 2002). The distribution of the same strain throughout the dairy farm environment was observed for almost all farms tested. Specifically, the same strain was isolated on farm B from both a water trough and from an udder. The contamination of multiples niches, such as udders, water troughs and cow traps, could represent a point of intersection for STEC distribution inside dairy herds.

PFGE demonstrated a wide diversity of STEC strains found on the same farm. This diversity is certainly linked to the regular entry of new bovines or wild animals into the herds and has also been noted by many other authors (Hancock et al., 1998; Nielsen et al., 2004; Wilson et al., 1998). These entering animals are possibly healthy carriers of STEC that will contaminate

the farm environment. Furthermore, some matrices could allow a physical protection of the STEC. More precisely, the presence of symbiotic microflora and nutritive elements could facilitate the survival of STEC in the dairy farm environment and consequently explain the persistence of these strains from months to years on the same dairy farm (Shere et al., 1998; Widiasih et al., 2004). As such, the same strain of serotype O157:H7 was isolated from two distinct faecal samples in farm B collected 12 months apart, and another, serotype O91:H21, was isolated from a water trough and an udder sampled 8 months apart.

In conclusion, the complexity of STEC ecology in French dairy farms could give rise to some difficulties for its elimination from the farms. Thus, adapted handling management is necessary to limit STEC dissemination and consequently the probability of milk contamination. Many studies have attributed a lower rate of contamination to dry surface cleaning, good sealing and disinfection of buildings (Garber et al., 1999), feeding and drinking with individual troughs (Hancock et al., 2001), and abundant strawing for bed surfaces of the animals. Other strategies would be to set up measures in an attempt to better control the farm's effluents before spreading or to initially control the digestive tract of bovines, which remains the principal reservoir for STEC.

Acknowledgments

This study was carried out within the framework of the Aliment Qualité Sécurité 2002 program and was supported by funds from ARILAIT RECHERCHES and French Research Ministry. We are especially grateful to Mr. Vincent Heuchel for his significant contributions to this work. We also thank the dairy companies, Groupements de Défense Sanitaire (GDS) from the Calvados, Eure and Orne regions, the Syndicat Interprofessionnel du Reblochon, INRA from Tours and the stockbreeders who participated in this study. We acknowledge the technical assistance provided by Mrs. M.P. Montet, Mrs. A. Beddiaf, Mr. A. Vimont, Mrs. M. Berardin, Mrs. C. Bavai, Mr. J.B. Serillon, and Mr. J.P. Legrand. Finally, we are most appreciative of Mrs. M.L. Delignette-Muller for her advisement in biostatistics and Mr. Richard Sullivan for his help in the preparation of this manuscript in English.

References

- Beutin, L., Gleier, K., Zimmermann, S., 1999. Comparative evaluation of different diagnostic methods for detection of Shiga toxin-producing strains of *Escherichia coli* (STEC) in human clinical stool specimens. In: Duffy, G., Garvey, P., Coia, J., Wasteson, Y., McDowell, D.A. (Eds.), Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe. Concerted action CT98-3935. 1. Methods for Verocytotoxigenic *E. coli*, Teagasc., vols. 89/93. The National Food Centre, Dublin, Ireland.
- Beutin, L., Strauch, E., Zimmermann, S., Kaulfuss, S., Schaudinn, C., Mannel, A., Gelderblom, H.R., 2005. Genetical and functional investigation of *fliC* genes encoding flagellar serotype H4 in wildtype strains of *Escherichia coli* and in a laboratory *E. coli* K-12 strain expressing flagellar antigen type H48. BMC Microbiol. 5, 4.
- Beutin, L., Zimmermann, S., Gleier, K., 1996. Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. J. Clin. Microbiol. 34, 2812–2814.
- Beutin, L., Zimmermann, S., Gleier, K., 1998. Human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. Emerg. Infect. Dis. 4, 635–639.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M.P., Gonzalez, E.A., Bernardez, M.I., Blanco, J., 2004a. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-xi*). J. Clin. Microbiol. 42, 645–651.
- Blanco, M., Padola, N.L., Kruger, A., Sanz, M.E., Blanco, J.E., Gonzalez, E.A., Dahbi, G., Mora, A., Bernardez, M.I., Etcheverria, A.I., Arroyo, G.H., Lucchesi, P.M., Parma, A.E., Blanco, J., 2004b. Virulence genes and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. Int. Microbiol. 7, 269–276.
- Boerlin, P., McEwen, S.A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J.B., Johnson, R.P., Gyles, C.L., 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. J. Clin. Microbiol. 37, 497–503.
- Bonnet, R., Souweine, B., Gauthier, G., Rich, C., Livrelli, V., Sirot, J., Joly, B., Forestier, C., 1998. Non-O157:H7 Stx2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. J. Clin. Microbiol. 36, 1777–1780.
- Bouvet, J., Bavai, C., Rossel, R., Le Roux, A., Montet, M.P., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Atrache, V., Vernozy-Rozand, C., 2002. Effects of cutting process on pork meat contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7. Int. J. Food Microbiol. 77, 91–97.
- Bouvet, J., Montet, M.P., Rossel, R., Le Roux, A., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Vernozy-Rozand, C., 2001. Detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in pig samples (faeces, carcass, slaughterhouse and cutting plant) using PCR. Rev. Med. Vet. 152, 779–784.
- Brooks, J.T., Sowers, E.G., Wells, J.G., Greene, K.D., Griffin, P.M., Hoekstra, R.M., Strockbine, N.A., 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. J. Infect. Dis. 192, 1422–1429.
- Caprioli, A., Tozzi, A.E., Karch, H., 1997. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. Emerg. Infect. Dis. 4, 578–579.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1995. Outbreak of acute gastroenteritis attributable to *Escherichia coli* serotype O104:H21—Helena, Montana, 1994. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 44, 501–503.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2002. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating ground beef, United States, June–July 2002. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 51, 637–639.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2005. *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with ground beef from a U.S. military installation, Okinawa, Japan, February 2004. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 54, 40–42.
- 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. J. Clin. Microbiol. 33, 248–250.
- Cobbold, R., Desmarchelier, P., 2000. A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. Vet. Microbiol. 71, 125–137.
- Cobbold, R., Desmarchelier, P., 2002. Horizontal transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* within groups of dairy calves. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4148–4152.
- Cobbold, R.N., Rice, D.H., Szymanski, M., Call, D.R., Hancock, D.D., 2004. Comparison of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* prevalences among dairy, feedlot, and cow-calf herds in Washington State. Appl. Environ. Microbiol. 70, 4375–4378.
- Espie, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H., Vernozy-Rozand, C., 2006. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. Epidemiol. Infect. 134, 143–146.
- Fukushima, H., Hoshina, K., Gomyoda, M., 1999. Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5177–5181.
- Garber, L., Wells, S., Schroeder-Tucker, L., Ferris, K., 1999. Factors Associated with Fecal Shedding of Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dairy Farms. J. Food Prot. 62, 307–312.
- Geue, L., Segura-Alvarez, M., Conraths, F.J., Kuczius, T., Bockemuhl, J., Karch, H., Gallien, P., 2002. A long-term study on the prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms. Epidemiol. Infect. 129, 173–185.
- Hancock, D., Besser, T., Lejeune, J., Davis, M., Rice, D., 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. Int. J. Food Microbiol. 66, 71–78.
- Hancock, D.D., Besser, T.E., Rice, D.H., Ebel, E.D., Herriott, D.E., Carpenter, L.V., 1998. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. Prev. Vet. Med. 35, 11–19.
- Hussein, H.S., Sakuma, T., 2005a. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. J. Dairy Sci. 88, 450–465.

- Hussein, H.S., Sakuma, T., 2005b. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: pre- and post-harvest control measures to ensure safety of dairy cattle products. *J. Food Prot.* 68, 199–207.
- Irino, K., Kato, M.A., Vaz, T.M., Ramos, I.L., Souza, M.A., Cruz, A.S., Gomes, T.A., Vieira, M.A., Guth, B.E., 2005. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in Sao Paulo State, Brazil. *Vet. Microbiol.* 105, 29–36.
- Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D., Kaper, J.B., 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7839–7843.
- Kobayashi, H., Shimada, J., Nakazawa, M., Morozumi, T., Pohjanvirta, T., Pelkonen, S., Yamamoto, K., 2001. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 484–489.
- Leomil, L., Aidar-Ugrinovich, L., Guth, B.E., Irino, K., Vettorato, M.P., Onuma, D.L., de Castro, A.F., 2003. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. *Vet. Microbiol.* 97, 103–109.
- Martin, I.E., Tyler, S.D., Tyler, K.D., Khakhria, R., Johnson, W.M., 1996. Evaluation of ribotyping as epidemiologic tool for typing *Escherichia coli* serogroup O157 isolates. *J. Clin. Microbiol.* 34, 720–723.
- Mercado, E.C., Gioffre, A., Rodriguez, S.M., Cataldi, A., Irino, K., Elizondo, A.M., Cipolla, A.L., Romano, M.I., Malena, R., Mendez, M.A., 2004. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic calves in Argentina. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 51, 82–88.
- Miyao, Y., Kataoka, T., Nomoto, T., Kai, A., Itoh, T., Itoh, K., 1998. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* harbored in the intestine of cattle in Japan. *Vet. Microbiol.* 61, 137–143.
- Moreira, C.N., Pereira, M.A., Brod, C.S., Rodrigues, D.P., Carvalho, J.B., Aleixo, J.A., 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Vet. Microbiol.* 93, 179–183.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.
- Nielsen, E.M., Skov, M.N., Madsen, J.J., Lodal, J., Jespersen, J.B., Baggesen, D.L., 2004. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6944–6947.
- O'Brien, A.D., Kaper, J.B., 1998. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday, today and tomorrow. In: Kaper, J.B., O'Brien, A.D. (Eds.), *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*. ASM Press, Washington, DC.
- Orr, P., Lorencz, B., Brown, R., Kielly, R., Tan, B., Holton, D., Clugstone, H., Lugtig, L., Pim, C., MacDonald, S., et al., 1994. An outbreak of diarrhea due to verotoxin-producing *Escherichia coli* in the Canadian Northwest Territories. *Scand. J. Infect. Dis.* 26, 675–684.
- Padola, N.L., Sanz, M.E., Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J., Etcheverria, A.I., Arroyo, G.H., Usera, M.A., Parma, A.E., 2004. Serotypes and virulence genes of bovine Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Vet. Microbiol.* 100, 3–9.
- Paton, A.W., Paton, J.C., 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*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 598–602.
- Paton, A.W., Paton, J.C., 1999. Direct detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O111, O157, and O113 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3362–3365.
- Pradel, N., Livrelli, V., De Champs, C., Palcoux, J.B., Reynaud, A., Scheutz, F., Sirot, J., Joly, B., Forestier, C., 2000. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1023–1031.
- Rahn, K., Renwick, S.A., Johnson, R.P., Wilson, J.B., Clarke, R.C., Alves, D., McEwen, S., Lior, H., Spika, J., 1997. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. *Epidemiol. Infect.* 119, 251–259.
- Read, S.C., Clarke, R.C., Martin, A., De Grandis, S.A., Hii, J., McEwen, S., Gyles, C.L., 1992. Polymerase chain reaction for detection of verocytotoxinogenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources. *Mol. Cell Probes* 6, 153–161.
- Reid, S.D., Betting, D.J., Whittam, T.S., 1999. Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2719–2722.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgeson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A., Cohen, M.L., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308, 681–685.
- Schmidt, H., Beutin, L., Karch, H., 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 63, 1055–1061.
- Shere, J.A., Bartlett, K.J., Kaspar, C.W., 1998. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1390–1399.
- Van Donkersgoed, J., Berg, J., Potter, A., Hancock, D., Besser, T., Rice, D., LeJeune, J., Klashinsky, S., 2001. Environmental sources and transmission of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle. *Can. Vet. J.* 42, 714–720.
- Widiasih, D.A., Ido, N., Omoe, K., Sugii, S., Shinagawa, K., 2004. Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from naturally infected cattle. *Epidemiol. Infect.* 132, 67–75.
- Wilson, J.B., Renwick, S.A., Clarke, R.C., Rahn, K., Alves, D., Johnson, R.P., Ellis, A.G., McEwen, S.A., Karmali, M.A., Lior, H., Spika, J., 1998. Risk factors for infection with verocytotoxinogenic *Escherichia coli* in cattle on Ontario dairy farms. *Prev. Vet. Med.* 34, 227–236.

DEUXIÈME PARTIE : SURVIE DES STEC NON-O157 DANS LES EFFLUENTS D'ÉLEVAGES BOVINS

Publication N°2

Growth and survival of non-O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure

B. Fremaux, M.L. Delignette-Muller, C. Prigent-Combaret, A. Gleizal et C.
Vernozy-Rozand

Publié dans *Journal of Applied Microbiology* (2007), **102** : 89-99

Publication N°3

Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in cow slurry

B. Fremaux, C. Prigent-Combaret, M.L. Delignette-Muller, M. Dothal et C.
Vernozy-Rozand

Publié dans *Letter in Applied Microbiology* (2007), **45** : 55-61

Présentation des Publications n°2 et 3

1. Contexte et objectifs de ces études

Les effluents d'élevages bovins sont couramment épandus sur les sols comme fertilisants. Cette pratique permet de gérer et de valoriser les effluents produits par les exploitations. Cependant, en présence de bactéries potentiellement pathogènes telles que les STEC, ils peuvent être à l'origine de pollutions biologiques diffuses. Une récente étude réalisée en France a montré que 11% des fumiers bovins testés étaient positifs en STEC (Vernozy-Rozand *et al.*, 2002). Quelques travaux ont évalué la persistance d'*E. coli* O157:H7 dans le fumier ou le lisier, mais aucune étude s'est penchée sur les autres sérotypes. De plus, les expérimentations ont généralement été réalisées dans des petits volumes d'effluents, voire en microcosmes. Ainsi, les principaux objectifs de ces deux études étaient d'évaluer la survie des STEC non-O157 dans des quantités raisonnables de fumier et de lisier, tout deux issus de bovins laitiers. Notre étude a notamment mis l'accent sur l'impact du compostage du fumier sur la survie des STEC non-O157.

2. Matériels et méthodes

2.1. Etude n°1 : survie des STEC dans le fumier

Les STEC ne possédant pas de propriété biochimique commune, aucun milieu sélectif n'est disponible afin de les dénombrer. Par conséquent, 8 souches STEC non-O157 préalablement isolées de fèces de bovins laitiers, ont été transformées par électroporation avec un plasmide portant un gène codant une protéine de fluorescence (GFP) ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline (Figure 19). Des pré-essais réalisés dans des microcosmes de fumier ont été effectués afin de s'assurer du maintien au cours du temps du plasmide dans les cellules STEC. Ils consistaient à comparer les dénombrements des STEC obtenus sur milieux gélosés contenant de l'ampicilline à ceux obtenus par une méthode MPN-PCR ciblant les gènes *stx*.

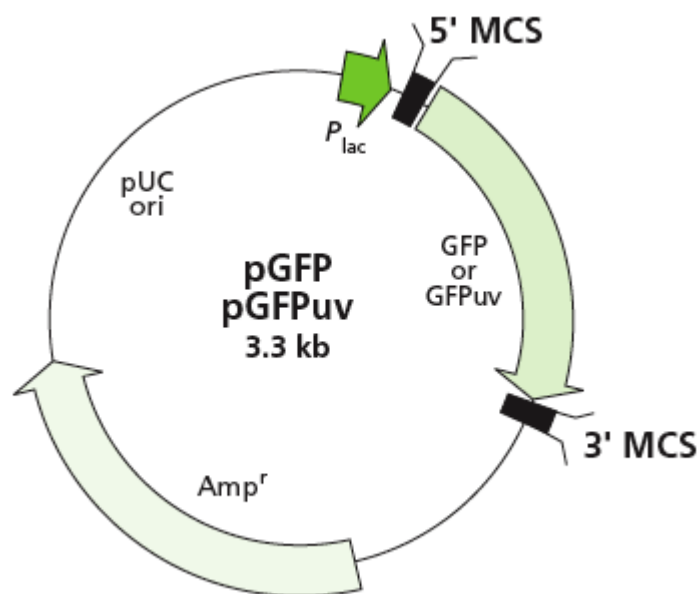


Figure 19 : Le plasmide pGFP_{uv} (Clontech™) est un vecteur d'expression procaryote. Il contient un gène de sélection permettant la résistance à l'ampicilline (Amp^R), une origine de réplication procaryote (pUC Ori) et un promoteur procaryote (pLac) en amont du gène codant la protéine autofluorescente GFP_{uv}.

Quatre tas de fumier issus de bovins laitiers et d'environ 2 m³ ont été préparés dans un lazaret de sécurité P2. Ils ont ensuite été inoculés avec un mélange des 8 souches STEC (pGFP_{uv}), à un niveau de 10⁶ à 10⁷ UFC g⁻¹ de fumier. Deux tas de fumier ont été régulièrement retournés (3 fois à 1 semaine d'intervalle) alors que les deux autres n'ont subi aucun retournement. Des dénombrements de STEC et le suivi de différents paramètres tels que : la température, le pH, le taux d'humidité et le potentiel d'oxydo-réduction (POR) ont été réalisés en différents sites dans les tas de fumier (Figure 20).

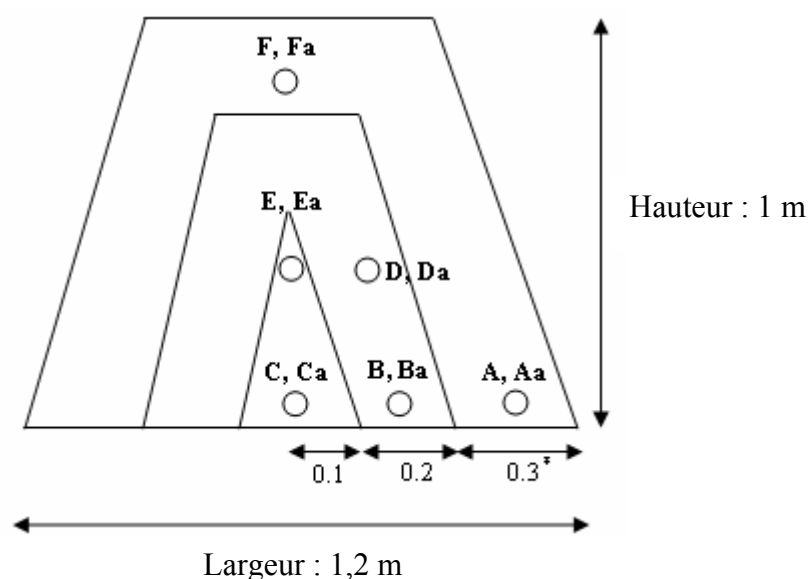


Figure 20 : Emplacement des différents sites échantillonnés dans les tas de fumier.

Pour chaque site et seulement pour les tas non retournés, un modèle de régression non linéaire (Geeraerd *et al.*, 2000) a été utilisé afin d'ajuster les valeurs de dénombrements des STEC obtenues pendant les 30 premiers jours de l'étude :

$$N = (N_0 - N_{res}) \exp(-k_{max} t) + N_{res} \quad (\text{équation 1})$$

où N correspond à la concentration en STEC en UFC g^{-1} observée au cours du temps t (en jours), N_0 correspond à la concentration en STEC en UFC g^{-1} à T_0 , N_{res} correspond à la population résiduelle en STEC en UFC g^{-1} , et k_{max} est le taux d'inactivation spécifique (en $jour^{-1}$) équivalent à $\ln(10) / D\text{-value}$.

Par ailleurs, les valeurs moyennes de pH et du POR obtenues pour les différents sites ont été comparées par une analyse de variance à un facteur. Des comparaisons multiples ont ensuite été réalisées en ajustant les seuils de signification (p) par la méthode de Bonferroni.

2.2. Etude n°2 : survie des STEC dans le lisier

Huit seaux contenant chacun 15 litres de lisier issu de bovins laitiers, ont été placés dans un lazaret de sécurité P2. Quatre souches STEC de sérotype O26:H11 (appelées A, B, C et D), préalablement isolées de fèces de bovins laitiers, ont été transformées par électroporation avec le plasmide pGFP_{uv}. De façon similaire à l'étude précédente, la stabilité du plasmide dans les

cellules a été confirmée dans des microcosmes de lisier. Ces souches STEC (pGFP_{uv}) ont toutes été pulstotypées au début et à la fin de l'étude, et la présence des gènes *stx1*, *stx2*, *eae* et *ehx* a été déterminée par PCR. Chaque souche a ensuite été inoculée dans 2 seaux différents à un taux de 10⁶ UFC ml⁻¹. Des dénombrements des STEC O26 (pGFP_{uv}) et un suivi du pH et du taux d'humidité ont été réalisés.

Les données de dénombrements (en UFC ml⁻¹) obtenues à partir des 2 seaux inoculés avec la même souche STEC O26:H11 ont été compilées puis ajustées à l'aide du modèle de régression non linéaire d'équation 1.

3. Résultats et discussion

3.1. Etude n°1 : survie des STEC dans le fumier

Pour l'ensemble des sites testés dans les andains retournés ou non, les STEC sont fortement inhibés durant les 10 premiers jours de l'étude et seule une population résiduelle persiste ensuite dans les tas de fumier. Les STEC ont été détectés en surface des tas pendant 42 jours dans les tas de fumier retournés et 90 jours dans ceux non retournés. Ce résultat a permis de confirmer l'effet bénéfique du retournement régulier des andains durant le processus de compostage puisqu'il permet une réactivation de la thermophase liée à la reprise d'activité de la flore aérobie indigène. Il permet également d'assurer une bonne homogénéité du traitement dans le tas. Un résultat similaire a été obtenu par Kudva *et al.* (1998) qui ont détecté *E. coli* O157:H7 pendant 47 jours dans des tas de fumier retournés. Cependant, d'autres études ont rapporté qu'*E. coli* O157:H7 ne survivait pas plus de 8 jours dans des tas de fumier retournés ou non (Lung *et al.*, 2001; Nicholson *et al.*, 2005). Ces résultats différents pourraient être expliqués par les faibles taux de STEC inoculés, mais également par le petit volume des tas de fumier utilisés par ces auteurs.

En outre, le taux d'inactivation spécifique des STEC (k_{max}) diffère selon le site échantillonné. Ainsi, dans les tas de fumier non retournés, il est d'autant plus élevé que l'on se rapproche du cœur des andains. En effet, la plus faible D-value (0,48) a été obtenue pour le site E, seul site où la température enregistrée atteint plus de 65°C (Figures 20 et 21).

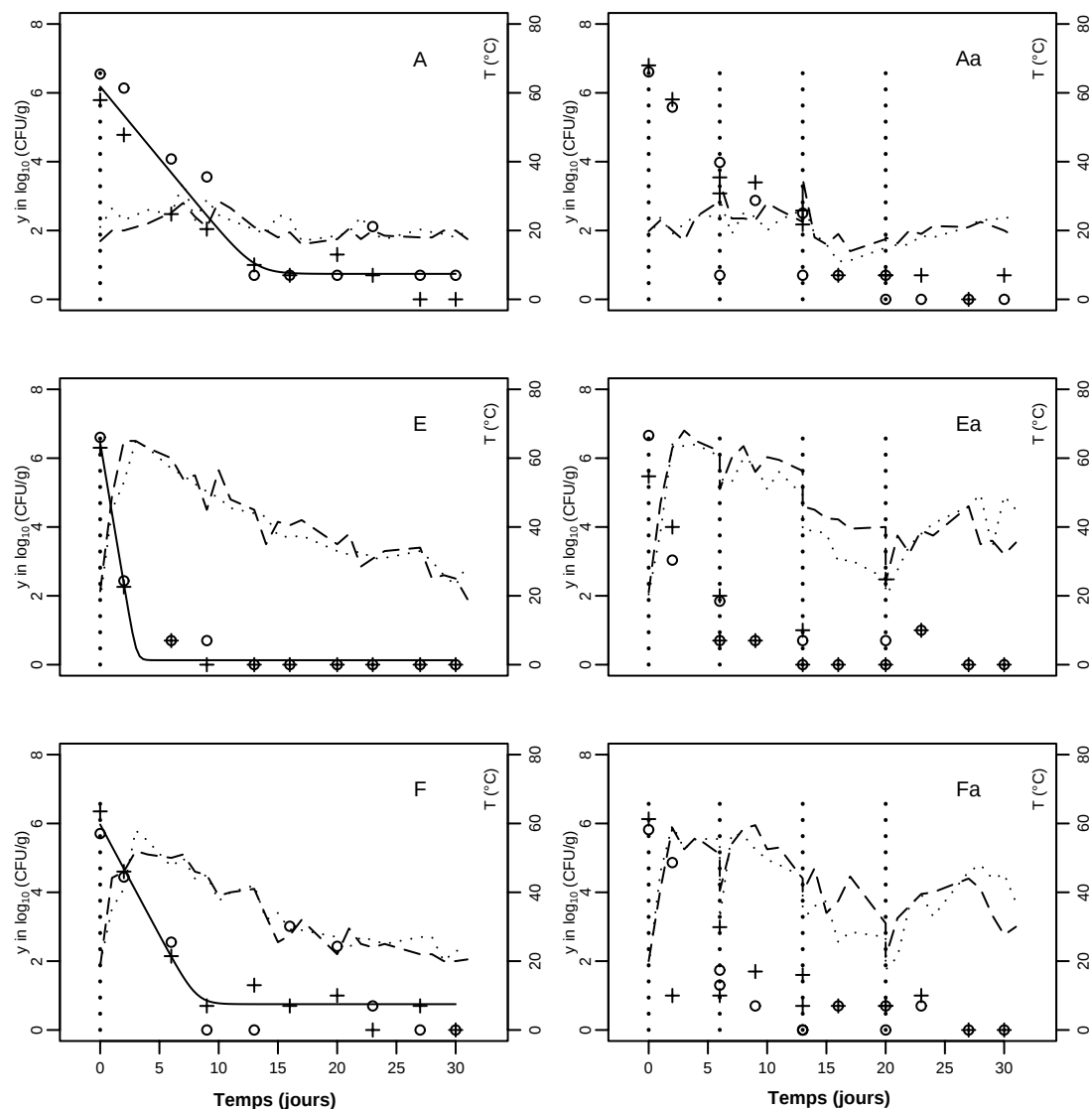


Figure 21 : Dénombrements des STEC dans les 2 tas non retournés (Tas 1 ○, Tas 2 +) pour chaque site A, E et F, ainsi que dans les 2 tas retournés (Tas 1 ○, Tas 2 +) pour chaque site Aa, Ea et Fa. Les lignes en pointillées (traits ou points) indiquent la température enregistrée dans chacun des sites échantillonnés. Pour les tas non retournés, les courbes théoriques ont été obtenues après ajustement des données de dénombrement à l'aide d'un modèle non linéaire. Les lignes verticales en pointillées indiquent les jours où les tas de fumier ont été retournés.

Un résultat similaire a été observé pour les sites Ca et Ea des tas retournés avec des températures respectives de 65°C et 68°C . Jiang *et al.* (2003b) ont observé le même phénomène avec une diminution de la concentration en *E. coli* O157:H7 de $4 \log \text{UFC g}^{-1}$, après 3 h à 55°C et, seulement, 15 min à 60°C et 3 min à 65°C . Ces résultats suggèrent qu'une température supérieure à 60°C est associée à une inhibition marquée des STEC. Concernant

les autres emplacements, d'autres facteurs biotiques et abiotiques pourraient être responsables de l'inhibition des STEC. Ainsi un pH élevé, l'interaction avec une flore indigène antagoniste et la faible teneur en eau, pourraient être à l'origine de l'assainissement des tas. Par exemple, un assèchement accentué (taux d'humidité $\leq 42\%$ en fin d'étude) a été observé à la surface des tas de fumier, les autres sites échantillonnés présentant un taux d'humidité (compris entre 72% et 83%) à peu près constant tout au long de l'étude. De plus, l'analyse de variance a montré que les valeurs de pH sont significativement différentes selon le site échantillonné ($P < 0,0001$). Le test de comparaisons multiples a souligné une différence significative ($0,0001 \leq P \leq 0,004$) entre les échantillons collectés au pied des tas (sites A et Aa) qui présentent les valeurs les plus élevées de pH (9,6 et 9,7), et les autres sites.

Enfin dans notre étude, tout les lixiviats de fumier collectés étaient contaminés en STEC, avec des effectifs allant de 1 à plus de 2 log UFC ml⁻¹. Ils pourraient donc être à ce titre de bons indicateurs du niveau de contamination des andains en STEC.

3.2. Etude n°2 : survie des STEC dans le lisier

Après ajustement des données par le modèle non linéaire, les taux d'inactivation obtenus pour les 4 souches STEC O26 (pGFP_{uv}) inoculées dans le lisier sont similaires. Les valeurs estimées de la D-value ainsi que leur intervalle de confiance sont respectivement de 10,19 [9,37 – 11,16], 11,75 [10,65 -13,15], 10,49 [9,55 – 11,63] et 12,01 [10,6 – 13,81] jours pour les souches A, B, C, et D. Les STEC ont progressivement été inhibés au cours des 68 premiers jours, et seules de faibles populations de STEC, détectées seulement après enrichissement, ont persisté jusqu'à 88 jours. Avery *et al.* (2005) ont également montré que des STEC de sérotype O157:H7 étaient encore détectés après 64 jours dans du lisier inoculé à un taux de 10⁷ UFC cm³. Les pulsotypes réalisés sur les 4 souches STEC O26 à T0 et en fin d'étude (T88) étaient identiques. Plusieurs paramètres tels que l'interaction avec la flore indigène antagoniste, le pH élevé et la faible teneur en eau, ont été probablement à l'origine de l'assainissement du lisier en STEC. En effet le pH du lisier atteignait une valeur moyenne de 9,5, et le taux d'humidité du lisier avait diminué d'environ 15% en fin d'étude.

4. Conclusion

Notre étude démontre que les STEC de sérotype non-O157:H7 sont capables de survivre durant une longue période dans les effluents d'élevages bovins. Afin de minimiser le risque de contamination environnementale par les STEC durant le stockage et après épandage des

effluents sur les sols, des bonnes pratiques de gestion des effluents d'élevages doivent être respectées. Ces résultats montrent que la durée de stockage des fumiers et des lisiers devrait être au minimum de 3 mois. Le compostage des fumiers devrait comporter au moins 3 étapes de retournements des tas de fumier espacées d'1 semaine au minimum. Le stockage devrait se faire uniquement sur des aires bétonnées, être inaccessible à la faune sauvage et tous les lixiviats de fumier devraient être collectés par une trappe prévue à cet effet.

ORIGINAL ARTICLE

Growth and survival of non-O157:H7 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manureB. Fremaux¹, M.L. Delignette-Muller¹, C. Prigent-Combaret², A. Gleizal¹ and C. Vernozzy-Rozand¹¹ Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle – Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Étoile, France² UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Université Claude Bernard (Lyon1), Villeurbanne, France**Keywords**cow, *Escherichia coli*, manure, Shiga toxin, survival.**Correspondence**

B. Fremaux, Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle – Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon 69280, Marcy l'Étoile, France. E-mail: b.fremaux@vet-lyon.fr

2005/1487: received 16 December 2005, revised 10 April 2006 and accepted 21 April 2006

doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03059.x

Abstract

Aims: The main objective of this study was to evaluate the behaviour of non-O157:H7 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in cow manure. **Methods and Results:** A mixture of eight green-fluorescent-protein-labelled STEC strains was inoculated around 10^6 – 10^7 CFU g⁻¹ into four manure heaps. Two heaps were regularly turned and the two others remained unturned. STEC counts and physical parameters (temperature, pH, moisture content and oxido-reduction potential) were monitored for 1000 manure samples. The highest mean pH values were obtained near the surface at the base of all manure heaps. At the surface, the moisture content decreased from 76.5% to 42% in turned heaps. Temperatures reached 65°C near the main body of all manure heaps, and only 35°C near the superficial parts located at the base of them. These two sites (the centre and the base) were associated with *D* values for the STEC counts of 0.48 and 2.39 days, respectively. We were able to detect STEC strains during 42 days in turned manure heaps and during at least 90 days in unturned ones.

Conclusions: These results emphasize the long-term survival of non-O157:H7 STEC in cow manure.

Significance and Impact of the Study: Good management practices (e.g. turning) should be respected in order to minimize the risk of environmental contamination by STEC.

Introduction

Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are emerging foodborne pathogens. STEC strains were associated with both sporadic cases and outbreaks of haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in patients, especially among children and elderly persons. Although *E. coli* O157:H7 is currently the most common serotype isolated from patients and the most reported in literature, other serogroups including O26, O103 or O111 are being more and more frequently recovered from infected patients.

Ruminants are recognized as the principal reservoir of STEC, and so undercooked beef, dairy product or vegetables contaminated by the faeces of infected cattle are frequent sources of human STEC infection. 10–25% of cattle

are healthy carriers of STEC but highest levels have been reported for cattle from Brazil (Moreira *et al.* 2003) or France (Pradel *et al.* 2000).

A previous study highlighted that 11% of manure samples from French dairy cattle were contaminated by STEC (Vernozzy-Rozand *et al.* 2002). A composting process of animal excrements is frequently included in farming practices to convert agricultural effluents into organic fertilizers before their spreading on culture crops. The transfer of pathogens to food through the application of animal manures to agricultural land is well described (Cieslak *et al.* 1993; Pell 1997). Manure that consists of animal excrements (faeces and urine) mixed with bedding is a complex biological process with thermal variations mainly because of fermentation by indigenous bacteria. A recent study demonstrated a

4 log₁₀ CFU g⁻¹ reduction of *E. coli* O157:H7 in cow manure compost after 15 min at 60°C (Jiang et al. 2003b). Another study revealed that *E. coli* O157:H7 strains could survive 47 days (Kudva et al. 1998) in cow manure heaps (volume = 100 cm³) exposed to climatic changes. These studies were limited to the O157:H7 serotype or were performed on very small manure heaps. Therefore, little is known about the growth and survival of STEC strains in dairy cow manure prepared and treated in compliance with commonly established dairy farms practices.

The main objective of this work was to study the survival and growth of STEC strains isolated from dairy cattle in cow manure. STEC strains were transformed with the green fluorescent protein plasmid vector (pGFPuv) and inoculated into different 2 m³ heaps of fresh cow manure. Samples were taken at regular time intervals and in different parts of the heaps for determination of pH, moisture content, oxido-reduction potential (ORP) and numeration of transformed STEC bacteria by direct plating.

Materials and methods

Transformation of STEC strains

STEC strains

Eight STEC strains, all from faeces of one dairy cattle, were isolated between January 2003 and August 2004 during the course of a previous study (Fremaux et al. 2006). These *E. coli* strains were characterized for the presence of genes coding virulence factors: *stx1* and *stx2*, respectively, coding the Shiga toxins 1 and 2, *eae* coding the intimin and *ehx* coding the enterohaemolysin. Five STEC strains were *stx1* (+), 6 *stx2* (+), 4 *eae* (+) and 7 *ehx* (+). Two carried the four genes: *stx1*, *stx2*, *eae* and *ehx*. None of them belonged to the O157:H7 serotype.

Preparation of the transformant STEC cells

The eight STEC strains were electroporated in the presence of a plasmid vector pGFPuv (Ozyme, Montigny-Le-Bretonneux, France) carrying ampicillin resistance gene and the green fluorescent protein (GFP) open reading frame, according to the protocol described by Delazari et al. (1998) with minor changes. The competent bacterial cells were electroporated in a Gene Pulser II (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) with the plasmid vector pGFPuv and an electrical pulse of 4.7 ms was applied at 2.5 kV and 25 µF with the pulse controller adjusted to 200 Ω. The resulting ampicillin-resistant-transformed cells showed bright green fluorescent colour when viewed under UV light at 365 nm (Herolab, Wiesloch, Germany).

Control of stability of the plasmid vector pGFPuv in STEC cells

Each GFP-labelled STEC strain was initially inoculated at a level of 10⁶ CFU g⁻¹ in small manure piles of 100 g. Each pile was sampled every week for 1 month. Each GFP-labelled STEC strain was enumerated by direct plating procedure and by the most probable number (MPN)-PCR *stx* method, as described in the following section.

The MPN-PCR *stx* protocol

The MPN procedure was performed using 96-well µl plates (Haines et al. 1996; Wrenn and Venosa 1996). Six-fold dilution series were prepared from all the manure samples. Fifty microlitres of each dilution were placed in 96-well µl plates, with five replicates per dilution. Then, 150 µl of enrichment broth, buffered peptone water (BPW; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), was added to each well containing dilution. The plates were incubated for 24 h at 37°C. Thus, 1 µl of each well suspension was added to the PCR mixture containing bovine serum albumin (20 mg ml⁻¹) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich), and subjected to the PCR *stx*. For each dilution, the *stx*-positive wells were enumerated and the MPN was estimated using standard Mac Grady tables (Hugues and Plantat 1983).

PCR detection of *stx* genes

The PCR was performed with degenerate primers ES149 and ES151, as described by Read et al. (1992). The amplification reactions were processed through 40 cycles in the PCR T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany). After an initial denaturation step of 5 min at 94°C, the cycle program consisted of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 49°C for 30 s and extension by DNA polymerase at 72°C for 30 s. To ensure complete strand extension, the reaction mixture was incubated for 7 min at 72°C after the last cycle. The amplified product was visualized by ethidium bromide staining after gel electrophoresis of 10 µl of the final reaction mixture on 2.5% agarose.

Preparation and inoculation of the manure heaps

Preparation of the manure heaps

Approximately 10 m³ of fresh cow manure was collected from one dairy farm in Rhône-Alpes region, in early spring 2005. To prove that manure was STEC free, several manure samples were collected from different parts of the initial manure heap. The enrichment of these and the DNA preparation were performed as described previously (Fremaux et al. 2006). A 1000-fold dilution of the DNA extract was subjected to the PCR *stx*. Then, the manure

was divided into five heaps, each of which had a volume of 2 m³ with a rectangular base of approx. 2 m² and a height of 1 m. The manure heaps were kept indoors in five separate rooms (P2 safety) for 3 months. The room temperature remained around 15°C during the course of the present study. Manure liquids were collected and evacuated by a specific trap. Three of the heaps were unturned and the two others were turned by mixing them three times during the study at interval of 7 days between each turning. Each heap was turned with a pitchfork.

STEC suspension and inoculation of the manure heaps

Each GFP-labelled STEC strain was grown overnight at 37°C on BHI plates (bioMérieux) containing ampicillin (150 µg ml⁻¹) (BHI-A). One colony of each GFP-labelled STEC strain was cultivated in 1 l of BHI broth plus ampicillin (150 µg ml⁻¹) at 37°C for 24 h (total bacterial culture, 8 l). All the cultures reached a final concentration of approx. 10⁹ CFU ml⁻¹. The bacteria were sedimented by centrifugation at 5000 g for 20 min, and cell pellet was resuspended in 400 ml of phosphate-buffered saline and centrifuged. This procedure was repeated once and finally the cell pellets corresponding to the eight STEC strains were resuspended together in 800 ml of Tryptone medium (bioMérieux). The mixed suspension (800 ml) was used to inoculate four manure heaps to yield a final concentration ranging from 10⁶ to 10⁷ CFU g⁻¹ at the start of the study. The last heap was used as a control negative heap. Each cubic metre was inoculated by pulverization with 100 ml of bacterial suspension and carefully turned and mixed to allow the uniformity of the inoculation. The latter was checked by enumerating STEC cells. Then samples of each manure heap were collected and analysed in the laboratory.

Sampling of solid and liquid manure

Different parts in each manure heap were sampled according to Fig. 1. For the unturned manure heaps, samples were collected from surface (sites A and F), the inner layers (sites B and D) and the main body (sites E and C). The corresponding sites for turned manure heaps were noted Aa to Fa. As the manure heaps could settle as a result of heat and moisture loss over a short time, the different sampling sites were relocated to appropriate relative positions. Furthermore, after each sampling occasion, each site was refilled with manure from the same location. Manure samples were taken for microbiological analysis at regular time intervals (using sterile gloves, changed between samplings). The liquids collected in the trap and on the floor near the heap were also sampled every week. Temperature results are obtained from the average of different points within each location. Inside

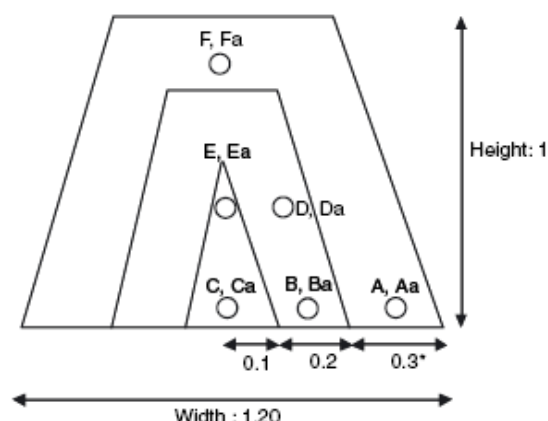


Figure 1 Cross section of a manure heap and location of the different sampling sites. The sites were noted A to F and Aa to Fa for unturned and turned manure heaps, respectively. The sites A, Aa and F, Fa were at the surface of the heaps (on the first 30 cm), the sites B, Ba and D, Da in the inner layers (30–50 cm) and the sites C, Ca and E, Ea in the main body (50–60 cm) of the heaps. *Measurements are expressed in metres.

samples from manure heaps were taken with hands protected with long sterile gloves. When the hand of the operator reached the appropriate location, a handful of manure was collected and carefully withdrawn from the heap to obviate any cross-contamination.

Hundred samples were collected per week (approx. 1000 samples were analysed during the course of the present study), transported to the laboratory and analysed at the same day.

Analysis

Enumeration of STEC cells by direct plating assay

Each manure sample (25 g) was added to 225 ml of BPW (bioMérieux) complemented with ampicillin (150 µg ml⁻¹) in a sterile Bagfilter (Interscience, Saint Nom La Breteche, France) and stomached for 30 s at medium speed. Aliquots from appropriate dilution series were spread onto selective BHI-A plates, which were incubated at 37°C for 24 h. The GFP-labelled STEC colonies were counted under UV light.

Concerning the liquid manure samples, 1 ml of each of them was taken and added to 9 ml of BHI broth. Aliquot of 1 ml was spread onto BHI-A plates that were incubated at 37°C for 24 h.

The enrichment of the sample was required when no colony of STEC was detected on the plate spread with the first decimal diluted suspension which means less than 10 STEC ml⁻¹. To enrich these poor STEC-contaminated samples, we incubated the first decimal diluted suspen-

sion (Bagfilter) at 37°C for 24 h. After the enrichment step, 1 ml of the enriched suspension was plated onto BHI-A. The plates were incubated for 24 h at 37°C and placed under UV light to confirm the presence or absence of STEC strains in the sample.

Physical and chemical assays

The physical and chemical parameters were measured for each site in all manure heaps at regular time intervals. Total moisture content was determined by drying 5 g of manure at 105°C for 24 h and weighing the residual. The pH of manure sample was measured after adding 5 g of manure to 250 ml of distilled water. The suspension was then stirred for 5 min and was allowed to settle for 5 min. The pH of the liquid was measured with a pH meter 330 (WTW, Champagne au Mont d'Or, France). The ORP was measured by an ORP electrode sentix 81 (WTW). The temperature was measured with a thermic probe (WTW).

Statistical analysis

At each site and only for the unturned heaps, the log-linear model with tailing (Geeraerd *et al.* 2000) was used to fit the STEC counts observed at the beginning of the kinetics, i.e. during the first 30 days

$$N = (N_0 - N_{res}) \exp(-k_{max}t) + N_{res}$$

where N represents the STEC density (CFU g⁻¹) observed at time t (days), N_0 is the STEC density (CFU g⁻¹) of the inoculum, N_{res} is the residual STEC density (CFU g⁻¹), and k_{max} is the specific inactivation rate (day⁻¹) equal to $\ln(10)/D$ value. Estimated values of k_{max} for each site were graphically reported with their respective 95% confidence intervals. This model was fitted on the decimal logarithm of the STEC counts using the Ginfat tool (Geeraerd *et al.* 2005).

Statistical comparisons of pH and redox mean values between sites were performed using a one-way ANOVA. Multiple comparisons were performed using Bonferroni's correction for P values. These statistical calculations were performed using the R software version 1.9.0 (Ihaka and Gentleman 1996).

Results

Stability of the plasmid vector pGFPuv in STEC cells

A first assay was performed to confirm the stability of the plasmid vector pGFPuv in nonselective conditions. The GFP-labelled STEC strains could be enumerated for 14 days. At the 7th and the 14th day, the level of all GFP-labelled STEC strains was around 10⁴ and

10² CFU g⁻¹, respectively. These results were consistent with those noted using the MPN-PCR method. After 21 days, no *gfp*⁺ STEC strains could be detected, even after an enrichment step.

STEC counts and temperature profiles in unturned cow manure heaps

As shown in Table 1, the STEC inoculum levels ranged from 5.45 to 6.81 log₁₀ CFU g⁻¹. The enumerations of STEC and the readings of temperatures were performed for each of the six sites of the heaps and during the whole sampling period. The results obtained for the sites A, E and F during the first month of the present study are displayed in Fig. 2. The log-linear model with tailing was fitted to STEC counts data (Fig. 2), which permits an estimation of the specific inactivation rate (k_{max}) and of the D value ($\ln(10)/k_{max}$). The specific inactivation rates with asymptotic 95% confidence intervals for each site of unturned manure heaps are shown in Fig. 3.

The specific inactivation rate of STEC progressively increases as it approaches the heart of the manure piles (Fig. 3). The estimated D values of the sites A (near the surface at the base of the heap), F (on the surface at the top of the heap), B (inner layers at the base of the heap), C (in main body at the base of the heap) and D (inner layers in the middle of the heap) were 2.39, 1.57, 1.54, 1.15 and 0.78 days, respectively. Compared with the results obtained with these precited sites, site E (main body in the middle of the heap) was associated with the

Table 1 Time of survival of GFP-labelled STEC strains in the different sites of all manure piles and maximum temperature recovered in each of them

Sites	Maximum temperature (°C)	STEC count (log ₁₀ CFU ml ⁻¹) at day 0	Time of survival of STEC (days)
Unturned piles			
A	35	6.17	90
B	46.5	6.67	42
C	59	5.45	23
D	56	5.57	16
E	65	6.45	9
F	58	6.03	90
Turned piles			
Aa	35	6.7	42
Ba	46.5	6.81	42
Ca	65	6.17	20
Da	58	5.81	35
Ea	68	6.07	23
Fa	59.5	5.97	23

weakest D value of 0.48 days. For all the sites, the STEC cells markedly decreased during the first 10 days but residual STEC populations could be detected for at least 90 days in sites A and F, and only 9 days in site E (Fig. 2; Table 1). The initial temperature was around 20°C in all sites from the manure heaps. Thereafter, the temperature reached maximum values of 46.5°C, 59°C, 56°C and 58°C for the sites B, C, D and F, respectively, but only 35°C in site A (Table 1). Inside site E, the temperature was higher than those noted in other sites, with a maximum temperature being recorded at 65°C. Average temperatures of 37°C in site B, 51°C in sites C, D and F and 61.5°C in site E were noted between the second and the sixth days. Then the temperature declined gradually to reach its initial level (20°C) for all the sites.

STEC counts and temperature profiles in turned cow manure heaps

The turning of the heaps resulted in a noticeable fluctuation of both STEC counts and temperature in each sampled site (Fig. 2). As a consequence, no model could be adequately fitted to the data obtained. STEC strains could not be detected after 42 days from manure. As shown in the Table 1, a residual STEC population was recovered from manure heaps up to 42 days in sites Aa (a: corresponding to turned manure heaps) and Ba, 35 days in Da, 20 days in site Ca and 23 days in sites Ea and Fa.

STEC counts decreased by approx. $4 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ during the first 10 days of our study in sites Aa and Ba, but only for the first 8 days in sites Da and Fa and 5 days

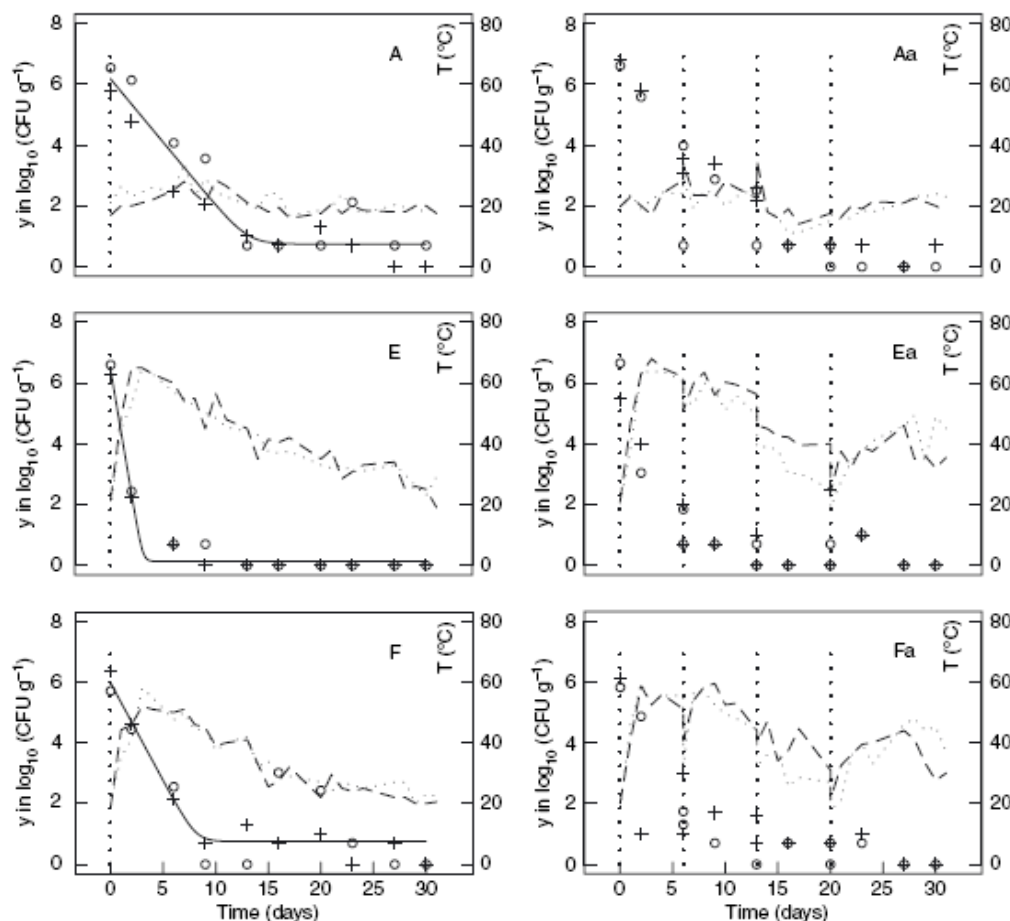


Figure 2 STEC counts obtained in the two unturned manure heaps [heap 1 (○), heap 2 (+)] for each site A, E and F and the two turned manure heaps [heap 1 (○), heap 2 (+)] for each site Aa, Ea and Fa. The dotted lines indicate each temperature profile obtained in the site of the two manure piles. The exponential decay lines represent the log-linear model with tailing only fitted to the survival data of the different sites in unturned manure heaps. The aeration times are displayed with vertical dotted lines for the turned manure heaps.

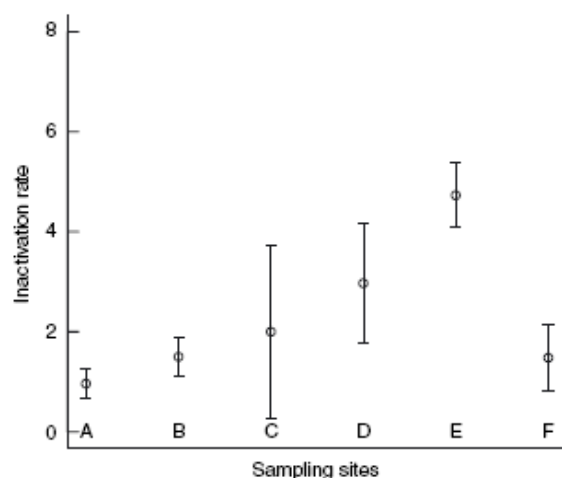


Figure 3 Specific inactivation rate in cow manure with 95% confidence interval estimated for each site in unturned manure heaps.

in sites Ca and Ea (Fig. 2). This fall of STEC concentration was concomitant to a marked increase in the temperature to maximum values of 65°C and 68°C in sites Ca and Ea with average values of 58°C and 62.2°C between the second and the eighth days, respectively. Over the same period, the sites Da and Fa had temperatures ranging from 58°C to 59.5°C with average values of 54°C and 56°C, respectively. The lowest temperatures were obtained for sites Aa with an average value of 22.5°C and Ba with 36°C. At the second turning (13th day), only residual STEC populations could be detected in manure heaps. Then the temperature decreased, ranging from 30°C to 37°C in all the sites except for the sites Aa and Ba for which the temperature reached around 20°C at the 17th day of the study (Fig. 2). The third turning led to a slight rise in the temperature that reached 40°C in both the four locations Ca, Da, Ea and Fa, and 25°C for the sites Aa and Ba, before finally decreasing to its initial level of 20°C.

STEC counts in liquid manure

The liquid manure appeared on the soil approx. 9 days after the storage of the manure heaps in different rooms. The STEC counts were superior to $2 \log_{10}$ CFU ml^{-1} in all the sampling sites (floor near all manure heaps and recuperation traps) except for the recuperation traps close to the turned heaps in which STEC counts ranged from 1 to $2 \log_{10}$ CFU ml^{-1} . These results were comparable to those obtained in sites A, Aa, B and Ba (approx. $2 \log_{10}$ CFU g^{-1}). After the 35th day, a fall of STEC contamination ($<0.5 \log_{10}$ CFU ml^{-1}) was noted (a complete

drying of the liquid from all manure heaps did not allow any sampling).

Determination of pH, ORP and moisture content

Results are expressed as mean values obtained on the one hand for the two unturned manure heaps and on the other for the two turned heaps. For each site, the pH and ORP parameters have only slightly fluctuated during the course of the study and were consequently expressed as mean values. The results are summarized in Fig. 4.

A significant site effect was obtained for pH values using the ANOVA test ($P < 0.0001$). Multiple comparisons

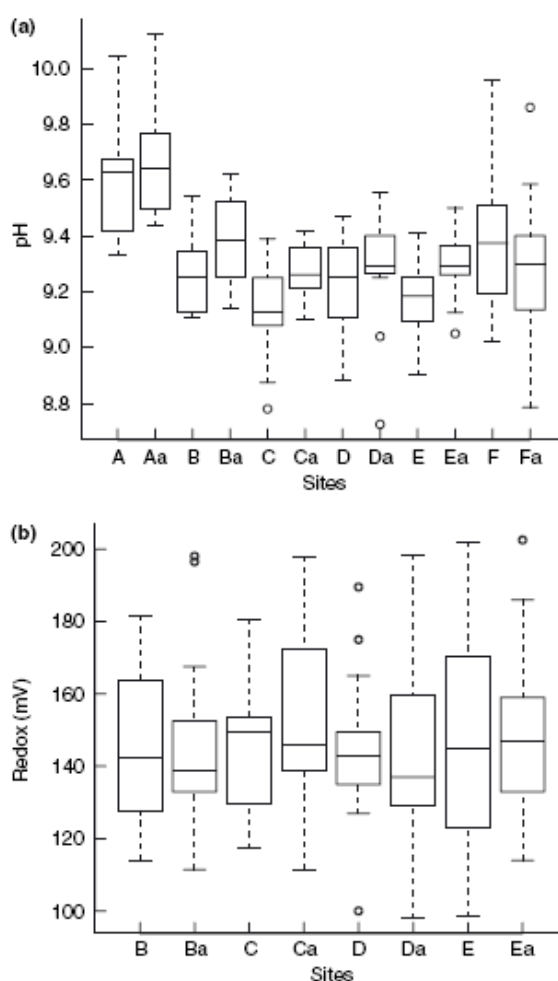


Figure 4 Box plots of pH and redox values obtained for each site in unturned and turned manure heaps. The 25th, 50th (median value) and 75th percentiles and extreme values (displayed by two tails) are shown.

showed a significant difference ($0.0001 \leq P \leq 0.004$) between samples collected near the surface at the base of all manure heaps (sites A and Aa) that presented the highest mean pH values (9.59 and 9.67) and the other sites. Concerning these other sites, a mean value of 9.3 was noted for both turned and unturned manure heaps.

The ORP values ranged from -97.5 to -200 mV in the inner layers and in the middle of the cow manure heaps, with no significant difference between all the sites ($P > 0.05$). Mean values of -152 mV was obtained for turned and unturned heaps, indicating anaerobic conditions in the middle and inner layers.

The moisture content was high and remained steady during the course of the study with values ranging from 72% to 83% for inner layer and middle of all manure heaps (sites B, Ba, C, Ca, D, Da and E, Ea) (Fig. 5). At the surface (sites A, Aa and F, Fa), it decreased over time from 76.5% to 42% for turned heaps and from 77.5% to 37% for unturned heaps, showing a drying at the surface of the heaps, with a fastest drying observed near the surface at the base of all manure heaps.

Furthermore, the same trends for pH, redox and moisture content profiles were observed for the negative control manure heap (data not shown).

Discussion

As the prevalence of cattle carrying STEC in their faeces may be high, 6% reported in a US study (Cray *et al.* 1996) to 71% in a French study (Pradel *et al.* 2000), and as STEC is known to survive for long periods in cow faeces (126 days at 15°C) (Fukushima *et al.* 1999), manure that is a mix of animal excreta (faeces plus urine) and bedding could constitute an important vehicle for environmental STEC contamination (Pell 1997).

The objective of our study was to examine the survival of eight GFP-labelled STEC strains inoculated in cow manure. We also monitored the physical and chemical parameters such as temperature, pH, moisture content and ORP. Previous works studied the survival of *E. coli* O157:H7 in cow manure, but none of them described the behaviour of non-O157:H7 strains (Kudva *et al.* 1998; Himathongkham *et al.* 1999; Jiang *et al.* 2003a; Nicholson *et al.* 2005). Furthermore, we wanted that our experiment was closed to real farming practices. Consequently, we used heaps of fresh manure with a volume of 2 m^3 . This size was larger than those used by Himathongkham *et al.* (1999), Jiang *et al.* (2003a) and Kudva *et al.* (1998), with 120 g, 15 dm^3 and 100 cm^3 of manure heaps, respectively. The STEC inoculum level was fitted to 10^6 – 10^7 CFU g^{-1} in order to be in conditions simulating a high STEC quantity in faeces, which can reach 10^8 CFU g^{-1} (Fukushima and Seki 2004). Moreover, a large diversity of STEC strains isolated from

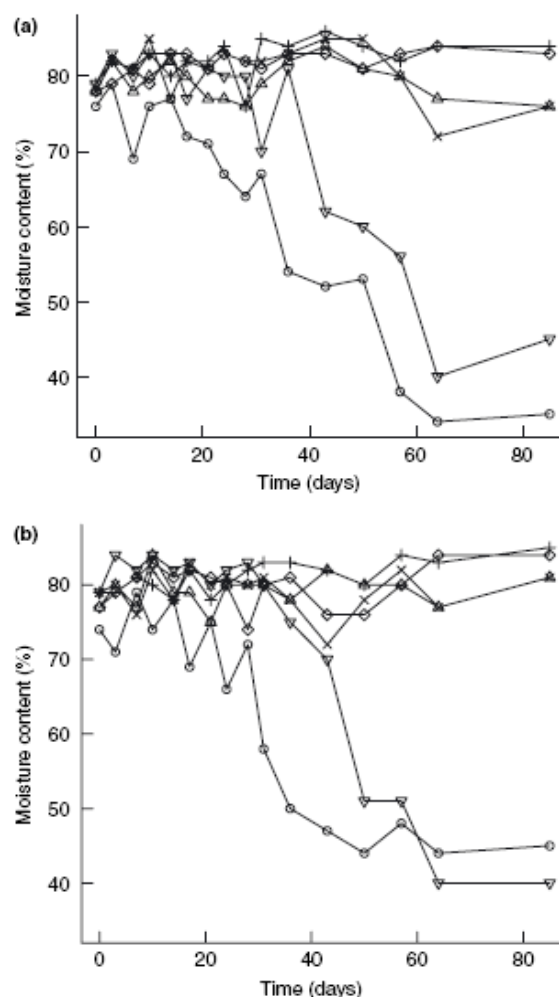


Figure 5 Mean values of moisture content profiles obtained during the course of the study for each site in unturned manure heaps (a: $\circ$, A; Δ , B; $+$, C; $\times$, D; $\diamond$, E; ∇ , F) and turned manure heaps (b: $\circ$, A; Δ , Ba; $+$, Ca; $\times$, Da; $\diamond$, Ea; ∇ , Fa).

faecal samples of a same dairy farm was previously reported (Beutin *et al.* 1997; Nielsen *et al.* 2004). Consequently and in an attempt to be closed to dairy farm conditions, a mix of eight STEC strains was used to inoculate all manure heaps. In compliance with European rules set for the utilization of STEC and genetically modified organisms, we placed the manure heaps in a lazaret of P2 safety level to ensure environmental protection.

STEC strains do not have common biochemical characteristic allowing the use of specific media for their isolation. Instead of using a genetical method including a *stx* PCR on enriched broths followed by a hybridization step with *stx* probe to mark the STEC colonies on the

plate, which is a time-consuming and difficult-to-perform method, we transformed eight STEC strains with a pGFP plasmid. These STEC strains were previously isolated from faecal samples and immediately stocked at -80°C in order to prevent the loss of survival characteristics and particularly the ability to attach to surfaces. The stability of the *gfp* gene used to label a large variety of bacterial species has been checked under different high-pressure conditions in previous studies (Fratamico et al. 1997; Delazari et al. 1998; Ehrmann et al. 2001; Vialette et al. 2004). The plasmid did not affect the intrinsic characteristics of the *E. coli* O157:H7 strains under nonfavourable environmental conditions, i.e. high concentrations of NaCl or high temperatures, and no significant difference of behaviour was noted between the transformed *E. coli* O157:H7 strains and their parent strains (Ehrmann et al. 2001; Vialette et al. 2004). To make sure that the eight transformed STEC strains would not lose their plasmid during our study, we made a preliminary experiment using small manure heaps (100 g) inoculated with 10^6 CFU g^{-1} of each of our eight STEC strains. An MPN-PCR *stx* assay was performed in parallel and confirmed the counts obtained with the direct plating method, demonstrating a persistence of the plasmid inside the STEC cells during the course of this preliminary work, i.e. 21 days. An MPN-PCR *stx* assay was also used at some steps of the present study to check the possible loss of the plasmid or the none expression of the *gfp* gene. As in the preliminary work, similar results were obtained by direct plating method and MPN-PCR *stx* assay (data not shown). Finally, PCR detections of *stx* genes were randomly performed to confirm that fluorescent colonies screened on agar plates under UV light were STEC colonies.

Faeces composting, i.e. manure, is frequently included in farming practices to recycle organic materials mainly because it allows the transformation of organic compounds into biologically stable humic substances that make excellent soil amendments. This process also leads to the reduction of the contamination by numerous pathogenic micro-organisms. This clearance is readily explained by a thermal destruction. More precisely, the composting process may be divided into three distinct phases: a mesophilic phase, a thermophilic phase, during which common pathogens are killed, followed by a gradually decrease of temperature, called curing phase. The temperature increase is mainly because of the action of indigenous aerobic flora (fungi, bacteria and protozoa) and is associated with an important release of water, CO_2 and ammonia. Composting with some turning results in aerobic conditions allowing the increase of the aerobic flora activity and then a more efficient decomposition of the faecal materials (Rynk 1992).

In our experiment, composting process included a short mesophilic phase of approx. 2 days, followed by a thermophilic phase of 1 week for unturned manure heaps and 2 weeks for turned ones, with a marked increase in temperature for sites C, D, E and F of all manure heaps. However, only sites Ca, E and Ea showed temperatures superior or equal to 65°C . Sites A and B of all manure heaps showed lower temperatures with maximum values of 35°C in both the sites A and Aa, and 46.5°C in both the sites B and Ba. These results might be due at least in part to the loss of heat from the superficial parts (A and Aa) and to the uneven distribution of oxygen and nutrients that might influence the microbial activity. Furthermore, the heat release towards the top of the manure heap explained the fact that site D or F displayed a higher temperature than the one noted in site B.

The highest pH value was noted near the surface at the base of all manure heaps (9.59 and 9.67). On the contrary, Himathongkham et al. (1999) or Jiang et al. (2003a) found higher pH values (8.97 and 8.45, respectively) near the top of the heaps. We have no explanation for those discrepant results. The moisture contents were fairly steady in our study for the middle and inner layers but decreased on the surface of the manure heaps. The values ranged from 77.5% to 37% for unturned heaps and from 76.5% to 42% for turned manure heaps. Similarly, Himathongkham et al. (1999) and Jiang et al. (2003a) indicated lowest moisture content at the surface of the heap, near the top of the heap (59.3%) for the first ones and near the base of the manure heap (44.7%) for the second ones. As far as the ORP is concerned, it was negative for all manure heaps, regardless of the turning, demonstrating anaerobic conditions in main body and inner layers of the manure heap. Similar observations have already been reported, with ORP values that ranged between -70 and -230 mV (Himathongkham et al. 1999).

The GFP-labelled STEC strains were detected during 42 days in the periphery of turned manure heaps and 90 days in unturned ones. These results confirm the turning effect and were similar to the earlier findings of Kudva et al. (1998), who detected *E. coli* O157:H7 in turned cattle manure heaps during 47 days. However, another study reported that *E. coli* O157:H7 could survive no more than 8 days in unturned manure heaps and 4 days in turned manure heaps (Nicholson et al. 2005). Likewise, Lung et al. (2001) showed that *E. coli* O157:H7 could survive for 4 days in 560 g of cow manure placed inside Pyrex glass chamber and incubated at 45°C . This short duration could be explained by the low inoculum size and the small manure heaps used by the authors and strongly contrasts with the composting process carried out in farming practices. All the more, as several factors could affect the

recovery of STEC from manure heaps and thus influenced the survival data obtained in our experiment. Especially, the existence of inaccessible niches to the sampling as a result of the formation of microcolonies, by attachment to the surface of manure fibres, could influence the removal and the undistribution of the bacteria from the heap. Moreover, the possibility of the unicellular protozoa feeding on the bacteria cannot be dismissed (Kuczyńska and Shelton 1999). A previous study demonstrated that *E. coli* O157:H7 may still be able to survive for an extended period after being consumed by protozoa (Barker et al. 1999).

During the mesophilic phase, no evidence of multiplication of the STEC strains was noted for all manure heaps, contrary to other studies that indicated a slight growth of *E. coli* O157:H7 (Delazari et al. 1998; Himathongkham et al. 1999; Jiang et al. 2003a). For example, Delazari et al. (1998) reported an increase of *E. coli* O157:H7 counts from 7.84 to 8.25 log₁₀ CFU g⁻¹ for the first 5 days at 37°C. During the active phase of the composting, we noted the highest decrease of STEC counts in site E for unturned manure heaps and in sites Ca and Ea for the turned heaps. The high temperature noted in these sites (≥65°C) readily explained the marked inactivation or the death of the inoculated STEC strains. In fact, Jiang et al. (2003b) showed a decrease of *E. coli* O157:H7 concentration by 4 log₁₀ CFU g⁻¹ for 3 h at 55°C, only 15 min at 60°C and 3 min at 65°C. These results highlighted that a temperature exceeding 60°C is linked to a far more rapid clearance of STEC cells. But our *D* values (≥0.48 days) greatly exceeded those noted in Jiang et al. (2003b) study. This could be explained by the smaller manure heap used by these authors implying a too rapid temperature increase that could prevent an adaptation of some *E. coli* O157:H7 cells to a thermal stress. As far as the sites C, D, F of the unturned manure heaps and Da, Fa of the turned manure heaps are concerned, the temperatures ranged from 55°C to 60°C and partially contributed to the inactivation of STEC in these sites. As the sites A, Aa, B and Ba where the temperatures are not high enough (<47°C) to explain the STEC inactivation, other factors such as high pH, antagonistic flora or low moisture content could lead to this reduction. Himathongkham and Riemann (1999) suggested that an increase of pH by gassing with ammonia or drying resulted in less than 2 log₁₀ reduction of *E. coli* O157:H7 after 24 h. Drying followed by gassing with ammonia resulted in a 4 log₁₀ CFU g⁻¹ reduction after the same time. Conversely, Jiang et al. (2003a) reported a large difference between the reduction of *E. coli* O157:H7 populations in cow manure placed in a bioreactor at 21°C and 50°C with reduction values of 0.5 log₁₀ CFU g⁻¹ after 1 week vs 4.5 log₁₀ CFU g⁻¹ after 24 h, respectively. This finding

is not in accordance with our results and could be explained by the small size of the manure heap used in their experiment. Moreover, the heaps were not placed in an outside situation and thus not exposed to fluctuating environmental conditions. In winter, the temperature often reaches negative values and presumable survival would be far longer (Wang et al. 1996; Kudva et al. 1998). The antimicrobial efficacy of solar radiation (UV) on STEC cells and the rainfall events could not be neglected (Yaun et al. 2003, 2004). Finally, in the farm situation, fresh material was added to the manure over the time, leading to possible long-term survival of STEC.

During the curing phase, STEC counts slightly decreased for all manure heaps. In fact, it has been shown that treatment of manure by thermophilic digestion caused a rapid initial decline in the numbers of viable *E. coli*, but this decrease was followed by a period during which the residual population was maintained for an extended period (Kearney et al. 1993). The gradual stress conditions in some zones, particularly near the surface of manure heaps, could explain the survival of this STEC population linked to the expression of heat shock genes, thereby resulting in increased resistance of pathogens during composting (Jiang et al. 2003a).

Finally, the liquid manure that lately appeared on the soil (ninth day) had a similar STEC concentration to that of the manure heap at the same time. As a result, it might be a good indicator to assess the STEC contamination of the manure heaps.

In conclusion, our study demonstrated a long-term survival of non-O157:H7 STEC strains in cow manure. The manure spreading on culture crops may represent a way for pathogens to travel further up the human food chain if the composting process was unadapted. European Union rules (CE no. 1774/2002) recommend minimum 1 h of composting at least to 70°C. These rules were more adapted to indoor process (bioreactor, wastes transformation factory, etc.), where the external temperature can be monitored. This temperature is not reached for all locations of the manure heaps in farm situation. Consequently, STEC strains would be able to survive during long periods.

In order to minimize the risk of environmental contamination by STEC, during the storage and following the amendment of manure to land, good management practices should be followed. According to Fenlon et al. (2000) results, the manure should be stored on a cement floor for a sufficient period (minimum 2 months with turning) and preferentially in a large heap form allowing a great temperature rise, and turned to sanitize the manure heap. All liquid manure should be collected in a specific trap. These farming practices minimize run-off and leaching of liquid manure into groundwater. A no-grazing

or cutting period for grass following manure application was also recommended. Finally, farm manures should not be applied to fruit or vegetable crops that will be eaten raw.

Acknowledgements

This work was supported by funds from the French Food Safety Agency (AFSSA). We acknowledge the technical assistance provided by Mr A. Vimont, Mrs A. Beddiaf, Mr E. Silbermann, Mr A. Reano and Mrs C. Mazuy-Cruchaudet. We thank Mr Richard Sullivan for his coaching in English.

References

- Barker, J., Humphrey, T.J. and Brown, M.W. (1999) Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol Lett* **173**, 291–295.
- Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S., Aleksic, S., Gillespie, H.A. and Whittam, T.S. (1997) Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2175–2180.
- Cieslak, P.R., Barrett, T.J., Griffin, P.M., Gensheimer, K.F., Beckett, G., Buffington, J. and Smith, M.G. (1993) *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. *Lancet* **342**, 367.
- Cray, W.C., Thomas, L.A., Schneider, R.A. and Moon, H.W. (1996) Virulence attributes of *Escherichia coli* isolated from dairy heifer feces. *Vet Microbiol* **53**, 369–374.
- Delazari, I., Iaria, S.T., Riemann, H., Cliver, D.O. and Jothikumar, N. (1998) Removal of *Escherichia coli* O157:H7 from surface tissues of beef carcasses inoculated with wet and dry manure. *J Food Prot* **61**, 1265–1268.
- Ehrmann, M.A., Scheyhing, C.H. and Vogel, R.F. (2001) In vitro stability and expression of green fluorescent protein under high pressure conditions. *Lett Appl Microbiol* **32**, 230–234.
- Fenlon, D.R., Ogden, I.D., Vinten, A. and Svoboda, I. (2000) The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* **29**, 149S–156S.
- Fratamico, P.M., Deng, M.Y., Strobaugh, T.P. and Palumbo, S.A. (1997) Construction and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains expressing firefly luciferase and green fluorescent protein and their use in survival studies. *J Food Prot* **60**, 1167–1173.
- Fremaux, B., Raynaud, S., Beutin, L. and Vernozy-Rozand, C. (2006) Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Vet Microbiol* (in press).
- Fukushima, H. and Seki, R. (2004) High numbers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* found in bovine faeces collected at slaughter in Japan. *FEMS Microbiol Lett* **238**, 189–197.
- Fukushima, H., Hoshina, K. and Gomyoda, M. (1999) Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* **65**, 5177–5181.
- Geeraerd, A.H., Herremans, C.H. and Van Impe, J.F. (2000) Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *Int J Food Microbiol* **59**, 185–209.
- Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P. and Van Impe, J.F. (2005) GInaFit, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *Int J Food Microbiol* **102**, 95–105.
- Haines, J.R., Wrenn, B.A., Holder, E.L., Strohmeier, K.L., Herrington, R.T. and Venosa, A.D. (1996) Measurement of hydrocarbon degrading microbial populations by a 96 well most probable number procedure. *J Ind Microbiol* **16**, 3641.
- Himathongkham, S. and Riemann, H. (1999) Destruction of *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in chicken manure by drying and/or gassing with ammonia. *FEMS Microbiol Lett* **171**, 179–182.
- Himathongkham, S., Bahari, S., Riemann, H. and Cliver, D. (1999) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in cow manure and cow manure slurry. *FEMS Microbiol Lett* **178**, 251–257.
- Hugues, B. and Plantat, J.L. (1983) Calculation of the most probable number and its confidence limit when the number of inoculum per dilution is considerable. *Chemosphere* **11**, 1135–1140.
- Ihaka, R. and Gentleman, R. (1996) R: a language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Stat* **5**, 299–314.
- Jiang, X., Morgan, J. and Doyle, M.P. (2003a) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during composting of bovine manure in a laboratory-scale bioreactor. *J Food Prot* **66**, 25–30.
- Jiang, X., Morgan, J. and Doyle, M.P. (2003b) Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in cow manure compost. *J Food Prot* **66**, 1771–1777.
- Kearney, T.E., Larkin, M.J. and Levett, P.N. (1993) The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria. *J Appl Bacteriol* **74**, 86–93.
- Kuczynska, E. and Shelton, D.R. (1999) Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2820–2826.
- Kudva, I.T., Blanch, K. and Hovde, C.J. (1998) Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3166–3174.
- Lung, A.J., Lin, C.M., Kim, J.M., Marshall, M.R., Nordstedt, R., Thompson, N.P. and Wei, C.I. (2001) Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in cow manure composting. *J Food Prot* **64**, 1309–1314.
- Moreira, C.N., Pereira, M.A., Brod, C.S., Rodrigues, D.P., Carvalhal, J.B. and Aleixo, J.A. (2003) Shiga toxin-

- producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Vet Microbiol* **93**, 179–183.
- Nicholson, F.A., Groves, S.J. and Chambers, B.J. (2005) Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresour Technol* **96**, 135–143.
- Nielsen, E.M., Skov, M.N., Madsen, J.J., Lodal, J., Jespersen, J.B. and Baggesen, D.L. (2004) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to farms. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6944–6947.
- Pell, A.N. (1997) Manure and microbes: public and animal health problem? *J Dairy Sci* **80**, 2673–2681.
- Pradel, N., De Champs, C., Palcoux, J.B., Sirot, J., Forestier, C., Joly, B., Scheutz, F. and Livrelli, V. (2000) Verotoxin-producing *Escherichia coli* infections: study of its prevalence in children in the Auvergne region. *Arch Pediatr* **3**(Suppl 7), 544s–550s.
- Read, S.C., Clarke, R.C., Martin, A., De Grandis, S.A., Hii, J., McEwen, S. and Gyles, C.L. (1992) Polymerase chain reaction for detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources. *Mol Cell Probes* **6**, 153–161.
- Rynk, R. (1992) *On-Farm Composting Handbook*. Northeast Regional Agricultural and Engineering Service (NRAES), Cooperative Extension, Ithaca, NY Pub. No. **54**, 51–83.
- Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., Lequerrec, F., Serillon, E., Tilly, B., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Bouvet, J. et al. (2002) Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. *J Appl Microbiol* **93**, 473–478.
- Vialette, M., Jandos-Rudnik, A.M., Guyard, C., Legeay, O., Pinon, A. and Lange, M. (2004) Validating the use of green fluorescent-marked *Escherichia coli* O157:H7 for assessing the organism behaviour in foods. *J Appl Microbiol* **96**, 1097–1104.
- Wang, G., Zhao, T. and Doyle, M.P. (1996) Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2567–2570.
- Wrenn, B.A. and Venosa, A.D. (1996) Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Can J Microbiol* **42**, 252–258.
- Yaun, B.R., Sumner, S.S., Eifert, J.D. and Marcy, J.E. (2003) Response of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 to UV energy. *J Food Prot* **66**, 1071–1073.
- Yaun, B.R., Sumner, S.S., Eifert, J.D. and Marcy, J.E. (2004) Inhibition of pathogens on fresh produce by ultraviolet energy. *Int J Food Microbiol* **90**, 1–8.

ORIGINAL ARTICLE

Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in cow slurryB. Fremaux¹, C. Prigent-Combaret², M.L. Delignette-Muller¹, M. Dothal¹ and C. Vernozy-Rozand¹¹ Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle – Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon 69280, Marcy l'Étoile, France² Université de Lyon, Lyon, F-69003, France; Université Lyon 1, Lyon, F-69003, France; CNRS, UMR 5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, F-69622, France; IRR 41, Villeurbanne, F-69622, France**Keywords**cow, *Escherichia coli*, O26, Shiga toxin, slurry.**Correspondence**

B. Fremaux, Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle-Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon 69280, Marcy l'Étoile, France. E-mail: b.fremaux@vet-lyon.fr

2006/1640: received 24 November 2006, revised 12 February 2007 and accepted 13 February 2007

doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02146.x

Abstract**Aims:** The main objective of this study was to evaluate the growth and survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26 in cow slurry; this serogroup is regarded as an important cause of STEC-associated diseases.**Methods and Results:** Four STEC were examined by polymerase chain reaction (PCR) to determine whether they harbour key virulence determinants and also by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) to obtain overview fingerprints of their genomes. They were transformed with the pGFPuv plasmid and were separately inoculated at a level of 10^6 CFU ml⁻¹ in 15 l of cow slurry. All STEC O26 strains could be detected for at least 3 months in cow slurry without any genetic changes. The moisture content of the slurry decreased over time to reach a final value of 75% while the pH increased from 8.5 to 9.5 units during the last 50 days.**Conclusion:** STEC O26 strains were able to survive in cow slurry for an extended period.**Significance and Impact of the Study:** Long-term storage of waste slurry should be required to reduce the pathogen load and to limit environmental contamination by STEC O26.**Introduction**

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are emerging food-borne pathogens. Although *E. coli* O157:H7 is currently the most frequently isolated serotype from human patients, other STEC serogroups are frequently isolated in Europe (Caprioli *et al.* 1997) and North America (Brooks *et al.* 2005). Among them, serogroup O26 is regarded as an important cause of STEC-associated diseases (Tarr and Neill 1996). An outbreak linked to the consumption of Camembert-type cheeses contaminated by O26 EHEC was recently reported in France. Six children of less than 2 years of age developed a hemolytic-uremic syndrome (HUS) (Espie *et al.* 2006).

Cattle are an important STEC reservoir and so undercooked beef, dairy products or vegetables contaminated by the faeces of infected cattle are frequent sources of human STEC infection. The O26 serogroup was fre-

quently found in cattle with prevalence rates of 5.1% in Japan (Fukushima and Seki 2004) or 1.7% in Australia (Cobbold and Desmarchelier 2000). In France, a recent study showed that 15% (2/13) of the dairy farms tested were positive for STEC O26 (Fremaux *et al.* 2006). The surprising long-term survival of STEC O26 in cow faeces which can reach 18 weeks at 15°C has important health implications as they may be spread to crops during direct application of farm effluents to land (Fukushima *et al.* 1999). Slurry is a common effluent generated by many farms and comprises a mixture of urine, faeces, water, spilt feed and bedding. A previous study highlighted that 10% of slurry samples from French dairy cattle were contaminated by STEC, but none of them harboured the O26 serogroup (Vernozy-Rozand *et al.* 2002). Using bovine slurry, Kudva *et al.* (1998) showed that *E. coli* O157:H7 viable cells fell from approximately 10^7 CFU ml⁻¹ to undetectable levels within 5 days at

23°C whereas McGee *et al.* (2001) showed that *E. coli* O157:H7 could survive at least 12 weeks in cattle slurry. These studies were limited to the O157:H7 serotype and were generally performed on very small slurry samples. Therefore, the fate of non-O157 STEC and especially STEC O26 in cow slurry still remains unknown.

In the present work, the objective was thus to study the survival and growth of four STEC O26 strains isolated from faeces of different dairy cattle. STEC O26 strains were transformed with the green fluorescent protein plasmid vector (pGFPuv) and each was inoculated into two large buckets of fresh cow slurry. Samples were taken at regular time intervals from each bucket in order to determine pH, moisture content and to numerate transformed STEC O26 bacteria by direct plating.

Materials and methods

GFP-labelling of the STEC O26 strains

STEC O26 strains

Four STEC O26 strains (A, B, C and D), all from faeces of different dairy farms, were isolated between January 2003 and August 2004 during the course of a previous study (Fremaux *et al.* 2006). All these strains were examined for the presence of the ST genes *stx1* and *stx2* under the conditions described by Cebula *et al.* (1995), as well as the virulence genes *eae* coding intimin and *ehx* coding enterohemolysin, as described by China *et al.* (1996), and Paton and Paton (1998), respectively. The amplification reactions were processed in the polymerase chain reaction (PCR) T3 thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany).

Transformation of the STEC O26 strains

The four STEC O26 strains were electroporated in the presence of a plasmid vector pGFPuv (3 ng μL^{-1}) (Ozyme, Montigny-Le Bretonneux, France) carrying ampicillin resistance gene and the GFP open reading frame, according to the protocol described by Fremaux *et al.* (2007). Electroporations were performed with a Gene Pulser II apparatus (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) at 2.5 kV, 25 μF and 200 ω , and with an electrical pulse of 4.7 ms.

The resulting ampicillin-resistant transformants showed bright green fluorescent colour when viewed under ultraviolet (UV) light at 365 nm (Herolab, Wiesloch, Germany). The stability of the plasmid inside the four GFP-labelled

STEC O26 strains was checked using the protocol used by Fremaux *et al.* (2007).

Each GFP-labelled STEC O26 strain was subject to molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using the method previously described by Fremaux *et al.* (2006).

Preparation, inoculation and sampling of the slurry

Preparation of the slurry buckets

Fresh cow slurry (approximately 130 l) was collected from one dairy farm in Rhône-Alpes region, in early spring 2006. The chemical characteristics of the slurry were shown in Table 1. They were close to chemical properties reported for bovine slurry in France. Slurry analyses were performed by CESAR (Centre Scientifique Agricole Régional, Ceyzeriat, France) using standard methods. The slurry was distributed into eight buckets of 15 l. The buckets were kept indoors in a separate room (P2 safety) from January to April 2006. The room temperature ranged from 15 to 20°C for the duration of the study.

Three slurry samples were collected from each bucket to check whether slurry was free of STEC. The enrichment step and the DNA preparation were performed as described previously (Fremaux *et al.* 2007). A 100-fold dilution of the DNA extract was subjected to the PCR-*stx* using degenerate primers ES149 and ES151 as described by Read *et al.* (1992).

STEC O26 suspension and inoculation of the slurry

Each GFP-labelled STEC O26 strain was cultivated with slow agitation (80 rev min^{-1}) in 1 l of Luria-Bertani (LB) broth (Sambrook *et al.* 1989) plus ampicillin (LB-A) (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) at 37°C for 24 h (total bacterial culture, 4 l). All the cultures reached a final concentration of $c. 5 \cdot 10^8$ CFU mL^{-1} . The bacteria were sedimented by centrifugation at 5000 g for 20 min, and the cell pellet was resuspended in 200 ml of phosphate buffer saline (PBS) and centrifuged. This operation was repeated and finally the cell pellets of the four STEC strains were separately resuspended in 180 ml of sterile water supplemented with 20 ml of PBS. Each cell suspension (200 ml) was used to inoculate two buckets (100 ml per bucket) filled with slurry to yield a final concentration between 10^6 and 10^7 CFU mL^{-1} . Then the slurry was carefully mixed to allow the uniformity of the inoculation.

	Total nitrogen (g kg^{-1})	Total carbon (g kg^{-1})	Carbon/ nitrogen	Total phosphorus (g kg^{-1})	Ammonia (g kg^{-1})	Nitrate (g kg^{-1})
Slurry waste	4.26	35.38	8.3	2.29	1.4	0.01

Table 1 Chemical characteristics of the slurry waste used in the present study

Sampling of slurry

Just before the sampling, the slurry in each bucket was carefully mixed to evenly disperse the inoculum throughout the waste. Slurry samples were taken at regular time intervals, transported to the laboratory and tested within 3 h to determine their microbiological and physicochemical status.

Analysis

Enumeration of STEC O26 cells by direct plating assay

Each slurry sample (25 ml) was added to 225 ml of buffered peptone water (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) complemented with ampicillin ($150 \mu\text{g ml}^{-1}$) in a sterile bagfilter (Interscience, Saint Nom La Breteche, France) and stomached for 30 s at medium speed. Aliquots from appropriate serial dilutions were spread onto selective LB-A plates, which were incubated at 37°C for 24 h. The GFP-labelled STEC O26 colonies were counted under the UV light. An anti-O26 agglutinating serum was randomly used to confirm that fluorescent colonies screened on agar plates under UV light belonged to O26 serogroup.

Enrichment of the samples was undertaken when the first decimally diluted suspensions (bagfilter) did not contain STEC colonies (less than 10 STEC per ml). To enrich these potentially mildly contaminated samples, the bagfilter was incubated at 37°C for 24 h. One millilitre of the enriched suspension was plated on LB-A. The plates were incubated for 24 h at 37°C and placed under UV light to confirm the presence or absence of STEC O26 strains in the sample.

Physicochemical assays

Physicochemical parameters were measured for each bucket at regular time intervals. Total moisture content was determined by drying 5 ml of slurry at 105°C for 24 h and weighing the residue. The pH of slurry sample was measured after adding 5 ml of slurry to 200 ml of distilled water. The suspension was then stirred for 5 min and was allowed to settle for 5 min. The pH of the slurry was measured with a pH meter 330 (WTW, Champagne au Mont d'Or, France).

Statistical analysis

STEC counts obtained respectively from the two slurry buckets inoculated with the same strain were put together and the log-linear model with tailing [eqn (1)] (Geeraerd et al. 2000) was used to fit them:

$$N = (N_0 - N_{\text{res}}) \exp(-k_{\text{max}}t) + N_{\text{res}} \quad (1)$$

where N represents the STEC density (CFU ml^{-1}) observed at time t (days), N_0 is the initial STEC density

(CFU ml^{-1}), N_{res} is the residual STEC density (CFU ml^{-1}) and k_{max} is the specific inactivation rate (day^{-1}) equal to $\ln(10)/D$ -value.

Furthermore, a classical linear model [eqn (2)] was used to fit the moisture content data observed for each slurry bucket:

$$X = X_0 - kt \quad (2)$$

where X is the moisture content (ml ml^{-1}) observed at time t (days), X_0 is the moisture content (ml ml^{-1}) at the start of the study and k is the specific drying rate (day^{-1}).

Models (1) and (2) were fitted using respectively the *nls* and *lm* functions of the R software version 2.0.1 (Ihaka and Gentleman 1996).

Results

Characterization of the GFP-labelled STEC O26 strains

Stability of the plasmid vector pGFPuv in STEC O26 cells under nonselective conditions

The four GFP-labelled STEC O26 strains were inoculated into small batches of slurry (50 ml) and enumerated up to the sixteenth day. At the seventh and the sixteenth days, the level of all GFP-labelled STEC strains was around 10^4 and 10^3 CFU ml^{-1} , respectively. These results obtained by direct plating assay were consistent with those obtained using MPN-PCR *stx* method (Fremaux et al. 2007).

Molecular analysis

PCR analysis of virulence profiles indicated that all four STEC O26 strains harboured the intimin gene *eae*, the enterohemolysin gene *ehx* and the shiga toxin gene *stx1*.

PFGE of *XbaI*-digested genomic DNA gave 20 to 25 fragments (ranging from less than 50 to 700 kb) for each of the four GFP-labelled STEC O26 strains. All PFGE profiles showed more than three band differences. No genetic change was observed for any of the STEC O26 strains tested for the duration of the study (88 days).

STEC O26 counts in cow slurry

The STEC inoculum levels ranged from 5.45 to 6.81 $\log_{10} \text{ CFU ml}^{-1}$. Observed kinetics of STEC counts were correctly fitted by the log-linear model with tailing (Fig. 1), which permits an estimation of the specific inactivation rates (k_{max}) and of the D -value ($\ln(10)/k_{\text{max}}$).

The specific inactivation rates observed for all STEC O26 strains were similar. The estimated D -values with their confidence intervals were 10.19 [9.37–11.16], 11.75

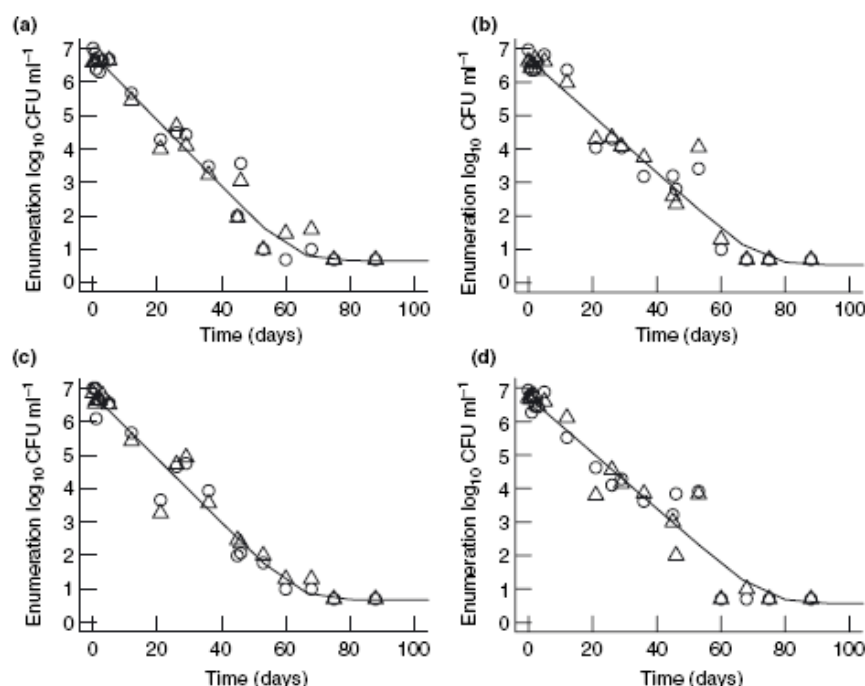


Figure 1 Survival of the four Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26 strains (A, B, C and D) in slurry. The STEC counts (O and Δ) were obtained from the two slurry buckets inoculated with the same strain.

[10·65–13·15], 10·49 [9·55–11·63] and 12·01 [10·6–13·81] days for the strains A, B, C and D, respectively. Within all the slurry buckets, the STEC counts decreased during the first 68 days and low STEC populations, only detected after an enrichment step, were recovered for at least 88 days postinoculation.

Determination of pH and moisture content

The pH data are expressed as mean values obtained from all slurry buckets. As shown in Fig. 2a, the pH remained steady (around 8·5) during the first 50 days. Thereafter, it markedly increased to finally reach a mean value of 9·5 at the 113th day.

Estimated values of the specific drying rates k in each slurry bucket were graphically reported with their respective 95% confidence intervals (Fig. 2b). For all slurry buckets, a similar specific drying rate was obtained during the course of the present study. On average, the moisture content decreased over time from 89·8 % at the beginning to 75% at the end of the study.

Discussion

Organic wastes and especially slurry provide a vehicle by which zoonotic agents may enter and become dissemin-

ated throughout the agricultural environment, thus posing a potential health risk. Many studies have described the survival of *E. coli* O157:H7 in slurry but none of them reported the behaviour of STEC of serogroup O26, regarded as an important cause of STEC-associated diseases (Tarr and Neill 1996). Consequently, the main objective of the present study was to evaluate the survival of STEC O26 in a suitable quantity of slurry stored into buckets. In compliance with European rules concerning the use of STEC O26 and genetically modified organisms, the slurry buckets were placed in P2 safety rooms. Consequently, this system can be defined as a model of farm slurry store, which slightly differed from the real farm situation.

Except O157:H7, STEC strains do not have common biochemical characteristics allowing the use of specific media for their isolation. Thus, STEC O26 strains were transformed with a pGFP plasmid to facilitate their isolation. As checked under different stress conditions in previous studies (Ehrmann *et al.* 2001; Vialette *et al.* 2004; Fremaux *et al.* 2007), the stability of plasmid-borne GFP-labelling was confirmed for all STEC O26 strains used in this study. Furthermore, similar to Vialette *et al.* (2004) and Ehrmann *et al.* (2001), no significant difference of behaviour was observed between the transformed STEC O26 strains and the parental strains after their inoculation into small batches of slurry (data not shown).

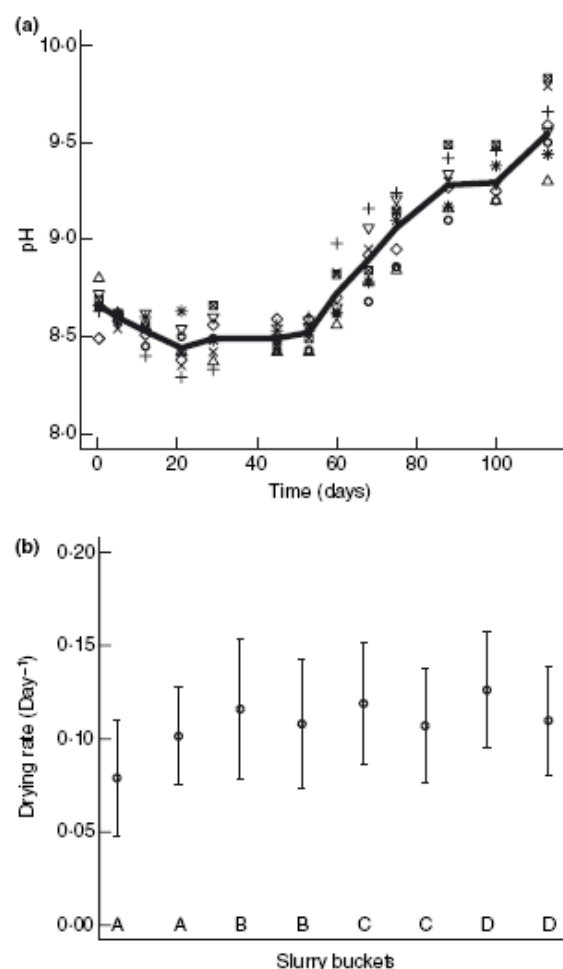


Figure 2 (a) pH values obtained from each slurry bucket (O, Δ, ∇, ◇, *, +, ×, ⊗) during the course of the present study. The thick line fitted the mean value obtained from all slurry buckets at each sampling time. (b) Specific drying rates with 95% confidence interval estimated for the two slurry buckets inoculated with the same Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strain (A, B, C and D).

The most important finding of our study is that all GFP-labelled STEC O26 strains, inoculated at $6.5 \log_{10} \text{ ml}^{-1}$ into cow slurry, were detected for 3 months, without any genetic change. This is consistent with a previous work which reported that *E. coli* O157:H7 was able to persist for more than 2 months in different slurry wastes (Avery *et al.* 2005). Similar results were obtained by McGee *et al.* (2001), who showed that *E. coli* O157:H7 could survive for more than 12 weeks in cow slurry obtained from cattle fed with different diets. In contrast, Kudva *et al.* (1998) did not detect *E. coli* O157:H7 5 days

after inoculation in slurry incubated at 23°C. But these experiments were performed with small quantity of slurry.

Slurry was rich in nutrients which may sustain bacterial growth (C/N ratio of 8.39) (Table 1). It has been suggested that a higher level of organic matter may lead to a better adherence of pathogens and therefore, to a higher survival (Kearney *et al.* 1993). In the farm situation, fresh nutrients were regularly added to slurry pit, leading to possible long-term survival of STEC O26. Furthermore, the existence of inaccessible niches to the sampling and the possibility of the unicellular protozoa feeding on the bacteria (Kuczyńska and Shelton 1999) could also influence the distribution and the removal of the pathogen. Indeed, a previous study demonstrated that *E. coli* O157:H7 may still be able to survive for an extended period after being consumed by the protozoa (Barker *et al.* 1999).

On the other hand, a number of factors such as storage temperature, high pH values or antagonistic flora could lead to the reduction of the pathogen load. In our study, the pH increased during the last 50 days to reach a final value of 9.5, mainly because of the release of ammoniacal nitrogen. Nauta and Dufrenne (1998) have estimated that the maximum pH value enabling the growth was around 9.4 for the 75 *E. coli* O157:H7 strains tested. It is clearly established that *E. coli* O157 can be effectively eradicated by raising the pH of organic wastes. Bujoczek *et al.* (2001) reported that increasing pH to 12 for at least 2 h by the addition of lime resulted in significant pathogen reduction. In the present work, the slurry was stirred before sampling in order to evenly distribute bacteria. Introduction of air into the material could tend to speed up the decline of zoonotic agents. Moreover, it may have increased the drying of the slurry. On average, the moisture content decreased over time from 89.8 % to 75% regardless of slurry buckets. The high dry matter content observed at the end of the study, which is not usual on farms, could be explained by the destruction of the crust on top of the slurry at each sampling. This may have affected negatively the behaviour of O26 strains in the slurry and lead to an underestimate of the survival occurring naturally in a farm environment. However, in the present work, the slurry was not placed outside and thus not exposed to solar radiation (UV) and rainfall events and to other fluctuating environmental conditions which may affect STEC survival negatively (Yaun *et al.* 2003, 2004).

This study emphasized the survival of STEC O26 for an extended period of time in cattle slurry. The long-term storage (minimum 3 months) of organic wastes led to a significant and gradual decline in STEC O26 cells number. Consequently, as suggested by Avery *et al.* (2005),

storage might be a useful mean to reduce the STEC load of slurry wastes before land application.

Acknowledgements

This work was supported by funds from the French Food Safety Agency (AFSSA). The authors acknowledge the technical assistance provided by Mrs A. Beddiaf and Mr B. Mallen.

References

- Avery, L.M., Killham, K. and Jones, D.L. (2005) Survival of *E. coli* O157:H7 in organic wastes destined for land application. *J Appl Microbiol* **98**, 814–822.
- Barker, J., Humphrey, T.J. and Brown, M.W. (1999) Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol Lett* **173**, 291–295.
- Brooks, J.T., Sowers, E.G., Wells, J.G., Greene, K.D., Griffin, P.M., Hoekstra, R.M. and Strockbine, N.A. (2005) Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. *J Infect Dis* **192**, 1422–1429.
- Bujoczek, G., Reiners, R.S. and Olaszkiewicz, J.A. (2001) Abiotic factors affecting inactivation of pathogens in sludge. *Water Sci Technol* **44**, 79–84.
- Caprioli, A., Tozzi, A.E. and Karch, H. (1997) Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. *Emerg Infect Dis* **4**, 578–579.
- Cebula, T.A., Payne, W.L. and 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. *J Clin Microbiol* **33**, 248–250.
- China, B., Pirson, V. and Mainil, J. (1996) Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex *in vitro* amplification of virulence-associated genes. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3462–3465.
- Cobbold, R. and Desmarchelier, P. (2000) A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. *Vet Microbiol* **71**, 125–137.
- Ehrmann, M.A., Scheyhing, C.H. and Vogel, R.F. (2001) *In vitro* stability and expression of green fluorescent protein under high pressure conditions. *Lett Appl Microbiol* **32**, 230–234.
- Espié, E., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Pihier, N., Vailant, V., Francart, S., De Valk, H. and Vernozy-Rozand, C. (2006) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurized cows cheese, France, 2005. VTEC 2006, Melbourne (AUS), poster.
- Fremaux, B., Raynaud, S., Beutin, L. and Vernozy-Rozand, C. (2006) Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Vet microbiol* **117**, 180–191.
- Fremaux, B., Daignette-Muller, M.L., Prigent-Combaret, C., Gleizal, A. and Vernozy-Rozand, C. (2007) Growth and survival of non-O157:H7 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. *J Appl Microbiol* **102**, 89–99.
- Fukushima, H. and Seki, R. (2004) High numbers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* found in bovine faeces collected at slaughter in Japan. *FEMS Microbiol Lett* **238**, 189–197.
- Fukushima, H., Hoshina, K. and Gomyoda, M. (1999) Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* **65**, 5177–5181.
- Geeraerd, A.H., Herremans, C.H. and Van Impe, J.F. (2000) Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *Int J Food Microbiol* **59**, 185–209.
- Ihaka, R. and Gentleman, R. (1996) R: a language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Statist* **5**, 299–314.
- Kearney, T.E., Larkin, M.J. and Levett, P.N. (1993) The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria. *J Appl Bacteriol* **74**, 86–93.
- Kuczynska, E. and Shelton, D.R. (1999) Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2820–2826.
- Kudva, I.T., Blanch, K. and Hovde, C.J. (1998) Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3166–3174.
- McGee, P., Bolton, D.J., Sheridan, J.J., Earley, B. and Leonard, N. (2001) The survival of *Escherichia coli* O157:H7 in slurry from cattle fed different diets. *Lett Appl Microbiol* **32**, 152–155.
- Nauta, M.J. and Dufréne, J. (1998) Variability in growth characteristics of different *E. coli* O157:H7 isolates, and its implications for predictive microbiology. *Quant Microbiol* **1**, 137–155.
- Paton, A.W. and Paton, J.C. (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*. *J Clin Microbiol* **36**, 598–602.
- Read, S.C., Clarke, R.C., Martin, A., De Grandis, S.A., Hii, J., McEwen, S. and Gyles, C.L. (1992) Polymerase chain reaction for detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources. *Mol Cell Probes* **6**, 153–161.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tarr, P.I. and Neill, M.A. (1996) Perspective: the problem of non-O157:H7 shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **174**, 1136–1139.

- Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., Lequerrec, F., Serillon, E., Tilly, B., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Bouvet, J., et al. (2002) Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. *J Appl Microbiol* **93**, 473–478.
- Vialette, M., Jandos-Rudnik, A.M., Guyard, C., Legeay, O., Pinon, A. and Lange, M. (2004) Validating the use of green fluorescent-marked *Escherichia coli* O157:H7 for assessing the organism behaviour in foods. *J Appl Microbiol* **96**, 1097–1104.
- Yaun, B.R., Sumner, S.S., Eifert, J.D. and Marcy, J.E. (2003) Response of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 to UV energy. *J Food Prot* **66**, 1071–1073.
- Yaun, B.R., Sumner, S.S., Eifert, J.D. and Marcy, J.E. (2004) Inhibition of pathogens on fresh produce by ultraviolet energy. *Int J Food Microbiol* **90**, 1–8.

**TROISIÈME PARTIE : SURVIE DES STEC O26 DANS
DIFFÉRENTS TYPES DE SOLS FERTILISÉS AVEC DU
FUMIER BOVIN EN CONDITIONS *IN VITRO***

Publication N°4

**Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in
various manure-amended soil types**

B. Fremaux, C. Prigent-Combaret, M.L. Delignette-Muller, B. Mallen, M.
Dothal, A. Gleizal et C. Vernozzy-Rozand

Publié dans *Journal of Applied Microbiology (in press)*

Présentation de la Publication n°4

1. Contexte et objectifs de cette étude

Le fait d'épandre des effluents sur les sols est souvent à l'origine de contaminations biologiques diffuses. La persistance d'*E. coli* O157:H7 dans les sols a souvent été démontrée. Une récente étude a montré qu'*E. coli* O157:H7 est capable de survivre pendant plus de 7 mois dans du sol traité avec du fumier (Islam *et al.*, 2004b). La survie des bactéries allochtones dans le sol est affectée par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques. Certaines études ont décrit l'impact de la température, des paramètres physico-chimiques (pH, taux d'humidité ou taux de matière organique) et de la texture du sol sur la survie d'*E. coli* O157:H7. Cependant, aucune n'a évalué leur influence sur la survie des STEC de sérotype O26:H11 (sérotipe récemment impliqué dans des épidémies) dans du sol fertilisé avec du fumier bovin. Ainsi, le principal objectif de cette étude était d'évaluer la survie de 4 souches STEC O26 (pGFP_{uv}) dans 3 types de sols différents, fertilisés avec du fumier bovin (ratio 1/20), et placés à 2 températures d'incubations i.e. 4°C et 20°C.

2. Matériels et méthodes

Au préalable, trois types de sols ont été collectés durant le printemps 2006, sur 3 sites différents localisés en région Rhône-Alpes. Les sols notés A et C sont des sols limoneux qui ont été collectés aux alentours de Thonon-Les-Bains (Haute-Savoie). Le sol B est quant à lui un sol limoneux-argileux qui a été collecté à La Côte St André (Isère). Le fumier a été prélevé dans une exploitation laitière courant Mars 2006. Les analyses des caractéristiques physico-chimiques du fumier ainsi que l'analyse de la texture et de la structure des sols ont été réalisées par le centre d'analyse CESAR (centre scientifique agricole régional, Rhône-Alpes).

Les mêmes souches STEC O26:H11 (pGFP_{uv}) présentées dans l'étude sur le lisier ont été utilisées ici. La stabilité du plasmide dans ces souches a également été vérifiée en microcosmes de sol amendé par du fumier. Par la suite, chacune des 4 souches STEC O26 (pGFP_{uv}) a été inoculée séparément dans du fumier bovin à un taux de 10^8 UFC g⁻¹. Afin de simuler grossièrement l'étape de labour après épandage, 200 g de fumier contaminé ont été mélangés à 4 kg de chaque type de sol, lesquels ont été incubés à deux températures différentes à savoir 4 et 20°C. Deux répétitions par traitement ont été effectuées amenant le nombre de systèmes réalisés à 48 (4 souches × 3 types de sols × 2 températures × 2

répétitions). Des prélèvements ont été effectués à intervalles de temps réguliers pendant 1 an, afin de dénombrer les STEC O26 et certains paramètres physico-chimiques tels que le pH et le taux d'humidité des sols ont été mesurés.

Pour chaque condition, les effectifs en STEC obtenus à partir des 2 seaux de sol inoculés avec la même souche STEC O26 ont été compilés et le modèle de régression non linéaire (cf équation 1 p. 117) a été utilisé afin d'ajuster correctement les données. Une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée afin d'analyser l'impact de la température (4 ou 20°C) et du type de sol (A, B et C) sur le taux d'inactivation (k_{max}) spécifique de chaque souche STEC O26.

3. Résultats et discussion

L'analyse de variance n'a pas montré d'effet souche significatif sur le taux d'inactivation spécifique k_{max} . Les STEC O26 ont été détectés dans chaque sol pendant au moins 196 jours (voire plus d'un an dans deux des sols testés), indépendamment de la température d'incubation. Bien que les durées de survie des STEC O26 sont certainement surestimées par rapport à celles observées *in situ* (absence d'influence des aléas climatiques), il n'en demeure pas moins qu'ils survivent remarquablement bien dans les sols. D'une façon comparable, des travaux antérieurs ont montré qu'*E. coli* O157:H7 peut encore être détecté dans des sols limoneux et argileux, 25 semaines après son inoculation dans ces sols (Fenlon *et al.*, 2000). Afin de déterminer l'impact de la température sur la survie des STEC O26, les sols ont été séparément incubés à 4°C et 20°C, deux températures des cycles diurnes au cours de la période d'épandage (Printemps). Ainsi, une température de 20°C (versus 4°C) est associée à une inhibition significativement plus importante ($P < 0,001$) des STEC dans l'ensemble des sols testés (Figure 22). Le ralentissement des activités compétitives et antagonistes de la flore indigène des sols incubés à 4°C est probablement la cause d'une survie prolongée des STEC à cette température.

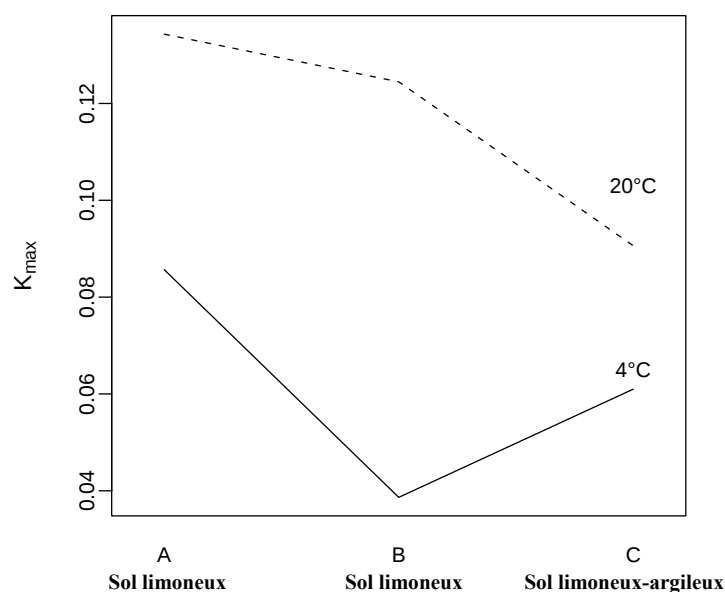


Figure 22 : Graphique des valeurs moyennes du taux d'inactivation spécifique k_{max} obtenues pour les 4 souches STEC O26 inoculées dans les 3 types de sols (A, B et C) et incubés aux 2 températures (4 et 20°C).

Par ailleurs, l'analyse de variance a montré un effet significatif du type de sol ($P < 0,01$) sur la survie des STEC O26, le sol A étant associé à une inhibition plus marquée de la bactérie que les sols B et C, quelque soit la température d'incubation testée (Figure 22). Bien que le sol A présente un taux de matière organique plus faible que les deux autres sols, son pH basique (autour de 9 unités) est probablement plus à même d'expliquer l'important déclin des STEC O26 dans ce sol. D'autre part, le taux élevé d'argiles dans le sol C pourrait expliquer la survie accrue des STEC O26 lorsque ce sol est conditionné à 20°C, l'argile permettant entre autres de protéger les bactéries contre les prédateurs ou les parasites (Acton et Gregorich, 1995).

Enfin, les STEC O26 sont capables de persister à des taux d'humidité dans le sol parfois critiques ($< 0,08 \text{ g ml}^{-1}$) comme l'ont précédemment démontré Jiang *et al.* (2002) pour *E. coli* O157:H7. En fin d'étude et à 4°C, les sols A, B et C présentent respectivement des taux d'humidité de 16%, 8% et 6%. Le fait qu'une inhibition marquée des STEC a été observée dans le sol A placé à 4°C, et ce malgré un taux d'humidité pourtant élevé, montre que ce facteur n'a pas eu d'influence significative sur la survie des STEC O26 dans les sols testés.

4. Conclusion

En conditions *in vitro*, les STEC O26 sont capables de survivre pendant de longues périodes dans du sol amendé avec du fumier et incubé à 4 ou 20°C. Même si les valeurs des temps de survie sont probablement surestimées du fait des conditions expérimentales employées, cela n'enlève rien à la persistance inquiétante de cet agent zoonotique dans cet écosystème. Des facteurs importants contribuant à la persistance des STEC O26 dans le sol ont été identifiés. Ainsi une température d'incubation basse (4°C), la présence d'argile et probablement un taux élevé de matière organique pourraient favoriser la survie des STEC O26 dans les sols, alors qu'un pH relativement élevé semble accélérer le déclin de la bactérie.

ORIGINAL ARTICLE

Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in various manure-amended soil typesB. Fremaux¹, C. Prigent-Combaret², M.L. Delignette-Muller¹, B. Mallen¹, M. Dothal¹, A. Gleizal¹ and C. Vernozy-Rozand¹¹ Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Université de Lyon – Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon 69280, Marcy l'étoile, France² Université de Lyon, Lyon; Université Lyon 1, Lyon; CNRS, UMR 5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne; and IFR 41, Villeurbanne, France**Keywords***Escherichia coli*, O26, Shiga toxin, soil, survival**Correspondence**

Bastien Fremaux, Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle – Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon 69280, Marcy l'étoile, France. E-mail: b.fremaux@vet-lyon.fr

2007/0624: received 19 April 2007, revised and accepted 22 June 2007

doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03532.x

Abstract**Aims:** To evaluate the behaviour of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26 strains inoculated in manure-amended soils under *in vitro* conditions.**Methods and Results:** Four green fluorescent protein (GFP)-labelled STEC O26 strains were inoculated in duplicate (at 10^6 CFU g⁻¹) in three different manure-amended soil types, including two loam soils (A and B) and one clay loam soil (C), and two incubation temperatures (4 and 20°C) were tested. STEC counts and soil physical parameters were periodically monitored. STEC O26 cells were able to persist during extended periods in soil even in the presence of low moisture levels, i.e. less than 0.08 g H₂O g⁻¹ dry soil. At 4 and 20°C, STEC could be detected in soil A for 288 and 196 days, respectively, and in soils B and C for at least 365 days postinoculation at both temperatures. The ambient temperature (i.e. 20°C) was significantly associated with the highest STEC count decline in all soils tested.**Conclusions:** The temperature and soil properties appear to be contributory factors affecting the long-term survival of STEC O26 in manure-amended soils. **Significance and Impact of the Study:** This study provides useful information regarding the ecology of STEC O26 in manure-amended soils and may have implications for land and waste management.**Introduction**

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains are one of the most important emerged groups of food-borne pathogens. STEC strains can cause a broad spectrum of human illness ranging from uncomplicated diarrhoea to haemorrhagic colitis (HC) and haemolytic-uraemic syndrome (HUS) (Riley *et al.* 1983; O'Brien and Kaper 1998). Although *E. coli* O157:H7 is currently the most frequently isolated serotype from human patients, other STEC-serogroups were often isolated in Europe (Caprioli *et al.* 1997) and North America (Brooks *et al.* 2005). Among them, serogroup O26 is regarded as an important cause of STEC-associated diseases (Tarr and Neill 1996). In Germany, a cluster of HUS cases caused by STEC O26:H11 was detected, but the source of the STEC infec-

tion was unknown (Misselwitz *et al.* 2003). Furthermore, an outbreak linked to the consumption of Camembert-type cheeses contaminated by O26 EHEC was recently reported in France. Six children of less than 2 years old developed an HUS (Espie *et al.* 2006).

STEC strains with O26-serogroup were frequently found in cattle with prevalence rates of 5.1% in Japan (Fukushima and Seki 2004) or 1.7% in Australia (Cobbold and Desmarchelier 2000). In France, a recent study showed that 15% (2/13) of the dairy farms tested were positive for STEC O26 (Fremaux *et al.* 2006). The long-term survival of STEC O26 in cow faeces (up to 18 weeks at 15°C) has important health implications as they might be spread to crops during direct application of farm effluents to land (Fukushima *et al.* 1999). Nowadays, land application is becoming a routine procedure for the

disposal of animal wastes of faecal origin. The potential transfer of zoonotic agents to food through the application of animal excreta as soil fertilizers in agriculture has been extensively reviewed (Cieslak et al. 1993; Pell 1997).

A recent study showed that *E. coli* O157:H7 is able to persist for extended time in soil treated with contaminated manure (more than 7 months) (Islam et al. 2004). Both biotic and abiotic parameters could affect the persistence of faecal bacteria including *E. coli* in soil (Chandler and Craven 1980; Recorbet et al. 1992; Kerry 2000). Many studies described the impact of temperatures, physico-chemical (pH, moisture and organic matter content) and texture soil properties (clays content) on the survival of *E. coli* O157:H7 in soil. Jiang et al. (2002) and Mukherjee et al. (2006) showed that the *E. coli* O157:H7 decline in manure-amended soil stored at 4°C was faster than that of soil stored at ambient temperature. Moreover, Fenlon et al. (2000) showed that *E. coli* O157:H7 viable cells fell from approx. 10^5 CFU ml⁻¹ to undetectable levels within 8 weeks in a sandy soil compared with 25 weeks in a clay soil. However, these studies were limited to the O157:H7 serotype and little information is available regarding the fate of STEC O26 in manure-amended soils.

Therefore, the objective of the present study was to investigate the fate of four STEC O26 strains in manure-amended soils, and to evaluate whether the type of soils (that differed according to their pH, texture or organic matter content) and the incubation temperature (4 and 20°C) are contributory factors affecting the behaviour of STEC O26 in soils.

Material and methods

Characterization of the GFP-labelled STEC O26 strains

Four STEC strains belonging to serotype O26:H11 (S1, S2, S3 and S4) were isolated from faeces of different French dairy farms between January 2003 and August 2004 during the course of a previous study (Fremaux et al. 2006). The four strains were electroporated in the presence of a plasmid vector pGFPuv (Ozyme, Montigny-Le-Bretonneux, France), using a Gene Pulser II apparatus

(Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) at 2.5 kV, 25 µF and 200 Ω, and with an electrical pulse of 4.7 ms (Fremaux et al. 2007b). Virulence profiles of the four strains were also characterized by PCR (Fremaux et al. 2007b). All the four STEC O26 strains harboured the intimin gene *eae*, the enterohaemolysin gene *ehx* and the Shiga toxin gene *stx1*. Furthermore, genome fingerprints of each strain were characterized at the beginning and the end of the study by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) as previously described by Fremaux et al. (2006).

Physical and chemical characterizations of soil and organic waste samples

Soil samples (A, B and C) were collected, in early spring 2006, from the upper layer (0–20 cm) of three sites under permanent pasture and located in the Rhône-Alpes region, France. Soils A and C were brunisols sampled near Thonon-les-Bains and soil B, a luvisol sampled at La Côte St André (LCSAp) (Ranjard et al. 1997). Soil A and B correspond to loam soils and contain, respectively, 45 and 38.2% sand, 39 and 45.1% silt, and 15.9 and 16.6% clay. Soil C corresponds to clay loam soil and contains 21.7% sand, 38.9% silt and 39.3% clay. Fresh cow manure was collected in a farm near Lyon in March 2006. Analyses of the physical and chemical characteristics of soils and fresh cow manure were all performed by CESAR (Centre Scientifique Agricole Régional, Ceyzeriat, France) using standard methods, and data were presented in Table 1. PCR on *stx* genes were performed in order to check whether soils and fresh cow manure were STEC-free. The enrichment step and the DNA preparation were performed as described previously (Fremaux et al. 2006). PCR-*stx* was performed on 100-fold diluted DNA extracts using degenerate primers ES149 and ES151 as described by Read et al. (1992).

Preparation, inoculation and sampling of manure-amended soils

Preparation of bacterial inocula

Each green fluorescent protein (GFP)-labelled STEC O26 strain was grown overnight at 37°C on Luria Bertani

Table 1 Chemical characteristics of the diverse soils and manure waste used in the present study

Material	pH	Total limestone (g kg ⁻¹)	Total N (g kg ⁻¹)	Total C (g kg ⁻¹)	C/N	Organic matter (g kg ⁻¹)	CEC	Total P (g kg ⁻¹)	NH ₄ (g kg ⁻¹)
Loam soil (A)	8.19	173	1	8.8	9	15.1	69	0.07	–
Loam soil (B)	5.87	0	2.9	28.7	9	49.4	100	0.64	–
Clay-loam soil (C)	7.58	37	5.7	47.3	8	81.3	228	0.05	–
Manure waste	9.05	–	3.19	51.13	16.04	–	–	0.96	0.34

CEC, cationic exchange capacity.

plates (Sambrook *et al.* 1989) containing ampicillin ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$) (LB-A). Then, each strain was cultivated in 1 l of LB broth supplemented with ampicillin ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$) at 37°C for 24 h. All the cultures reached a final concentration of approx. 10^9 CFU ml^{-1} . The bacteria were sedimented by centrifugation at 5000 g for 20 min, and cell pellets were resuspended in 200 ml of phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged. This operation was repeated and afterwards the cell pellets were resuspended in 180 ml of sterile water supplemented with 20 ml of PBS.

Preparation and inoculation of the manure-amended soils

Soil moistures were adjusted to two-thirds of their water-holding capacity at the beginning of the study (i.e. 81.1% for the soil A, 72.7% for the soil B and 72.8% for the soil C). Each soil was inoculated in duplicate by mixing manure with each STEC O26 strain (S1, S2, S3 and S4). Amended soils were incubated at two different temperatures, i.e. 4 and 20°C . Therefore, 48 buckets of inoculated manure-amended soils were prepared. For that purpose, 4 kg of each soil were introduced into each of 16 large sterile buckets and inoculated with 200 g of manure containing 10^8 CFU g^{-1} of each GFP-labelled STEC O26 strain. Then, the inoculated manure was mixed manually for 5 min with soil in order to disperse the inoculum associated with manure particles through the soil. The final concentration of STEC O26 was around 10^6 CFU g^{-1} of manure-amended soil at the beginning of the study. The manure-amended soils were kept at 4 and 20°C into level 2 safety rooms.

Sampling of the manure-amended soils

Five soil samples were collected from each soil bucket using a 50 ml sterile Falcon tube, and mixed in a sterile BagFilter plastic bag (Interscience, Saint Nom La Breteche, France). Twenty-five grams was then used for enumeration of STEC O26. Manure-amended soils were taken at regular time intervals, transported to the laboratory and, within the same day, assayed to determine their microbiological and physicochemical status.

Analysis

Enumeration of STEC O26 cells by direct plating assay

Each manure-amended soil sample (25 g) was added to 225 ml of buffered peptone water (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) supplemented with ampicillin ($150 \mu\text{g ml}^{-1}$) in a sterile BagFilter and stomached for 30 s at medium speed. Aliquots from appropriate serial dilution were spread onto selective LB-A plates, which were incubated at 37°C for 24 h. The GFP-labelled STEC O26 colonies were counted under the UV light. An anti-O26 agglutinating serum (Bio-Rad) was randomly used to

confirm that fluorescent colonies screened on agar plates under UV light belonged to O26-serogroup.

Enrichment of the samples was undertaken when the first decimally diluted suspensions (BagFilter) did not allow obtaining STEC colonies on LB-A plates ($<10 \text{ STEC ml}^{-1}$). To enrich these weakly contaminated samples, the BagFilter was incubated at 37°C for 24 h. One millilitre of the enriched suspension was plated on LB-A. The plates were incubated 24 h at 37°C and placed under UV light to confirm the presence or absence of STEC O26 strains in the sample tested.

Physicochemical assays

Physicochemical parameters were measured for soils from each bucket, at regular time intervals. Moisture content of manure-amended soil was determined by drying 5 g of soil at 105°C for 24 h and weighing the residual. The pH of manure-amended soil sample was measured after adding 5 g of soil to 200 ml of distilled water. The suspension was then stirred for 5 min and was allowed to settle for 5 min. The pH of the manure-amended soil was measured with a pH meter 330 (WTW, Champagne au Mont d'Or, France).

Statistical analysis

For each condition, STEC counts obtained, respectively, from the two manure-amended soil buckets inoculated with the same strain were compiled and the log-linear model with tailing (Geeraerd *et al.* 2000) was used to fit them:

$$N = (N_0 - N_{\text{res}}) \exp(-k_{\text{max}} t) + N_{\text{res}}$$

where N represents the STEC density (CFU g^{-1}) observed at time t (in days), N_0 is the initial STEC density (in CFU g^{-1}), N_{res} is the residual STEC density (in CFU g^{-1}), and k_{max} is the specific inactivation rate (in day^{-1}) equal to $\ln(10)/D$ -value. Model was fitted using, respectively, the nls function of the R software version 2.0.1 (Ihaka and Gentleman 1996).

An analysis of variance (ANOVA) was carried out in order to analyse the impact of the temperature (4 and 20°C) and the soil type (A, B and C) on the specific inactivation rate (k_{max}) of each STEC O26 strain. A mixed ANOVA model was considered, in which the temperature and the soil type were considered as fixed factors, and the strain was considered as a random factor.

Results

Genetic stability of the GFP-labelled STEC O26 strains

A first assay was performed to confirm the stability of the plasmid vector pGFPuv in nonselective conditions. The GFP-labelled STEC strains were inoculated into manure-

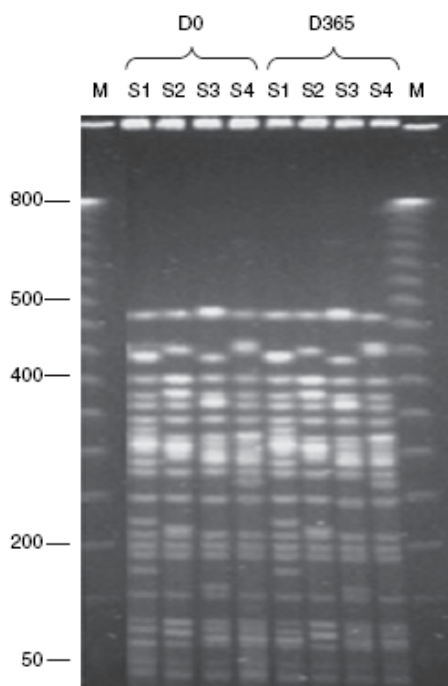


Figure 1 Pulsed-field gel electrophoresis of *XbaI*-digested genomic DNA obtained for each STEC O26 strain S1, S2, S3 and S4 recovered from the soil B held at 4°C, at the day 0 and at the end of the study (day 365). M are molecular weight markers (numbers on the left are the number of kilobase pairs).

amended soil microcosms (50 g) and enumerated up to the 16th day. At two time points (after 7 and 16 days), STEC counts obtained by direct plating assay were consistent with those obtained using a MPN-PCR *stx* method (described by Fremaux et al. 2007a).

Moreover, PFGE analyses performed at the beginning and the end of the study showed that no genetic change was observed for any of the STEC O26 strains tested for the duration of the study (see Fig. 1 for soil B held at 4°C as an example). PFGE of *XbaI*-digested genomic DNA gave 20–25 fragments (ranging from <50 to 500 kb) for each of the four GFP-labelled STEC O26 strains and all PFGE profiles showed at least three band differences.

Evolution of STEC O26 counts in manure-amended soils

The STEC inoculum levels ranged from 5.87 to 6.35 log₁₀ CFU g⁻¹. STEC counts in each manure-amended soil decreased over time. Observed kinetics of STEC counts were correctly fitted by the log-linear model with tailing (see Fig. 2 for S1 as an example), which

permits an estimation of the specific inactivation rate ($k_{\max}$) and of the *D*-value ($\ln(10)/k_{\max}$).

The ANOVA did not show any significant effect of the strain on $k_{\max}$. The four STEC O26 strains were able to survive during a long period of time in the diverse soils tested (Table 2). At 4°C, they were recovered for at least 288 days in the soil A and more than 365 days postinoculation for the soils B and C. At 20°C, the same survival data were obtained, except for the soil A in which the pathogen was detected up to 196 days. However, the analysis of variance showed a significant effect of the temperature on $k_{\max}$ ($P < 0.0001$). The STEC counts decrease was higher in the manure-amended soils held at 20°C than that obtained at 4°C (Figs 2 and 3). For example in soil B, the mean estimated *D*-values calculated for the four STEC strains were 18.5 days at 20°C vs 59.6 days at 4°C (Table 2). Furthermore, there was a significant effect of the soil type ($P < 0.01$) and a significant interaction between temperature and soil type ($P < 0.05$). The soil A was associated with a higher decline of STEC cells than the soils B and C at the two incubation temperatures (Fig. 3). At 20°C, STEC O26 counts decreased faster in soil C than in soil B, but an opposite finding was obtained at 4°C (Fig. 3).

Evolution of pH and dry matter

The pH and dry matter data are expressed as mean values obtained from all manure-amended soil buckets for each soil type and each incubation temperature. As shown in Fig. 4a, the dry matter percentage of all manure-amended soils gradually increased during the course of the present study. Soil drying was more pronounced at 20°C than at 4°C. On average, the dry matter increased over time from 81.1% (± 0.35), 72.7% (± 0.42) and 72.8% (± 0.26) at the beginning of the study to values $\geq 92\%$ at its end in soils A, B and C, respectively. This is true except for the soil A incubated at 4°C, which reached a dry matter of 84% (± 1.24), 365 days postinoculation.

No difference was observed between pH values reported for each soil type, according to the incubation temperature (Fig. 4b). Just after addition of manure, pH of all soils increased by approx. 0.7 pH units [i.e. 8.9 (± 0.02), 6.5 (± 0.02) and 8 (± 0.07) for the soils A, B and C, respectively]. Thereafter, it slightly increased during the 50 first days and markedly decreased to finally reach, at the 127th day, a mean value of 7.75 (± 0.03), 5.27 (± 0.05) and 6.44 (± 0.01) for the soils A, B and C stored at 20°C, respectively. Similar results were observed for the soils held at 4°C. Afterwards, the pH of each soil increased gradually and tended to reach, at the end of the study, a pH value close to the initial ones, because of soil buffering capacity.

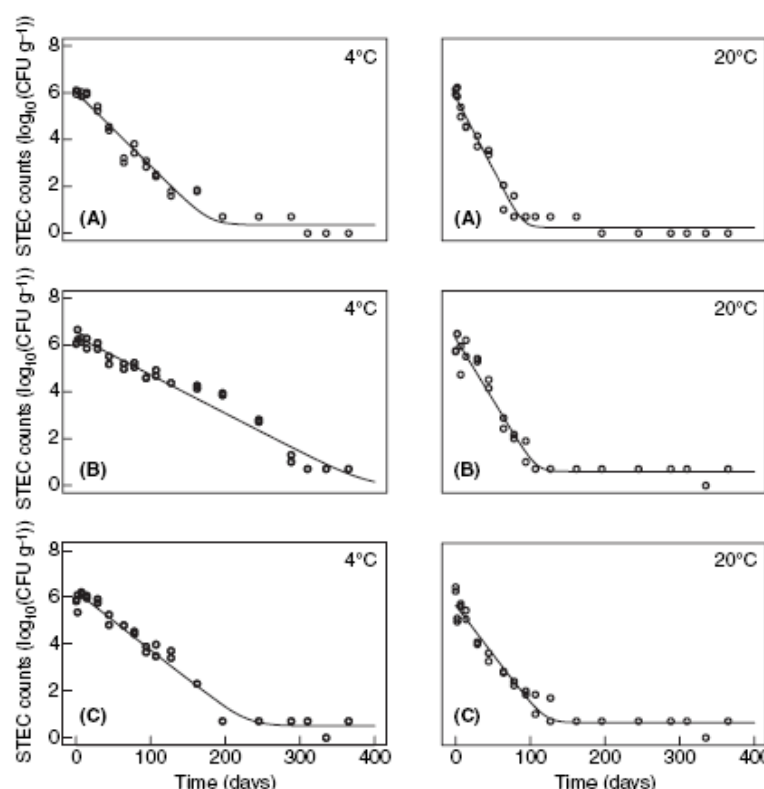


Figure 2 Survival of one STEC O26 strain (S1) in the diverse manure-amended soils (A, B and C) held at 4 and 20°C.

Soils	Storage temperature (°C)	Mean STEC count ($\log_{10}$ CFU ml ⁻¹) at day 0*	Mean STEC D-values*	Time of survival of STEC (days)
Loam soil (A)	20	6.15 (± 0.18)	17.1 (± 1.12)	196
Loam soil (B)	20	5.87 (± 0.24)	18.5 (± 1.10)	>365
Clay-loam soil (C)	20	6.35 (± 0.16)	25.4 (± 1.66)	>365
Loam soil (A)	4	6.13 (± 0.13)	26.9 (± 4.1)	288
Loam soil (B)	4	6.05 (± 0.16)	59.6 (± 1.28)	>365
Clay-loam soil (C)	4	6.18 (± 0.28)	37.8 (± 3.77)	>365

*Mean values ($\pm$ SD) were calculated from STEC counts obtained for the four STEC O26 strains.

Table 2 Survival of STEC O26 in the various manure-amended soils (A, B and C) stored at 4 and 20°C

Discussion

The potential presence of zoonotic agents such as STEC in soils fertilized with animal-derived organic wastes is of growing concern. Many studies described the persistence of *E. coli* O157:H7 for considerable periods in waste-amended soil, which may pose some risks of both human and animal contamination. In fact, soil and more generally the environment is one of the main pathways of STEC human infections, and a trend of environmental-outbreaks outnumbering burger-outbreaks is actually

observed (Strachan *et al.* 2006). Although much information is available concerning the survival of *E. coli* O157:H7 in soil, the emergency of new STEC-serogroups implicated in human infections highlights the need for soil-survival studies performed on non-O157 STEC, and especially on STEC from the emerging disease-associated O26-serogroup.

This work was thus performed in order to evaluate the behaviour of four STEC O26 strains in manure-amended soils. In compliance with European rules set for the utilization of STEC and genetically modified organisms, the

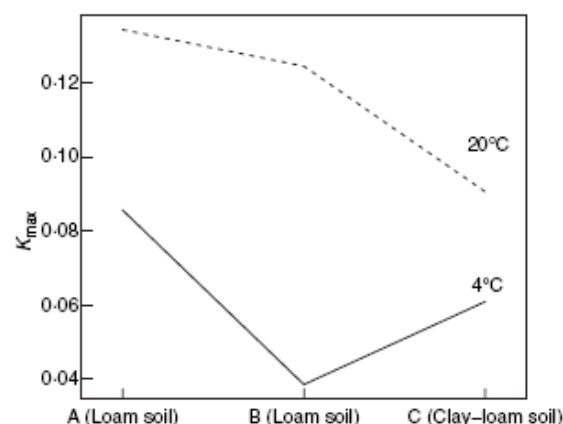


Figure 3 Interaction plot between the mean values of k_{max} obtained for the four STEC O26 strains at the two temperatures (4 and 20°C) in the three soil types (A, B and C).

inoculated manure-amended soils were stored in a containment level 2 laboratory environment. Under these conditions, STEC O26 strains were shown to be able to survive during an extended period in all manure-amended soils. They were still detectable in manure-amended soils at least 196 days, and up to 1 year postinoculation in the majority of manure-amended soils tested whatever the soil-incubation temperature. But the manure-amended soils were not exposed to solar radiation (UV), rainfall events (responsible of bacteria leaching) and to other fluctuating environmental conditions encountered in field situation which may affect negatively STEC survival (Yaun *et al.* 2003, 2004). Moreover, in our experiment, manure was immediately mixed with soil in order to obtain a similar bacterial inoculum for all the manure-amended soil buckets at the start of the study, i.e. 10^6 CFU g^{-1} soil. In a real field situation, manure was generally left on the soil surface for typically up to 1 week before its incorporation in soil (Smith *et al.* 2001), where the bacteria can be affected by various environmental stresses. Taken in combination, the observed long-term survivals of STEC O26 strains in soils might be an overestimation of that occurring naturally in a farm environment. Many studies have reported differences in *E. coli* O157:H7 soil-survival rates according to diverse experimental conditions. Jiang *et al.* (2002) showed that *E. coli* O157:H7 cells survived for up to 231 days in manure-amended soil held under laboratory conditions at 21°C. In comparison, Mukherjee *et al.* (2006) and Ogden *et al.* (2002) reported shorter survival periods of this pathogen, which was detected for 69 days in garden plots fertilized with cattle manure and 105 days on pasture contaminated by sheep faeces, respectively. In the latter study, the *E. coli*

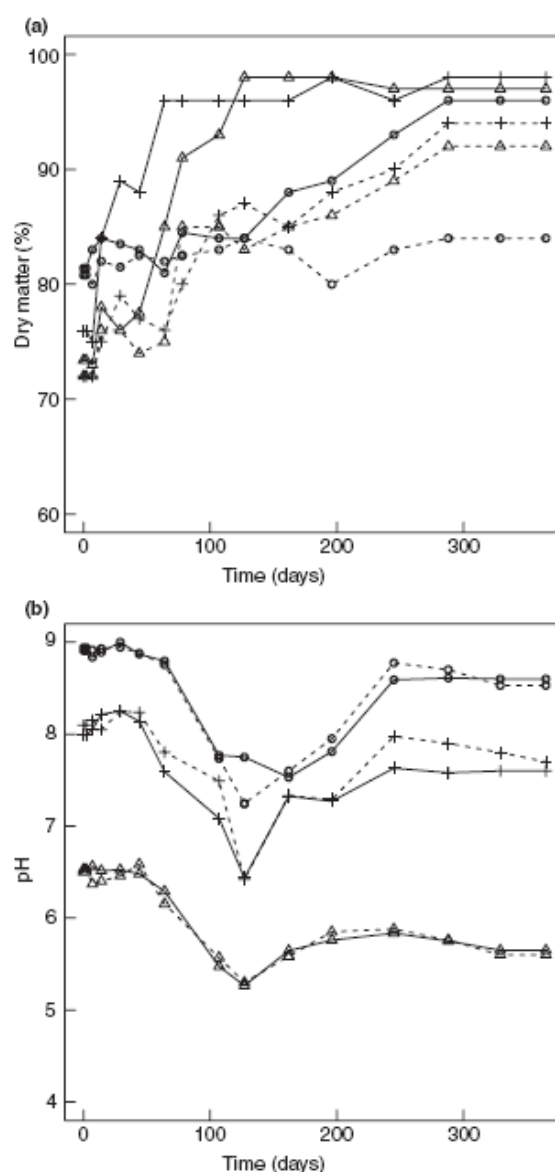


Figure 4 Dry matter content (a) and pH (b) of the various manure-amended soils (A, ○; B, △; C, +) held at the two incubation temperatures (— 20°C; --- 4°C).

O157:H7 soil-survival rate is likely underestimated as contaminated-sheep faeces were deposited within the fenced area 14 weeks before the sampling step began. Furthermore, Islam *et al.* (2004) showed that *E. coli* O157:H7 could survive for more than 7 months in plant-cultivated soils exposed to southern fall-winter conditions.

In order to determine the impact of temperatures on O26 soil-survival, the manure-amended soils were sepa-

ately held at constant temperatures of 4 and 20°C. These temperatures are comparable to temperatures recovered in spring, a main season for applying manure to fields in France. Although this model system bears little resemblance to a real world situation (where the temperature of soil cycles diurnally as well as seasonally), it allows us to show that STEC O26 cells were able to survive longer in all soils held at 4°C than those held at 20°C. It can be explained by a slowdown of competitive and antagonistic activities of indigenous bacteria. Some researchers had already described the positive effect of low temperatures on *E. coli* O157:H7 survival (Gagliardi and Karns 2002; Islam et al. 2004). However, these results differ with many recent studies. More precisely, Jiang et al. (2002) reported that *E. coli* O157:H7 strains inoculated in manure-amended soil were inactivated more rapidly at 5°C (i.e. 42 days) than at 21°C (193 days). Similarly, Mukherjee et al. (2006) showed that the *E. coli* O157:H7 counts decline was faster at 4°C than in ambient conditions (92 vs 10 days).

Physicochemical properties of soil are also important factors that could influence the STEC O26 soil-survival. It is clearly admitted that soil moisture favours the survival of bacteria. Berry and Miller (2005) showed that *E. coli* O157:H7 numbers either stay unchanged or increase at all but the lowest moisture levels examined, i.e. 0.11 g H₂O g⁻¹ dry feedlot surface material. In our study, no further water was introduced to the buckets of soil during the incubation in order to evaluate the persistence of STEC O26 at critical moisture content values (<10%). Results revealed that STEC O26 can survive for extended periods of time in manure-amended soil even under very dry conditions, i.e. more than 92% dry matter at the end of the study. This result was consistent with that obtained by Jiang et al. (2002). Moreover the high STEC decline noted in the soil A held at 4°C, which was associated with the lower dry matter, suggested that moisture content was not a main factor influencing STEC O26 survival in soil.

All manure-amended soils used in this study contained high carbon content that might sustain bacterial growth (Table 1). It has been suggested that a higher level of organic matter could lead to a better adherence of pathogens to soil micro-aggregates, and therefore, increase their survival (Kearney et al. 1993). In soil A, where the lowest organic matter content was observed (Table 1), a markedly STEC O26 inactivation rate was obtained. However, the high pH values (around 9 units) reported for this soil during the course of the present study might also explain this result. Nauta and Dufrenne (1998) have estimated that the maximal pH value enabling the growth of 75 *E. coli* O157:H7 strains was around 9.4. On the contrary, Jiang et al. (2002) showed that basic soil pH values (i.e. pH 8) favoured the survival of *E. coli* O157:H7. Finally,

soil texture can in part influence the behaviour of STEC O26 in soil. The soil C showed the highest clays content compared with soils A and B, and this might contribute to the greatest survival of STEC O26, at 20°C, in this soil. Clays favour the adsorption of bacteria to soil particles and create a barrier against microbial predators or parasites (Roper and Marshall 1978; Santamaria and Toranzos 2003).

In conclusion, a better understanding of the behaviour of STEC O26 in soil was obtained, and important factors that may contribute to the persistence of STEC O26 in soils were identified. Thus, low temperature, presence of clays and probably high organic matter content may favour the survival of STEC O26 in soils, whereas relative high pH seems to speed up the pathogen decline. Under laboratory conditions, STEC O26 survived during extended period of time in manure-amended soils at 4 and 20°C. Despite the probable overestimation of the survival times of STEC O26 strains in manure-amended soils compared with field conditions, this zoonotic agent may nevertheless be able to persist durably in this type of ecosystem. Considering this persistence, appropriate management of farm waste is indeed required to limit the spread of this pathogen to vegetable and crops.

Acknowledgements

This work was supported by funds from the French Food Safety Agency (AFSSA). We acknowledge the technical assistance provided by Mrs A. Beddiaf. We also thank L. Jocteur-Monrozier (UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne) and D. Trevisan (INRA, Thonon-les-Bains) for useful discussions.

References

- Berry, E.D. and Miller, D.N. (2005) Cattle feedlot soil moisture and manure content: II. Impact on *Escherichia coli* O157. *J Environ Qual* **34**, 656–663.
- Brooks, J.T., Sowers, E.G., Wells, J.G., Greene, K.D., Griffin, P.M., Hoekstra, R.M. and Strockbine, N.A. (2005) Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. *J Infect Dis* **192**, 1422–1429.
- Caprioli, A., Tozzi, A.E. and Karch, H. (1997) Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. *Emerg Infect Dis* **4**, 578–579.
- Chandler, D.S. and Craven, J.A. (1980) Relationship of soil moisture to survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in soils. *Aust J Agric Res* **31**, 547–555.
- Gieslak, P.R., Barrett, T.J., Griffin, P.M., Gensheimer, K.F., Beckett, G., Buffington, J. and Smith, M.G. (1993) *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. *Lancet* **342**, 367–372.

- Cobbold, R. and Desmarchelier, P. (2000) A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. *Vet Microbiol* 71, 125–137.
- Espie, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H. and Vernozy-Rozand, C. (2006) *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiol Infect* 134, 143–146.
- Fenlon, D.R., Ogden, I.D., Vinten, A. and Svoboda, I. (2000) The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 149S–156S.
- Fremaux, B., Raynaud, S., Beutin, L. and Vernozy-Rozand, C. (2006) Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Vet Microbiol* 117, 180–191.
- Fremaux, B., Delignette-Muller, M.L., Prigent-Combaret, C., Gleizal, A. and Vernozy-Rozand, C. (2007a) Growth and survival of non-O157:H7 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. *J Appl Microbiol* 102, 89–99.
- Fremaux, B., Prigent-Combaret, C., Delignette-Muller, M.L., Dothal, M. and Vernozy-Rozand, C. (2007b) Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in cow slurry. *Lett Appl Microbiol* 45, 55–61.
- Fukushima, H. and Seki, R. (2004) High numbers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* found in bovine faeces collected at slaughter in Japan. *FEMS Microbiol Lett* 238, 189–197.
- Fukushima, H., Hoshina, K. and Gomyoda, M. (1999) Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* 65, 5177–5181.
- Gagliardi, J.V. and Karns, J.S. (2002) Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on plant roots. *Environ Microbiol* 4, 89–96.
- Geeraerd, A.H., Herremans, C.H. and Van Impe, J.F. (2000) Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *Int J Food Microbiol* 59, 185–209.
- Ihaka, R. and Gentleman, R. (1996) R: a language for data analysis and graphics. *J Comp Graph Stat* 5, 299–314.
- Islam, M., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P. and Jiang, X. (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. *J Food Prot* 67, 1365–1370.
- Jiang, X., Morgan, J. and Doyle, M.P. (2002) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. *Appl Environ Microbiol* 68, 2605–2609.
- Kearney, T.E., Larkin, M.J. and Levett, P.N. (1993) The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria. *J Appl Bacteriol* 74, 86–93.
- Kerry, B.R. (2000) Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annu Rev Phytopathol* 38, 423–441.
- Misselwitz, J., Karch, H., Bielazewska, M., John, U., Ringelmann, F., Ronnefarth, G. and Patzer, L. (2003) Cluster of hemolytic-uremic syndrome caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11. *Pediatr Infect Dis J* 22, 349–354.
- Mukherjee, A., Cho, S., Scheftel, J., Jawahir, S., Smith, K. and Diez-Gonzalez, F. (2006) Soil survival of *Escherichia coli* O157:H7 acquired by a child from garden soil recently fertilized with cattle manure. *J Appl Microbiol* 101, 429–436.
- Nauta, M.J. and Dufrenne, J. (1998) Variability in growth characteristics of different *E. coli* O157:H7 isolates, and its implications for predictive microbiology. *Quant Microbiol* 1, 137–155.
- O'Brien, A.D. and Kaper, J.B., eds (1998) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday, today and tomorrow. In *Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing E. coli Strains* pp. 1–11. Washington, DC: American Society of Microbiology.
- Ogden, I.D., Hepburn, N.F., MacRae, M., Strachan, N.J., Fenlon, D.R., Rusbridge, S.M. and Pennington, T.H. (2002) Long-term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp. *Lett Appl Microbiol* 34, 100–104.
- Pell, A.N. (1997) Manure and microbes: public and animal health problem? *J Dairy Sci* 80, 2673–2681.
- Ranjard, L., Richaume, A., Jocteur Monrozier, L. and Nazaret, S. (1997) Response of soil bacteria to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS Microbiol Ecol* 24, 321–331.
- Read, S.C., Clarke, R.C., Martin, A., De Grandis, S.A., Hii, J., McEwen, S. and Gyles, C.L. (1992) Polymerase chain reaction for detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources. *Mol Cell Probes* 6, 153–161.
- Recorbet, G., Steinberg, C. and Faurie, G. (1992) Survival in soil of genetically engineered *Escherichia coli* as related to inoculum density, predation and competition. *FEMS Microbiol Ecol* 101, 251–260.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgeson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S. et al. (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 308, 681–685.
- Roper, M.M. and Marshall, K.C. (1978) Effects of a clay mineral on microbial predation and parasitism on *Escherichia coli*. *Microbiol Ecol* 4, 279–289.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. pp. 1.25–1.26. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santamaria, J. and Toranzos, G.A. (2003) Enteric pathogens and soil: a short review. *Int Microbiol* 6, 5–9.
- Smith, K.A., Brewer, A.J. and Dauven, A. (2001) A survey of the production and use of animal manures in England and Wales. *Soil Use Manag* 17, 48–56.

- Strachan, N.J., Dunn, G.M., Locking, M.E., Reid, T.M. and Ogden, I.D. (2006) *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *Int J Food Microbiol* **112**, 129–137.
- Tarr, P.I. and Neill, M.A. (1996) Perspective: the problem of non-O157:H7 Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **174**, 1136–1139.
- Yaun, B.R., Sumner, S.S., Eifert, J.D. and Marcy, J.E. (2003) Response of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 to UV energy. *J Food Prot* **66**, 1071–1073.
- Yaun, B.R., Sumner, S.S., Eifert, J.D. and Marcy, J.E. (2004) Inhibition of pathogens on fresh produce by ultraviolet energy. *Int J Food Microbiol* **90**, 1–8.

QUATRIÈME PARTIE : ÉCOLOGIE DES STEC DANS UN BASSIN VERSANT PÂTURÉ PAR DES RUMINANTS

Publication n°5

5

Survival and spread of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a high mountain pastured watershed

10 B. Fremaux, C. Prigent-Combaret, L. Beutin, A. Gleizal et C. Vernozzy-Rozand

Soumission prévue dans *Environmental Microbiology*

15

20

25

30

35

Présentation de la Publication n°5

1. Contexte et objectifs de cette étude

5 Les STEC sont principalement transmis à l'homme par ingestion d'aliments contaminés tels que la viande hachée de boeuf ou les produits laitiers à base de lait cru. Cependant, l'ingestion d'eau de boisson contaminée et de manière accidentelle d'eau de baignade ont été identifiées comme d'importantes sources d'infection chez l'homme. Une récente épidémie impliquant 18 cas d'infections à *E. coli* O157:H7 a été rapportée en Irlande ; l'enquête
10 épidémiologique a révélé que l'eau de boisson provenant d'un réservoir d'eau local aurait pu être à l'origine de la contamination (Mannix *et al.*, 2007).

La forte prévalence des STEC dans les troupeaux laitiers et leur capacité à persister dans l'environnement sont deux principaux facteurs qui contribuent à la contamination régulière des eaux de surface et/ou souterraines. A l'échelle d'un bassin versant, les taux de
15 microorganismes présents dans l'eau à l'exutoire sont principalement régulés par les conditions hydrologiques et édaphiques du bassin. La pollution des eaux résulte de différents types de rejets de contaminants dans le réseau hydrographique. Les uns s'effectuent principalement en période pluvieuse; ils sont dits « diffus » car il est bien difficile de définir avec précision leurs origines géographiques. Les autres sont rejetés indépendamment du
20 régime pluvial, lors par exemple d'excrétion de matière fécale directement dans les rivières du bassin ; ils sont dits « ponctuels ». Bien que quelques auteurs ont développé des modèles permettant de simuler le transport des bactéries fécales dans le sol et les eaux à l'échelle d'un bassin versant, aucune donnée expérimentale n'est actuellement disponible concernant les STEC. Ce travail avait donc pour objectif d'évaluer le transfert de STEC à partir de matières
25 fécales naturellement contaminées dans le sol sous-jacent, et ceci dans différentes stations d'un bassin versant d'altitude pâturé par des ruminants. La persistance des souches STEC a également été évaluée dans chacun de ces compartiments. Enfin, des prélèvements d'eau de rivière située à l'exutoire du bassin ont été réalisés afin de déterminer la contamination en STEC des eaux du bassin. Les souches STEC isolées ont ensuite été génétiquement et
30 phénotypiquement caractérisées.

2. Matériels et méthodes

L'étude s'est déroulée dans un bassin versant situé dans les Alpes du Nord et couvrant une surface d'environ 400 hectares. L'espace pastoral est valorisé par un seul et même troupeau de bovins laitiers. Quatre stations caractérisées par une couverture végétale spécifique (gazon ras (PG), nardaie (NG), rumex (RG) et marais (CG)) et des traits édaphiques particuliers ont été sélectionnées afin d'étudier la persistance et la dynamique de transfert des STEC dans le sol. En 2005, une cinquantaine de bouses ont été échantillonnées sur les parcelles RG et PG (zones de repos des bovins), et en 2006 seules 13 et 9 bouses ont pu être respectivement échantillonnées sur les parcelles CG et NG (zones de passage des bovins). Toutes ont été criblées par PCR pour les gènes *stx* sur bouillon d'enrichissement (eau peptonée). Parmi elles, 3 ont été sélectionnées dans chacune des zones explorées, excepté pour la zone du marais où seulement 1 bouse était positive pour les gènes *stx*. Afin d'évaluer les transferts éventuels (bouse/sol), des prélèvements de matière fécale et de sol situé sous la matière fécale, à une profondeur comprise entre 0 et 5 cm ainsi qu'entre 15 et 20 cm, ont été réalisés à des intervalles de temps réguliers. Des prélèvements de sol en aval des bouses (servant de témoins négatifs), à une profondeur d'environ 10 cm, ont également été effectués. Enfin, des échantillons d'eau ont été collectés dans la rivière située à l'exutoire du bassin versant, uniquement en 2006. Par ailleurs, un suivi de la température de l'air et de la pluviométrie a été réalisé par l'INRA de Thonon-les-bains de Juin à Octobre de chaque année.

L'évolution des effectifs en STEC dans les bouses, le sol et l'eau a été déterminée par MPN-PCR ciblant les gènes *stx*. En parallèle, les échantillons ont été enrichis dans de l'eau peptonée et incubés à 37°C pendant une nuit. Un premier criblage par PCR *stx* a été réalisé sur l'extrait d'ADN obtenu à partir des échantillons enrichis. Sur les échantillons *stx*⁺, la recherche d'isolats STEC a été réalisée.

Les isolats STEC ainsi obtenus ont été pulsotypés. L'analyse des profils PFGE a été réalisée à l'aide du logiciel GelCompar par la méthode UPGMA associée à un coefficient de Dice de tolérance $\leq 3\%$. Pour chaque clone identifié, la présence des gènes *stx1*, *stx2*, *eae* et *ehf-y* a été évaluée par PCR. Le typage de la sous-unité B de la Shiga-toxine de type 2 a ensuite été réalisé par PCR-RFLP au laboratoire national de référence des *E. coli* (Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Allemagne). D'autres caractères phénotypiques comme leur sérotype (également déterminé en Allemagne), leur capacité à former des biofilms (Ring test BioFilm) et leur motilité ont également été déterminés.

3. Résultats et discussion

3.1. Prévalence des gènes *stx* et dénombrement des STEC dans les bouses, le sol et l'eau

Parmi les 50 matières fécales échantillonnées en 2005 dans chacune des zones RG et PG, 16 et 12 matières fécales étaient respectivement *stx*⁺. En 2006, seules 4 des 13 matières fécales échantillonnées dans la zone NG et 1 des 9 matières fécales échantillonnées dans la zone CG, étaient *stx*⁺. Trois bouses contaminées en STEC ont ensuite été sélectionnées sur chaque parcelle, excepté pour la zone CG où seule 1 bouse contaminée par des STEC a pu être identifiée. Les gènes *stx* ont ensuite été détectés jusqu'à la complète dégradation des matières fécales (2-3 mois). Au début de l'étude, les effectifs en STEC dans les bouses étaient de l'ordre de 5 log UFC g⁻¹ excepté pour celle suivie dans la zone CG (< 4 log UFC g⁻¹). Ces taux n'ont que très légèrement diminué par la suite. Les échantillons de sols prélevés sous les bouses entre [0 et 5cm] et [15 et 20cm] de profondeur étaient également positifs pour les gènes *stx*, mais devenaient rapidement négatifs pour ceux-ci après la décomposition naturelle de la matière fécale (2-3 mois). En comparaison, les échantillons de sols témoins étaient toujours négatifs pour les gènes *stx*. L'énumération des STEC dans tous les échantillons de sols n'a pas été possible par MPN-PCR *stx*. Ceci est lié à une sensibilité trop faible de la méthode (200 UFC g⁻¹). De même, les eaux recueillies à l'exutoire du bassin étaient à chaque temps de prélèvement *stx*⁺, mais avec des effectifs en STEC toujours inférieurs à 200 UFC ml⁻¹.

3.2. Caractéristiques génotypiques et phénotypiques des isolats STEC

La majorité des échantillons *stx*⁺ ont permis l'isolement de souches STEC. Au total, 75 isolats ont pu être isolés à partir des échantillons collectés dans les différentes zones en 2005 (n=38) et 2006 (n=37). Seuls 3 isolats STEC ont été isolés dans l'eau. En effet, la forte dilution des populations de STEC dans l'eau mais aussi la détection probable de gènes *stx* portés par de l'ADN libre ou des bactériophages (largement répandus dans l'environnement) (Muniesa et Jofre, 1998) pourraient expliquer ce résultat. Le pulsotypage de ces 75 isolats a généré 8 profils différents (notés de C1 à C8), similaires entre eux à plus de 72%. Parmi eux, les types clonaux C3 et C5 ainsi que C6 et C7 sont quasiment identiques (similarité ≥ 95%). Les 8 clones identifiés à partir des profils PFGE appartiennent à 6 sérotypes différents, lesquels ont tous été précédemment décrits en élevages bovins. Tous les isolats STEC retrouvés durant cette étude sont *stx2*⁺, *stx1*⁻, *eae*⁻ et *ehf*-y⁻. L'absence du gène de virulence

eae n'indique pas forcément que ces souches ne sont pas pathogènes pour l'homme. En effet, des souches atypiques (absence du gène *eae* notamment) de séro groupe O91, O113 ou O174 ont déjà été impliquées dans des cas de SHU dans de nombreux pays (Paton *et al.*, 1999; Pradel *et al.*, 2001; Beutin *et al.*, 2004; Werber *et al.*, 2007). Par ailleurs, le typage de la sous-unité B de la Shiga-toxine de type 2 a révélé la présence des variants *stx2g* et *stx2-NV206* récemment identifiés par d'autres auteurs. Enfin, la plupart étaient mobiles et avaient la capacité à former des biofilms lors des essais effectués *in vitro*.

3.3. Persistance et transfert des STEC

Les résultats obtenus en PFGE ont montré que les STEC sont capables de survivre dans les déjections pendant au moins 2 mois, malgré des conditions climatiques contraignantes telles que des fortes précipitations ou des fluctuations marquées de la température de l'air du bassin. Dans certains cas, plusieurs clones STEC ont pu être isolés dans les déjections provenant d'un même animal. L'analyse phylogénétique a par ailleurs révélé la présence d'un clone persistant (> 12 mois) au sein du troupeau.

Les données obtenues en PFGE ont également permis de confirmer l'hypothèse du transfert de la bactérie de la matière fécale jusqu'à une profondeur d'au moins 20 cm dans le sol. Ce résultat a plus ou moins été rapporté lors d'une étude en laboratoire, où *E. coli* O157:H7 a été détecté dans le sol situé sous une bouse pendant 99 jours (Bolton *et al.*, 1999). Le transport des bactéries fécales dans le sol se fait d'une part, par les eaux de percolation et d'autre part, à travers les activités biologiques de la faune. Dans notre étude, de nombreux événements de pluies et une large variété de coprophages et de vers ont été observés (données non montrées). Par ailleurs, le transfert des bactéries fécales dépend fortement de la structure et de la texture du sol. Dans notre étude, aucune différence notable n'a été mise en évidence concernant les effectifs en STEC entre les différentes stations testées, probablement du fait de la faible sensibilité de la MPN-PCR *stx*.

Par ailleurs, l'assainissement rapide des sols en absence de matière fécale démontre qu'un faible nombre de cellules STEC semblent être régulièrement transférées dans le sol. Ces cellules peuvent être ensuite mobilisées par les eaux de percolation ou inhibées par des facteurs biotiques ou abiotiques de l'écosystème rencontré. Leur abilité à former des biofilms, pourrait favoriser leur attachement aux particules de sol ou de matière fécale permettant leur mobilisation par les eaux de percolation, notamment après de fortes pluies. Leur mobilité associée à la présence de flagelles pourrait quant à elle favoriser le transfert vertical des cellules dans les sols saturés en eau.

Malgré la forte prévalence des gènes *stx* dans les eaux à l'exutoire du bassin, aucune souche STEC similaire à celles retrouvées dans les déjections des animaux n'a pu être isolée dans l'eau. Le transfert des STEC des déjections et/ou des sols à l'eau n'a donc pas pu être clairement démontré, même si il est fortement probable. La forte dilution des populations bactériennes dans les eaux, l'entrée dans un état viable non cultivable et les phénomènes de mortalité pourraient expliquer ce résultat.

4. Conclusion

Cette étude apporte d'importantes informations concernant l'écologie et la diversité des STEC dans un bassin versant. Leur forte persistance dans les bouses contribue à leur dissémination dans les sols. Le fait qu'une faible population de STEC a été retrouvée dans la rhizosphère et dans les couches plus profondes de sols (localisées sous la bouse) constitue un réel risque pour l'homme si elles arrivent à atteindre les nappes phréatiques ou les eaux de baignade. Par ailleurs, il est probable que dans le sol rhizosphérique, les STEC soient confrontés à des interactions antagonistes avec des populations bactériennes productrices d'antibiotiques, ce qui pourrait expliquer en partie que les STEC ne soient plus détectés dans le sol en absence de matière fécale.

**Survival and spread of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in a high mountain
pastured watershed**

B. Fremaux ^{*1}, C. Prigent-Combaret², L. Beutin ³, A. Gleizal¹, D. Trevisan ⁴, P. Quetin ⁴,

5 L. Jocteur-Monrozier², C. Vernozzy-Rozand ¹

*(1) Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle - Ecole Nationale Vétérinaire de
Lyon, BP 83, 1, avenue Bourgelat, F -69280 Marcy l'Etoile, FRANCE*

*(2) Université de Lyon, Lyon, F-69003, France ; Université Lyon 1, Lyon, F-69003, France ;
CNRS, UMR 5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, F- 69622, France ; IRR 41,*

10 Villeurbanne, F-69622, France.

*(3) National Reference Laboratory for Escherichia coli (NRL-E.coli), Federal Institute for
Risk Assessment (BfR), Diedersdorfer Weg 1 D-12277 Berlin, Germany*

*(4) UMR Carrtel – INRA, Station d'hydrobiologie lacustre, BP 511, F - 74203 Thonon-Les-
Bains*

15 Running title: Ecology of STEC in a watershed

**Keywords: Shiga-toxin producing *Escherichia coli*, watershed, survival, spread, virulence,
biofilms.**

*** Corresponding author : Phone : +33 4 78 87 25 50 – Fax : +33 4 78 87 25 54**

E-mail : b.fremaux@vet-lyon.fr (B. FREMAUX)

**20 Correspondence address for proofs : Mr. FREMAUX (b.fremaux@vet-lyon.fr), Unité de
Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle - Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, BP 83, 1,
avenue Bourgelat, F -69280 Marcy l'Etoile, France.**

ABSTRACT

During the northern hemisphere summers 2005 and 2006 we attempted to describe the persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) strains and their transfer from naturally contaminated bovine feces to subsoil layers (0-5 and 15-20 cm) in different pasture units in a watershed of 400 ha. Contamination of river water at the outlet of the watershed was also investigated. Selected cow pads and subsoil layers were positive for the *stx* gene over a period of approximately 2 months until the fecal material had completely decayed, and this in all pasture units investigated. The Most Probable Number (MPN) PCR method indicated that STEC levels in the cow pads were around 10^{3-5} CFU g⁻¹ and slightly decreased during the course of the study. In soil, STEC cells numbers were always below 200 CFU g⁻¹. All the water samples collected from the river were *stx* positive but STEC could be isolated from only 3 water samples, for which STEC levels were also below 200 CFU ml⁻¹. A total of 75 STEC isolates were recovered from samples collected in the different watershed pasture units in 2005 (n=38) and 2006 (n=37). All carried the gene *stx2* but were negative for the other virulence genes *stx1*, *eae* and *e-hly*. Subtyping of the Shiga toxin type 2 revealed the presence of the recent *stx2g* and *stx2* NV206 variants. PFGE analysis confirmed the transmission of STEC strains from bovine fecal deposits to subsoil layers and their great persistence in this ecosystem (> 2 months). Clustering analyses indicated that the same STEC strain can proliferate over at least 12 months in a same dairy cattle.

INTRODUCTION

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains have emerged as an important public health problem. These bacteria can cause severe disease in humans, such as hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic-uremic syndrome (HUS) (24, 36), due to the production of phage-encoded cytotoxins called Shigatoxins (Stx1 and Stx2) and associated virulence factors such as intimin and enterohemolysin (26). STEC are common as colonizers in the intestine of healthy cattle and can be transmitted to humans through food, such as inadequately cooked ground beef or raw milk. Drinking or recreational water were identified as other important sources of infection. Indeed, an outbreak of *E. coli* O157:H7 associated with bathing at a public beach in the Montreal region was reported in 2001 (9). Another waterborne outbreak implicated 18 cases of *E. coli* O157:H7 infection had occurred in a small rural area located in midwest Ireland. Epidemiologic investigations incriminated drinking water from a local group water scheme as the vehicle of the pathogen transmission (20).

The high prevalence of STEC in dairy cattle and its ability to persist in environment are two main factors that contribute to continuous and long-term contamination of water. In France, Raynaud and colleagues (32) showed that 92% of the dairy farms tested, harbored at least one animal that carried the *stx* genes. An *in vitro* study illustrated that after application of fecal material previously inoculated with *E. coli* O157:H7, the bacteria was still detectable in the surrounding soil for up to 99 days (8). Both biotic and abiotic factors can affect the persistence of STEC in soil. In case of a watershed, the fate of microorganisms is primarily driven by the water flow of the watershed (25). Fecal pathogens may enter aquatic systems by direct deposition of feces in stream or may arise from non-point source pollution, such as overland runoff of fecal material deposited on soils, most frequently after heavy rainfall events (38). Although some authors have developed watershed-scale fate and transport models for *Escherichia coli* and for STEC O157:H7 (14, 25), not much is known on the behaviour of STEC in watershed. Until now no published data are available concerning the fate of STEC after their deposition in feces to soil.

First, this work aims to study the potential transfer and persistence of STEC strains from naturally contaminated bovine feces to subsoil layers in different pasture units of a watershed during the northern hemisphere summers of 2005 and 2006. These areas are characterized by their dominant plant and associated soil types. Second, in order to evaluate the contamination of streams by STEC, several water samples were also collected at the outlet of the watershed in 2006. STEC strains isolated from the watershed were then characterized

for their virulence profiles, serotypes and pulsotypes. Phenotypic characteristics i.e. ability to form biofilm and motility were also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Site descriptions. The study took place in a high mountain dairy pasture (French Alps, Haute-Savoie) covering a watershed of 400 ha located at an altitude ranging between 1500 to 2000 m. Relationships between soil and vegetation have been described by others (13). Four pasture units have been selected to study the survival and spread of fecal STEC bacteria in the watershed (Table 1). They differed according to the dominant plant of their vegetal cover, and to the associated soil type and edaphic characteristics. Nardus grassland (NG) is characterised by acidophilic vegetation, high organic carbon (OC) content in the first 3 centimeters of soil and a very low base saturation (i.e. *BS*) which indicates acid soil conditions. Poa alpina grassland (PG) is considered as a mesotrophic area with a high *BS*. The soil is characterized by a high stone content (20-30%) which favours a high permeability for water flow. Rumex grassland (RG) is a nitrophilic station with frequent inputs of exogenous organic matter from cow dejections. Caltha grassland (CG) is a typical hydrophilic unit with a very high organic carbon (OC) content. Its location on alluvial materials at the bottom of the watershed results in a permanent high water content of the CG soil.

Environmental temperatures and rainfall. Average soil temperature and precipitations were recorded daily by using a basic weather station working (Campbell Scientific, Loughborough, England) located near the outlet of the watershed.

Sampling design

Field cow pad sampling for *stx* gene detection. In 2005, 50 fresh (less than 12 hours) fecal samples were collected from cow pads on each of the PG and the RG units, and in 2006, 13 and 9 from the NG and the CG pasture unit, respectively. Fecal samples were screened for bacteria carrying the *stx* gene using the protocol described bellow. All cow pads sampled originated from the same dairy cattle which was present in the watershed pasture during the summers 2005 and 2006. Only few animals were replaced in the herd between 2005 and 2006.

Sampling for environmental dynamic and transfer of STEC populations. Three cow pads harboring *stx*⁺ *E. coli* populations were selected in each zone except for the CG pasture unit for which only one fecal deposit was *stx*⁺. A 40g sample was taken each from the

selected cow pads at regular time intervals during the summers 2005 and 2006. Besides, triplicate samples from within each stratum, i.e. 0-5 and 15-20 cm subsoil layers (under the cow pads), were collected at the same time and mixed together for microbiological analysis. In addition, downhill soil samples (at a depth around 10 cm and far away from the fecal pats sampled by approximately 3 meters) were also taken from each pasture unit as negative control. In 2005, samples were collected from the RG and PG pasture units over a period of 7 (from 06/21 to 08/12) and 10 weeks (from 07/19 to 09/26), respectively (Fig. 1A). In 2006, samples were taken over a period of 12 weeks (from 07/11 to 10/02) from the CG and NG pasture units (Fig. 1B), and at the same time intervals, water samples (3×50 ml at each sampling time) were collected in a stream, at the outlet of the watershed. In total, 110 and 70 watershed pasture samples were obtained in 2005 and 2006, respectively, and 21 river water samples were collected in 2006.

Microbiological analysis

Preparation of the samples. Upon arrival at the laboratory, all samples were analysed immediately. Twenty five grams of fecal or soil samples, and 50 ml of water samples were introduced in a sterile BagFilter plastic bag (Interscience, Saint Nom La Breteche, France) containing 225 and 200 ml of Buffered Peptone Water (BPW) (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), respectively, and mixed using a stomacher. An aliquot of the suspension was collected for numeration of the STEC cells using the Most Probable Number (MPN)-PCR *stx* method (15) with common *stx* primers ES149 and ES151 as previously described (33). The minimum sensitivity of the MPN procedure used is of 200 CFU g⁻¹ soil or ml⁻¹ water. The numeration of STEC cells was performed for fecal, soil and water samples collected in the watershed except for those that originated from the RG pasture unit. Thereafter, the BagFilter content was subjected to an enrichment step by incubating the BagFilter cells culture at 37°C for 24 h.

DNA extraction from enriched samples. For DNA preparation, 1 mL of the enrichment culture was centrifuged at 13,000 x g for 3 min. The pellet was washed three times with phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS) containing 4% Tween 20 followed by two washes with PBS only. After centrifugation, the pellet was resuspended in 400 µl of Instagene Matrix (BioRad laboratories, Hercules, California), and the mixture was incubated for 30 min at 56°C and for 15 min at 100°C. After incubation, the mixture was vortexed for 15 s and centrifuged at 11,000 g for 3min. The supernatant fluid was either used for *stx* PCR (33)

either directly or diluted in sterile water (1000-fold for fecal and 10-fold for soil samples), in order to avoid PCR inhibition due to the presence of PCR inhibitors in soils and cow pads.

Isolation of STEC. For samples that gave a positive *stx* PCR result, 100 µl of the enriched suspension was spread on Sorbitol Mac Conkey plates which were incubated at 37°C for 24 h. Approximately thirty colonies per plate were randomly subjected to PCR *stx* and colonies *stx*⁺ were inoculated into nutrient broth and incubated at 37°C for 24 h. Finally the STEC isolates were immediately stored at -80°C in BHI broth with 40% glycerol.

Genotypic and phenotypic characteristics of STEC isolates. First, all the isolates were biochemically identified as *E. coli* with the API 20E test (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and were further characterized by PCR for the presence of the Shigatoxin genes *stx1* and *stx2* as described by Cebula et al. (10), as well as for the intimin (*eae*) (35) and the enterohemolysin (*e-hly*) encoding genes (26). All STEC isolates were then subjected to molecular typing by Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using the method described previously by Fremaux and colleagues (16). For PFGE analysis, the collection was completed with several reference *E. coli* strains, i.e. the north American *E. coli* O157:H7 strain EDL 933 (ATCC 43895) and two other *E. coli* strains (the K12 derivatives MG1655 and MC4100 (Collection of the UMR CNRS 5557)). Cluster analysis of PFGE profiles was performed using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA; with an error setting of 3%) and Dice coefficient (with a maximum position tolerance of 3%), and was carried out using the software GelCompar II version 4.2 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Second, one isolate of each STEC clone (based on the PFGE profiles) was selected. For each one, subtypes of the B-subunit of *stx*₂ genes were determined by PCR, followed by analysis of restriction endonuclease-digested PCR products (restriction fragment length polymorphism [RFLP]) as previously described (18, 28). The Vero cell toxicity was also investigated (2, 5, 6).

In addition, the ability of 22 STEC strains (including various isolates of each clone randomly selected) to form biofilms was evaluated using the BioFilm Ring Test[®] (11). For each one, an initial bacterial suspension was prepared in Brain Heart Infusion (BHI) broth (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and mixed with toner (magnetic beads solution). Thereafter, they were loaded in triplicate inside the wells of 96-wells microplates, which were incubated at 37°C, and biofilm formation was checked after 2, 4, 5, and 6 h as recommended by the manufacturer. It gives a biofilm indice (BFI) which reflects the potential mobility of beads under the magnetic field applied using a 96 well magnet. Furthermore, to determine motility properties of these strains, bacteria were grown in BHI broth for 24 h at 37°C. Fresh

cultures were used to inoculate by stabbing with an inoculating wire the GI motility medium (Difco, France). Tubes were then incubated at 37°C for 48 h. Motility was evaluated by visualization of the diameter of growth around the stab.

Finally, serotyping of STEC clones was performed at the National Reference Laboratory for *E. coli* (NRL-*E. coli*) in Berlin, Germany, using antisera O1-O181 and H1-H56, as described by others (4).

RESULTS

Prevalence and numeration of STEC in bovine feces, soil and water. Among the 50 cow pads sampled in 2005 in the RG and PG pasture units, 16 and 12 were found to contain STEC populations, respectively. In 2006, 4 cow pads out of 13 in the NG pasture unit, and 1 cow pad out of 9 in the CG pasture unit were found to harbor STEC populations. Thereafter, three cow pads contaminated with STEC populations were selected in each zone of the watershed except for the CG pasture unit for which only one fecal deposit containing STEC cells was recovered. STEC strains could be isolated in these 10 selected cow pads over a period of approximately 2 months until the fecal material had completely decayed (Fig. 1). At the beginning of the sampling, number of STEC in bovine feces reached approximately 5 log CFU g⁻¹ except for that from the CG pasture unit (< 4 log CFU g⁻¹) (Fig. 2). STEC cells number slightly decreased during the course of the study until the natural decay of the cow pads. The subsoil layers of [0-5 cm] and [15-20 cm] were also containing STEC cells at the beginning of the monitoring, but STEC became rapidly undetectable by *stx* PCR in soil after natural decay of the fecal matter (Fig. 1). However, numeration of STEC in soil samples was not possible using the MPN-PCR *stx* method. Indeed, STEC cells numbers were below the detection limit of this method (<200 CFU g⁻¹ soil), and this was found for all soil samples from the pasture units of the studied watershed. On the other hand, the downhill soil samples, which were farther from bovine feces, were all negative for the *stx* genes. Finally, all water samples collected in the river at the outlet point of the watershed (where all the runoff and infiltrated waters were collected) showed a positive PCR-*stx* result after enrichment, but numbers of STEC cells were below 200 CFU ml⁻¹ water.

Evaluation of rainfall events and temperature in the watershed. Environmental temperature and rainfall events are shown in Fig. 3. They fluctuate appreciably over the course of the study. Numerous rainfall events were recorded in 2005 and 2006, and maximum

peak values of approximately 100 mm/24 h were noted during the two sampling periods. Air temperature above the watershed ranged between 4.5 to 19.7°C with a mean value of 12.1°C in 2005, and from 3 to 21.4°C with a mean value of 11.2°C in 2006. However, no clear correlation could be observed between the STEC survival and the climatic events.

5

Genotypic and phenotypic characteristics of STEC isolates. A total of 75 STEC isolates were recovered from samples collected in the different watershed pasture units in 2005 (n=38) and 2006 (n=37) (Table 2). Of these, only three STEC isolates were recovered from river water in 2006. PFGE typing of *Xba*I-digested genomic DNA revealed 15 to 25 DNA fragments in a range from less than 50 kb to 700 kb for each of the 75 STEC isolates. The similarity level between PFGE patterns was higher than 72% (Fig. 4). Altogether, 8 different PFGE patterns were observed (C1-C8), and the clonal types C3 and C5, and C6 and C7 were closely related ($\geq 95\%$ similarity). At an arbitrary similarity level of 79 %, two main clusters (G1 and G2, Fig. 4) were identified.

10

15

One isolate from each clone was randomly selected for characterization of genetic and phenotypic traits. The serotypes of STEC strains are shown in the Table 3. The STEC strains divided into 6 distinct serotypes, and STEC from natural water and feces displayed different serotypes. All STEC strains were positive in the Vero Elisa test and showed a positive result after PCR amplification with specific primers for the *stx2* gene. Subtyping of Shiga toxin type 2 variant B-subunit yielded 1 strain with *stx2*, two strains with *stx2v-ha* and *stx2v-hb*, one strain with *stx2-NV206*, two strains with *stx2v-ha* and one strain harboring the *stx2* and the *stx2g* genes. None of the strains carried the genes encoding Shiga-toxin 1 (*stx1*), intimin (*eae*) and enterohemolysin (*e-hly*). The BioFilm Ring Test[®] revealed that STEC isolates recovered from the watershed were able to form biofilm with BioFilm Indices (BFI) values ≤ 2 , 4 h after inoculation (Table 3). Similar results were obtained after 5 and 6 h of growth. All strains except two (C1 and C4) were found motile as tested in motility test medium (Difco) (Table 3).

20

25

Persistence and diversity of STEC from dairy cattle grazing in the watershed pasture units. Several results support the possible persistence of STEC strains in the environmental conditions of the alpine watershed. The PFGE data show that distinct types of STEC were able to persist during a long period of time in fecal matter excreted onto various pasture units of the watershed. As an example, the same clonal type (PFGE patterns F2-F12) was recovered 2 months after the first isolation from a given cow pad (Fig. 5B). Moreover,

30

the PFGE cluster analysis revealed the existence of two closely related (95% similarity) STEC strains (clonal types C3 and C5) which were recovered in 2005 and in 2006 from the same dairy cattle grazing in the watershed. In total, 5 different PFGE subtypes were found in isolates from dairy cattle and two dominant clonal types were recovered in 2005 (C4) and in 2006 (C5). In some cases, two different STEC clones according to differences in PFGE patterns were isolated from the same bovine fecal pad, as for example the isolates F12 and F15 (recovered from a given cow pad the 08/02 and 08/08, respectively) (Fig. 5A). Similar results were obtained with samples from soil, as for example the isolates S13 and S14 (08/02) (Fig. 5A).

Transfer of STEC from feces to soil. Transmission of STEC from bovine fecal deposit to subsoil layers (i.e. 0-5 and 15-20 cm) was observed. As shown in the Fig. 5 (A), the same STEC strain was recovered in a cow pad and in subsoil layers at a depth up to 20 cm. This phenomenon was observed in all pasture units investigated (data not shown). On the other hand, all STEC isolates obtained from the stream water samples displayed distinctly different PFGE patterns compared to those obtained from cattle feces (Fig. 5B).

DISCUSSION

The presence of zoonotic agents such as pathogenic strains of STEC in recreational and potable waters is a major concern to the general public. For the United States, 9 % (31) of the *E. coli* O157:H7 outbreaks reported to the CDC from 1982 to 2002 were waterborne (31). *E. coli* O157:H7 outbreaks associated with drinking or recreational water were recently reported in Europe. In 2005, 18 cases of waterborne *E. coli* O157:H7 infection were identified in a small area of Midwest Ireland (19). Earlier, 7 cases of *E. coli* O157:H7 infection involving recreational stream water were identified in England, and epidemiological investigations showed that STEC O157 excreting cattle was grazing upstream. Cattle feces are considered as the main source of environmental contamination with STEC (21). But, in watershed, there is still significant knowledge gaps concerning the fate of STEC after being excreted in feces and deposited onto soil surface. The present study aimed to get information about the transfer of STEC strains from naturally contaminated bovine feces to subsoil layers in different units of a high mountain pastured watershed, and about their persistence in this ecosystem. To this end, STEC strains were isolated and characterized for their phenotypic and genotypic traits.

STEC were found to survive for at least two months in bovine feces excreted to watershed land, even under extreme conditions encountered in the mountain region such as high variations of air temperature or heavy precipitations (Fig. 3). In fact, PFGE data showed that STEC strains were recovered from a same cow pad 2 months after deposition. Similar
 5 result was already reported in *in vitro* conditions, with survival time up to 12 weeks in bovine feces inoculated at a rate of $3 \log \text{CFU g}^{-1}$ and incubated at 15°C (16). During the course of the study, numbers of cultivatable STEC slightly decreased in all bovine feces sampled in the different pasture units. Furthermore, the cluster analysis showed that isolates belonging to the same clonal type of STEC (clones C3 and C5 display only one PFGE band of difference and
 10 thus may be considered as belonging to a same clonal population) were recovered from dairy cattle during summers in 2005 and 2006. This indicates that the same STEC strain can proliferate over at least 12 months in one and the same dairy cattle. Similarly, Fremaux et al. (16) showed that STEC strains could be isolated one year apart on various contaminated supports (pen walls, cow traps, water troughs, pen soil or milking machine) from a same dairy
 15 farm.

The strong persistence of STEC strains in cow pads is one of the factors that contribute to the dissemination of these bacteria in soil. By PFGE analysis we could show that STEC are able to transfer from bovine feces to deep soil layers, at a depth up to 20 cm. The major transport modes for bacteria in soil receiving feces are (i) movement with infiltrating
 20 water (34), which is closely dependent on rainfall events, (ii) biological activities, particularly through soil fauna. In our study, numerous rainfall events (Fig. 3) and a great variety of coprophage insects, and worms were observed (data not shown). A recent study has shown that anecic earthworms may significantly contribute to the vertical movement of *E. coli* O157:H7 in soil (41). As noted by others (39), the leaching and retention of bacteria largely
 25 depends on the structural and textural soil characteristics, but also on the water retention capacity of the soil. In our study, STEC levels detected in the different types of soil were similar despite the great diversity of soil textures analyzed, probably due to the low sensitivity of the MPN-PCR *stx* method. But it is the only one culturable method currently available for detection of STEC which do not have common biochemical characteristic allowing the use of
 30 specific media for their numeration. Thus, STEC cells numbers were always below the detection limit of the numeration method (i.e. $< 200 \text{CFU g}^{-1}$) in the 2 deep soil layers, regardless the watershed pasture unit tested. This evidence that a little part of bacterial populations carried by fecal matter, are likely to move with vertical water runoff as shown by Crane et al. (12).

In our study, the soil became rapidly free of detectable STEC once the cow pad had naturally decomposed under meteorological and biological actions, suggesting that STEC are not able to establish in soil despite their capacity to form biofilms. However, this ability could enable the bacteria to attach to fecal or soil particles and might contribute to their dissemination in deep soil layers through the displacement of particles with water flow, especially after rainfall events or snowmelt. The flagellar motility of STEC strains might also enhance vertical cells movement in soil saturated with water. These properties could explain that the number of culturable STEC rapidly decreased in subsoil layers because of the flow of percolating water, which disperses part of the particulate matter into a large volume of either deep soil or stream sediment. Besides, the influence of various biotic or abiotic factors on the mortality of bacteria should not be neglected.

Analysis of the 21 water samples at the outlet of the watershed was performed in order to check the presence or absence of STEC cells. Enrichment cultures from all water samples were positive for *stx* specific sequences at the 7 sampling times, but only 3 STEC strains could be obtained in culture. To explain this discrepancy between the occurrence of the gene *stx* and the viable isolates, the presence of free DNA or bacteriophages carrying the *stx* gene can be considered since a study reported significant numbers of free *stx2*-bearing bacteriophages in the environment (22). Despite the low numbers of STEC recovered from water (<200 CFU ml⁻¹), it has an important health implications since the estimated infectious dose of *E. coli* O157:H7 for humans is as low as 10 bacteria (37). In our study, none of the STEC strains isolated from cattle feces and deep soil layers was recovered from water samples, thus transfer of STEC strains from deep soil layers (or from cow pads) to water could not be demonstrated, which does not mean that it does not exist. This finding could be due to the high dilution of STEC in water which causes problems for their detection. It could be also due to differences between STEC strains in their ability to survive or to enter a non culturable state in water.

The genotypic and phenotypic diversities of STEC strains isolated in the watershed area highlight the fact that cattle can harbor various STEC clones as previously demonstrated on various french dairy farms by Fremaux et al. (16). The 8 PFGE-patterns corresponded to the total of STEC strains that were isolated from the watershed site and these were associated with 6 different serotypes. All ones were previously reported to occur in cattle (www.microbionet.com.au/vtactable.htm). One of them (O91:H10) had been previously reported to be associated with hemolytic and uraemic syndrome in humans in France (30). The finding that all STEC strains were negative for the gene *eae* does not indicate that these are apathogenic for humans. Atypical EHEC such as O91, O113 and O174 strains were

shown to cause bloody diarrhea and HUS in humans in different countries (3, 27, 29, 40). These strains are characterized by the presence of genes encoding Stx2, which may be more important in the development of HUS than Stx1 (7, 23). A recent study indicated that the *stx2* gene was also more prevalent among the non-O157 strains isolated in France from dairy cattle (16). Here, an important allelic diversity regarding the gene *stx2* could be observed, similarly to a previous French study in which the *stx2* subtyping of STEC isolated from healthy cows had been carried out (1). A same *stx2* genotype diversity was also observed for STEC isolated from animals and food in Argentina and Brazil (17).

In conclusion, this study provides important information about STEC ecology and diversity in pastured watershed. In these *in situ* conditions, their strong persistence in cow pads contributes to the environmental dissemination of the STEC strains. This study demonstrates that deep soil layers is regularly inoculated with a little part of STEC population originated from the cow pad, but the bacteria was unable to establish. The fact that all water samples contain potentially pathogenic STEC population has an important health risk since this water is used by human populations for drinking, irrigation and recreational purposes. Further investigations to determine the spatial and temporal distribution of STEC entering the surface water should be performed in order to estimate the potential risk for STEC infection.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by funds from the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) and the GESSOL2 project PASTOR (Ministère Français de l'Ecologie et du Développement Durable). We acknowledge the technical assistance provided by Mrs A. Beddiaf and Mrs S. Texier. We also thank Y. Moënné-Loccoz (UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne) and J.M. Dorioz (INRA, Thonon-les-Bains) for useful discussions. We are grateful to P. Lejeune (UMR CNRS 5557, Université Lyon 1) and BioFilm Control industry for help and lending of the pack BioFilm Control.

REFERENCES

1. **Bertin, Y., K. Boukhors, N. Pradel, V. Livrelli, and C. Martin.** 2001. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. J. Clin. Microbiol. **39**:3060-3065.
2. **Beutin, L., K. Gleier, and S. Zimmermann.** 1999. Comparative evaluation of different diagnostic methods for detection of Shiga toxin-producing strains of *Escherichia coli* (STEC) in human clinical stool specimens. In Duffy, G., P. Garvey, J. Coia, Y. Wasteson, and D. A. McDowell (ed.), Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe. Concerted action CT98-3935. 1. Methods for verocytotoxigenic *E. coli*, The National Food Centre, Dublin, Ireland.
3. **Beutin, L., G. Krause, S. Zimmermann, S. Kaulfuss, and K. Gleier.** 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. J. Clin. Microbiol. **42**:1099-1108.
4. **Beutin, L., E. Strauch, S. Zimmermann, S. Kaulfuss, C. Schaudinn, A. Mannel, and H. R. Gelderblom.** 2005. Genetical and functional investigation of *fliC* genes encoding flagellar serotype H4 in wildtype strains of *Escherichia coli* and in a laboratory *E. coli* K-12 strain expressing flagellar antigen type H48. BMC Microbiol. **5**:4.
5. **Beutin, L., S. Zimmermann, and K. Gleier.** 1996. Rapid detection and isolation of shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. J. Clin. Microbiol. **34**:2812-2814.
6. **Beutin, L., S. Zimmermann, and K. Gleier.** 1998. Human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. Emerg. Infect. Dis. **4**:635-639.
7. **Boerlin, P., S. A. McEwen, F. Boerlin-Petzold, J. B. Wilson, R. P. Johnson, and C. L. Gyles.** 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. J. Clin. Microbiol. **37**:497-503.
8. **Bolton, D. J., C. M. Byrne, J. J. Sheridan, D. A. McDowell, and I. S. Blair.** 1999. The survival characteristics of a non-toxigenic strain of *Escherichia coli* O157:H7. J. Appl. Microbiol. **86**:407-11.

9. **Bruneau, A., H. Rodrigue, J. Ismael, R. Dion, and R. Allard.** 2004. Outbreak of *E. coli* O157:H7 associated with bathing at a public beach in the Montreal-Centre region. *Can. Commun. Dis. Rep.* **30**:133-136.
10. **Cebula, T. A., W. L. Payne, and P. Feng.** 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**:248-250.
11. **Chavant, P., B. Gaillard-Martinie, R. Talon, M. Hebraud, and T. Bernardi.** 2007. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J. Microbiol. Methods* **68**:605-612.
12. **Crane S.R., M. J. A., Grismer M.E. and Rimer J.R.** 1983. Bacterial pollution from agricultural sources: a review. *Transactions of the ASAE*: 858-866.
13. **Dorioz, J. M., and J. P. Party.** 1987. Dynamique écologique et typologie de territoires pastoraux des Alpes du Nord - Analyse de l'organisation agro-écologique d'un alpage de référence. *Acta Oecologica - Oecol. Applic.* **8**:257-280.
14. **Dorner, S. M., W. B. Anderson, R. M. Slawson, N. Kouwen, and P. M. Huck.** 2006. Hydrologic modeling of pathogen fate and transport. *Environ. Sci. Technol.* **40**:4746-4753.
15. **Fremaux, B., M. L. Delignette-Muller, C. Prigent-Combaret, A. Gleizal, and C. Vernozzy-Rozand.** 2007. Growth and survival of non-O157:H7 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. *J. Appl. Microbiol.* **102**:89-99.
16. **Fremaux, B., S. Raynaud, L. Beutin, and C. Vernozzy-Rozand.** 2006. Dissemination and persistence of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Vet. Microbiol.* **117**:180-191.
17. **Guth, B. E., I. Chinen, E. Miliwebsky, A. M. Cerqueira, G. Chillemi, J. R. Andrade, A. Baschkier, and M. Rivas.** 2003. Serotypes and Shiga toxin genotypes among *Escherichia coli* isolated from animals and food in Argentina and Brazil. *Vet. Microbiol.* **92**:335-349.
18. **Johnson, W. M., D. R. Pollard, H. Lior, S. D. Tyler, and K. R. Rozee.** 1990. Differentiation of genes coding for *Escherichia coli* verotoxin 2 and the verotoxin associated with porcine edema disease (VTe) by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2351-2353.
19. **Mannix, M., N. O'Connell, E. McNamara, A. Fitzgerald, T. Prendiville, T. Norris, T. Greally, R. Fitzgerald, D. Whyte, D. Barron, R. Monaghan, E. Whelan,**

- A. Carroll, A. Curtin, C. Collins, J. Quinn, F. O'Dea, M. O'Riordan, J. Buckley, J. McCarthy, and P. Mc Keown.** 2005. Large *E. coli* O157 outbreak in Ireland, October-November 2005. *Euro. Surveill.* **10**.
20. **Mannix, M., D. Whyte, E. McNamara, O. C. N, R. Fitzgerald, M. Mahony, T. Prendiville, T. Norris, A. Curtin, A. Carroll, E. Whelan, J. Buckley, J. McCarthy, M. Murphy, and T. Greally.** 2007. Large outbreak of *E. coli* O157 in 2005, Ireland. *Euro. Surveill.* **12**.
21. **Maule, A.** 2000. Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* **29**:71S-78S.
- 10 22. **Muniesa, M., and J. Jofre.** 1998. Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2443-2448.
23. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:142-201.
- 15 24. **O'Brien, A. D., and J. B. Kaper.** 1998. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday, today and tomorrow, *In* J. B. Kaper and A. D. O'Brien(ed.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.
25. **Pachepsky, Y. A., A. M. Sadeghi, S. A. Bradford, D. R. Shelton, A. K. Guber, and T. Dao.** 2006. Transport and fate of manure-borne pathogens: modeling perspective. *Agric. Water Manag.* **86**:81-92.
- 20 26. **Paton, A. W., and J. C. Paton.** 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*. *J. Clin. Microbiol.* **36**:598-602.
- 25 27. **Paton, A. W., M. C. Woodrow, R. M. Doyle, J. A. Lanser, and J. C. Paton.** 1999. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3357-3361.
- 30 28. **Pierard, D., G. Muyldermans, L. Moriau, D. Stevens, and S. Lauwers.** 1998. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3317-3322.
29. **Pradel, N., K. Boukhors, Y. Bertin, C. Forestier, C. Martin, and V. Livrelli.** 2001. Heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from

hemolytic-uremic syndrome patients, cattle, and food samples in central France. Appl. Environ. Microbiol. **67**:2460-2468.

30. **Pradel, N., C. De Champs, J. B. Palcoux, J. Sirot, C. Forestier, B. Joly, F. Scheutz, and V. Livrelli.** 2000. Verotoxin-producing *Escherichia coli* infections: study of its prevalence in children in the Auvergne region. Arch. Pediatr. **7 Suppl 3**:544s-550s.

31. **Rangel, J. M., P. H. Sparling, C. Crowe, P. M. Griffin, and D. L. Swerdlow.** 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. Emerg. Infect. Dis. **11**:603-609.

32. **Raynaud, S., and V. Heuchel.** 2005. Surveillance et maîtrise de la prévalence du portage des *Escherichia coli* productrices de Shiga-toxines (STEC) dans les élevages bovins - Recherche des moyens de prévention de la contamination du lait cru à la production. Compte rendu 150531001, Département technique d'élevage et qualité - Service lait.

33. **Read, S. C., R. C. Clarke, A. Martin, S. A. De Grandis, J. Hii, S. McEwen, and C. L. Gyles.** 1992. Polymerase chain reaction for detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources. Mol. Cell Probes **6**:153-161.

34. **Reddy, K. R., R. Khaleel and M.R. Overcash.** 1981. Behavior and transport of microbial pathogens and indicator organisms in soils treated with organic wastes. J. Environ. Qual. **10**:255-266.

35. **Reid, S. D., D. J. Betting, and T. S. Whittam.** 1999. Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. **37**:2719-2722.

36. **Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgeson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen.** 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. **308**:681-685.

37. **Tarr, P. I.** 1995. *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. Clin. Infect. Dis. **20**:1-8.

38. **Thurston-Enriquez, J. A., J. E. Gilley, and B. Eghball.** 2005. Microbial quality of runoff following land application of cattle manure and swine slurry. J. Water Health **3**:157-171.

39. **Trevisan, D., J. Y. Vansteelant, and J. M. Dorioz.** 2002. Survival and leaching of fecal bacteria after slurry spreading on mountain hay meadows: consequences for the management of water contamination risk. *Water Res.* **36**:275-283.
40. **Werber, D., S. C. Behnke, A. Fruth, R. Merle, S. Menzler, S. Glaser, L. Kreienbrock, R. Prager, H. Tschape, P. Roggentin, J. Bockemuhl, and A. Ammon.** 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Germany: different risk factors for different age groups. *Am. J. Epidemiol.* **165**:425-434.
41. **Williams, A. P., P. Roberts, L. M. Avery, K. Killham, and D. L. Jones.** 2006. Earthworms as vectors of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and vermicomposts. *FEMS Microbiol. Ecol.* **58**:54-64.

Figure legends:

FIG. 1. Representation of the sampling times of fecal and soil samples collected in the RG (◆) and PG (▲) pasture units in 2005 (A), and CG and NG pasture units (△) in 2006 (B). For each pasture unit investigated (▲, △, ◆), F⁻ and S⁻ indicated the time of the complete decay of the fecal matter and the period for which the *stx* gene was not detected in the subsoil layers, respectively.

FIG. 2. Survival of STEC in the different cow pads followed in the PG (△, +, ○) pasture unit (A) and the NG (△, +, ×) and CG (○) pasture units (B). Arrows indicated the complete decay of the fecal matters.

FIG. 3. Rainfall (bars) and temperature (line) recorded on the watershed during the two studied periods in 2005 (A) and 2006 (B).

FIG. 4. Cluster analysis of the 8 STEC clones based on UPGMA comparison of PFGE patterns. *E. coli* O157:H7 strain EDL 933 and the Shigatoxin-negative *E. coli* strains MG1655, MC4100 were included as reference. Two major clusters (G1 and G2) were arbitrarily defined at 79% similarity.

FIG. 5. PFGE profiles for 30 STEC isolates recovered from cow pads (F) and deep soil layers (S: 0-5 and S: 15-20 cm) located below the cow pads in PG pasture unit in 2005 (A), and in NG pasture unit and water samples in 2006 (B) at different sampling times. Gray and black colours corresponded to two different cow pad-soils systems studied in the PG pasture unit (A). Lanes 1 and 17 correspond to molecular weight markers (numbers on the left are the number of kilobase pairs).

TABLE 1. Characteristics of soils sampled in this study

Pasture area	Dominant plant	Soil characteristics							
		layer	Soil texture	% clay	% loam	% sand	Organic carbon g/kg	CEC ^a	BS ^b
<i>Poa</i>	<i>Poa</i>	0-5 cm	Silty clay	42.9	42.2	14.9	85.4	10.7	98.2
<i>alpina</i>	<i>alpina</i>	15-20 cm	Clay loam	32	37.6	30.4	22.8	9.47	110
grassland									
<i>Rumex</i>	<i>Rumex</i>	0-5 cm	Clay	59.6	38	2.4	58.4	10.5	105.
grassland	<i>alpinus</i>								3
		15-20 cm	Clay	59.2	36.6	4.2	43	9.53	105.
									6
<i>Caltha</i>	<i>Caltha</i>	0-5 cm	Clay loam	34.9	40.5	24.6	142	11.6	99.8
grassland	<i>palustris</i>								
		15-20 cm	Loam	19	29.7	51.3	25.4	11.7	118.
									9
<i>Nardus</i>	<i>Nardus</i>	0-5 cm	Silty clay	31.2	52.2	16.6	96.5	11	44.5
grassland	<i>stricta</i>		loam						
		15-20 cm	Silty clay	32.1	48.9	19	17	11	11.2
			loam						

^a CEC: Cation Exchange Capacity

^b BS: Base saturation (%)

TABLE 2. Recovery of STEC isolates of different PFGE groups from cow pads^a and soil located below a cow pad in the pasture units sampled in 2005 and 2006.

PFGE group	Sample type	2005		2006	
		<i>Rumex</i> grassland	<i>Poa</i> grassland	<i>Nardus</i> grassland	<i>Caltha</i> grassland
C1	Cow pad	0	pad 1 (1), pad 2 (1)	0	0
	Soil 0-5 cm	0	pad 1 (1)	0	0
	Soil 15-20 cm	0	0	0	0
C2	Cow pad	pad 2 (1)	0	0	0
	Soil 0-5 cm	0	0	0	0
	Soil 15-20 cm	pad 2 (1)	0	0	0
C3	Cow pad	pad 3 (2)	0	0	0
	Soil 0-5 cm	pad 3 (1)	0	0	0
	Soil 15-20 cm	pad 3 (2)	0	0	0
C4	Cow pad	pad 1 (3) ^b , pad 2 (3)	pad 1 (2), pad 3 (5)	0	0
	Soil 0-5 cm	pad 1 (5)	pad 1 (1), pad 3 (3)	0	0
	Soil 15-20 cm	pad 1 (4)	pad 1 (1), pad 3 (1)	0	0
C5	Cow pad	0	0	pad 1 (5), pad 2 (5), pad 3 (6)	pad 1 (1)
	Soil 0-5 cm	0	0	pad 1 (3), pad 2 (4), pad 3 (2)	pad 1 (1)
	Soil 15-20 cm	0	0	pad 1 (2), pad 2 (3), pad 3 (2)	0

^a One pad (*Caltha* grassland) or three pads (other grasslands) were monitored, over 7 (*Rumex*), 5 (*Poa*) and 6 (*Nardus* and *Caltha*) sampling dates, at which the presence of STEC in the cow pads and the soil below was established by PCR.

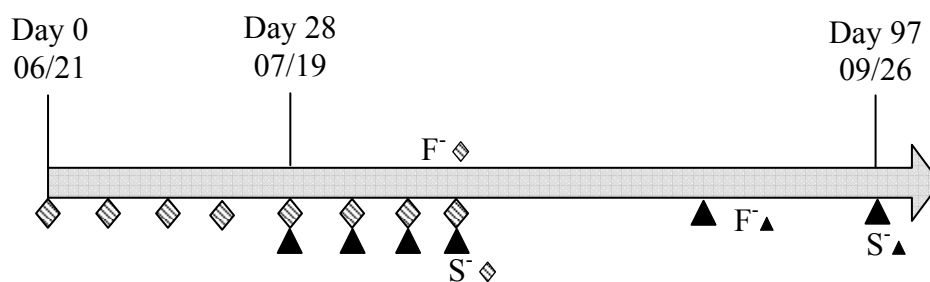
^b The number in parenthesis indicates the number of sampling dates at which a STEC isolate of that PFGE group was recovered.

TABLE 3. Characterization of the different STEC and *stx*-negative *E. coli* clones recovered from fecal and environmental samples in the watershed

Clone	Area	Period	<i>stx</i> -genotype	<i>e-hly</i>	<i>eae</i>	Serotype	VT- Elisa	Biofilm ^a	Motility
C1	PG	2005	<i>stx2+stx2g</i>	-	-	O116:NM	+	+	-
C2	RG	2005	<i>stx2v-ha</i>	-	-	O174:H21	+	+	+
C3	RG	2005	<i>stx2v-ha + stx2v-hb</i>	-	-	O91:H10	+	+	+
C4	PG, RG	2005	<i>stx2-NV206</i>	-	-	O113:NM	+	+	-
C5	CG, NG	2006	<i>stx2v-ha + stx2v-hb</i>	-	-	O91:H10	+	+	+
C6	water	2006	<i>stx2</i>	-	-	O2:H27	+	+	+
C7	water	2006	<i>stx2</i>	-	-	O2:H27	+	+	+
C8	water	2006	<i>stx2v-ha</i>	-	-	O175:H16	+	+	+

^a 22 STEC strains (including various isolates of each clone) were tested

A)



B)

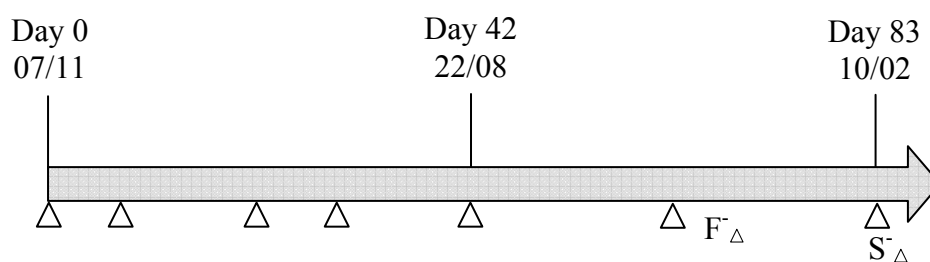


FIG. 1. Representation of the sampling times of fecal and soil samples collected in the RG (◇) and PG (▲) pasture units in 2005 (A), and CG and NG pasture units (△) in 2006 (B). For each pasture unit investigated (▲, △, ◇), F⁻ and S⁻ indicated the time of the complete decay of the fecal matter and the period for which the *stx* gene was not detected in the subsoil layers, respectively.

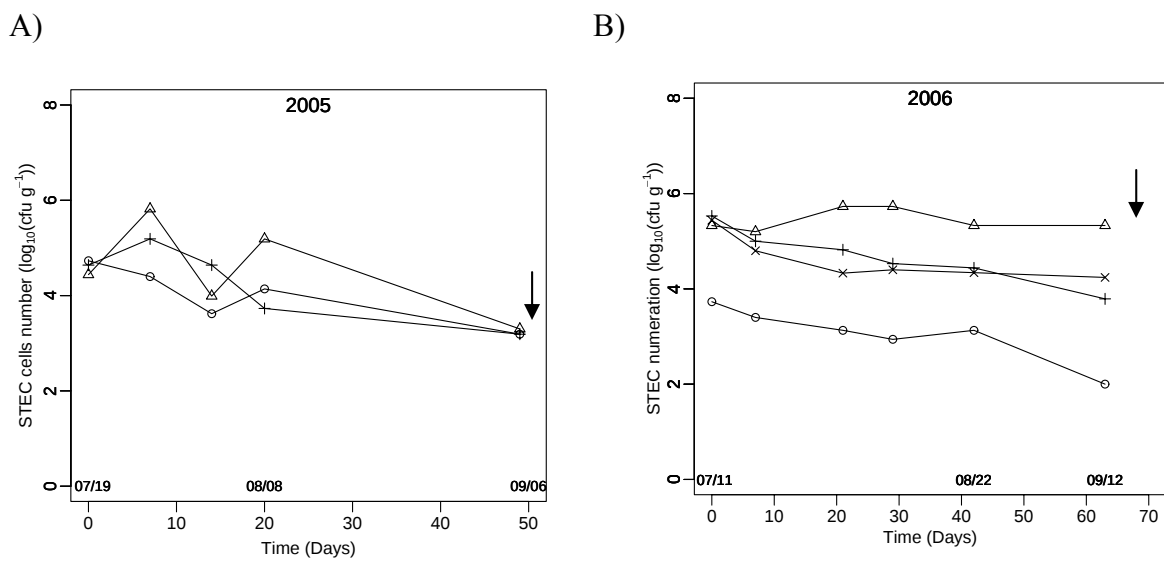


FIG. 2. Survival of STEC in the different cow pads followed in the PG (Δ, +, O) pasture unit (A) and the NG (Δ, +, ×) and CG (O) pasture units (B). Arrows indicated the complete natural decay (absence) of the fecal pats due to climatic events.

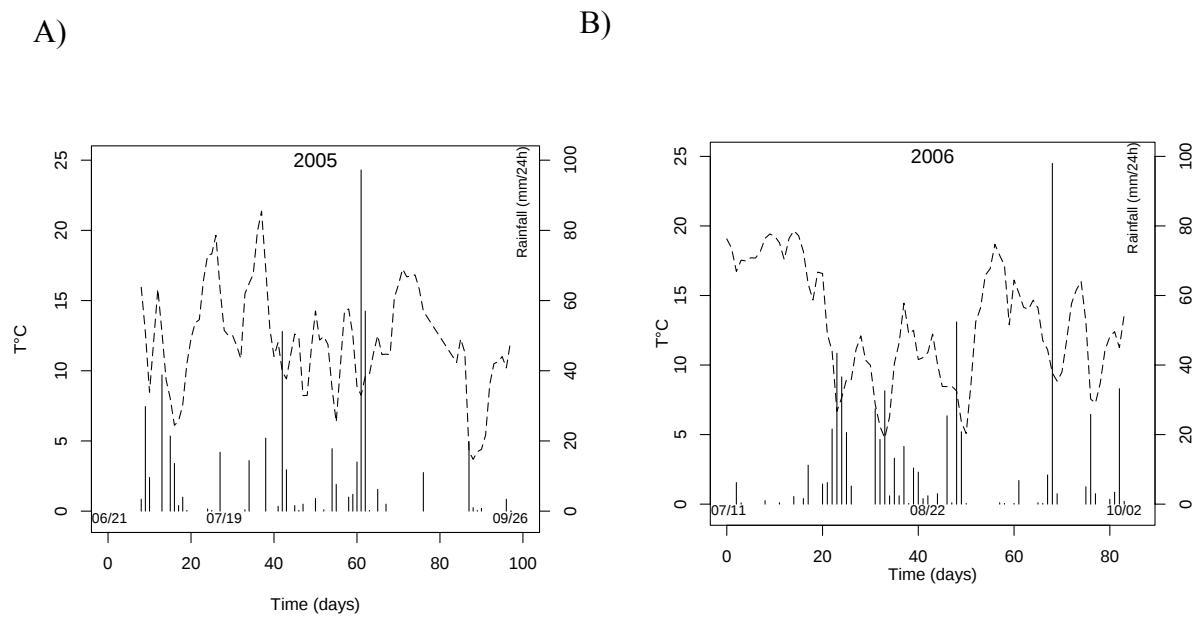


FIG. 3. Rainfall (bars) and temperature (line) recorded on the watershed during the two studied periods in 2005 (A) and 2006 (B).

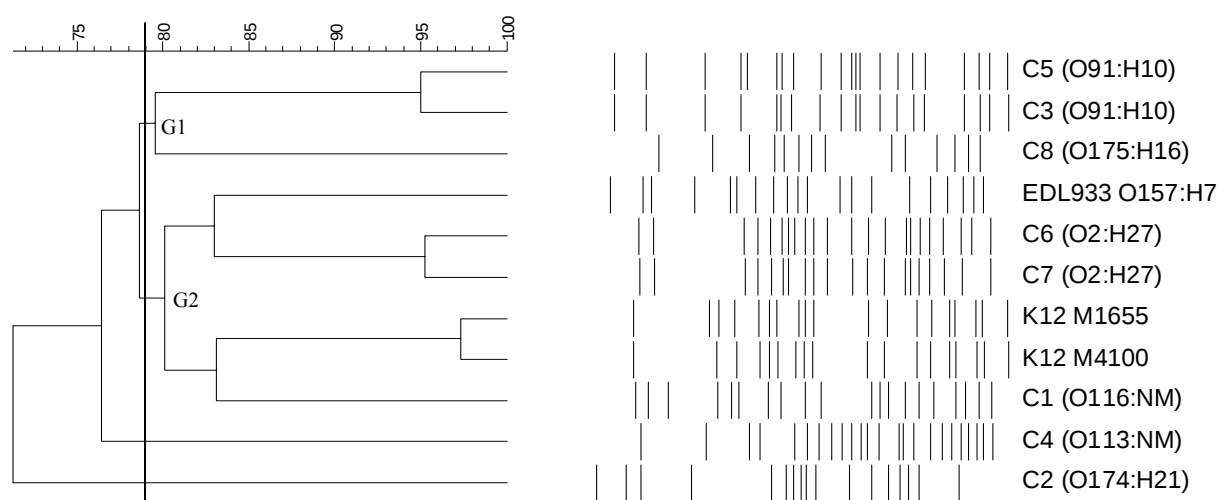


FIG. 4. Cluster analysis of the 8 STEC clones based on UPGMA comparison of PFGE patterns. *E. coli* O157:H7 strain EDL 933 and the Shigatoxin-negative *E. coli* strains MG1655, MC4100 were included as reference. Two major clusters (G1 and G2) were arbitrarily defined at 79% similarity.

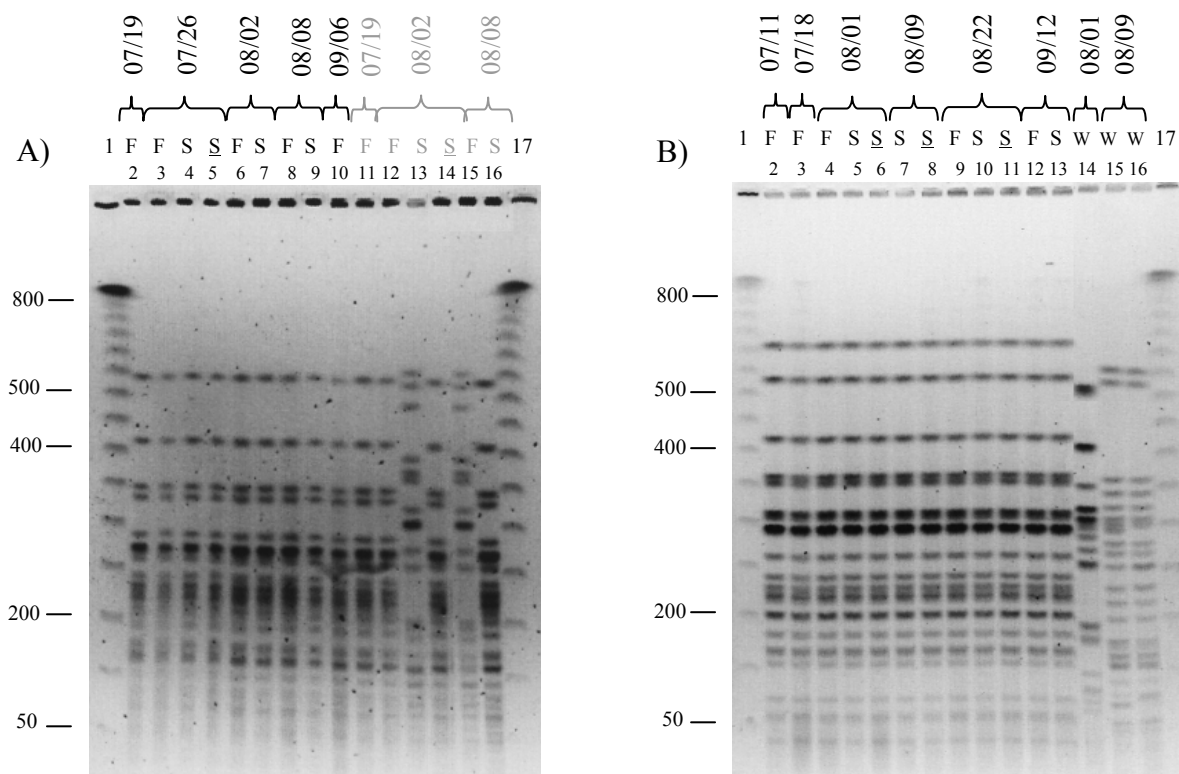


FIG. 5. PFGE profiles for 30 STEC isolates recovered from cow pads (F) and deep soil layers (S: 0-5 and S: 15-20 cm) located below the cow pads in PG pasture unit in 2005 (A), and in NG pasture unit and water samples in 2006 (B) at different sampling times. Gray and black colours corresponded to two different cow pad-soils systems studied in the PG pasture unit (A). Lanes 1 and 17 correspond to molecular weight markers (numbers on the left are the number of kilobase pairs).

**CINQUIÈME PARTIE : ÉTUDE DE L'EFFET D'UN COMPOSÉ
ANTIMICROBIEN, LE 2,4 DIACETYLPHLOROGLUCINOL
(PHL), ET DE LA SOUCHE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* F113
PRODUCTRICE DE PHL SUR UNE COLLECTION D'ISOLATS
D'*ESCHERICHIA COLI* O157:H7**

Publication N°6

**Effects of 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl) and of Phl-producing
Pseudomonas fluorescens F113 on contrasted strains of the human
pathogen *Escherichia coli* O157:H7**

B. Fremaux, C. Prigent-Combaret, M.L. Delignette-Muller, P. Pujic, Y. Moënne-
Loccoz et C. Vernozzy-Rozand

Soumission prévue dans *Microbial Ecology*

Présentation de la Publication n°6

1. Contexte et objectifs de cette étude

Une multitude de facteurs biotiques et abiotiques peuvent affecter la survie d'*E. coli* O157:H7 dans le sol. Jiang *et al.* (2002) et Cooley *et al.* (2003) ont montré l'effet négatif des flores compétitives et/ou antagonistes sur la survie d'*E. coli* O157:H7. Certaines interactions antagonistes impliquent la production de composés antimicrobiens, incluant des antibiotiques, bactériocines, certaines enzymes lytiques extra-cellulaires, ou des chélateurs du fer. De nombreuses souches de *Pseudomonas* fluorescent isolées dans la rhizosphère sont capables de produire un composé antimicrobien, le 2,4-diacétylphloroglucinol (Phl) (Wang *et al.*, 2001). En plus de ses propriétés antifongiques, ce composé présente une activité antibactérienne, notamment mise en évidence contre des bactéries pathogènes pour l'homme, telles que *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus*. De récents travaux ont montré que certains isolats de *P. fluorescens* ont la capacité d'inhiber la croissance d'*E. coli* O157:H7, mais l'antibiotique impliqué n'a pas été identifié (Johannessen *et al.*, 2005).

Le but de ces travaux était donc d'analyser l'effet du Phl et de la souche *P. fluorescens* F113 productrice de Phl, ou de son mutant Phl⁻, sur la croissance de 73 isolats d'*E. coli* O157:H7. La colonisation de plantules de blé par *E. coli* O157:H7 a également été comparée en présence de la souche *P. fluorescens* F113 ou de son mutant Phl⁻. L'observation des 2 populations bactériennes rendues fluorescentes a été effectuée par microscopie confocale. Enfin, la distribution de la résistance au Phl selon le profil de virulence, le profil PFGE et l'origine des 73 isolats d'*E. coli* O157:H7 a été analysée.

2. Matériels et méthodes

Une collection de 73 isolats d'*E. coli* O157:H7 (ENVL, UMAP) provenant de diverses origines a été utilisée dans cette étude. Tous ont été caractérisés pour la présence des gènes de virulence *stx1*, *stx2*, *eae* et *ehx* et leur pulsotype obtenu avec l'enzyme *XbaI* établi. Ces profils ont été analysés grâce au logiciel GelCompar et leurs relations phylogénétiques déterminées par la méthode UPGMA. La souche *P. fluorescens* F113, isolée de la rhizosphère de betterave à sucre (Irlande), a été utilisée comme souche modèle de *Pseudomonas* producteurs de Phl. La souche F113G22 est un mutant Phl::Tn5 d'inactivation des gènes de la voie de biosynthèse du Phl. La souche PGPR *Azospirillum brasilense* Cd et la souche phytopathogène CFBP 2046 de l'espèce

Pectobacterium carotovora sous-espèce *carotovora* ont été utilisées comme souches témoins, sensibles au Phl.

75 L'étude se décline en quatre parties :

(i) L'interaction entre les souches *P. fluorescens* F113 Phl⁺, son mutant F113G22 Phl⁻ et les 73 isolats d'*E. coli* O157:H7 a été évaluée sur milieu gélosé. Sur une surcouche contenant initialement 10⁷ UFC ml⁻¹ de chaque souche d'*E. coli* O157:H7 déposée sur une gélose nutritive, 10 µl de chacune des suspensions de F113 et F113G22 (contenant environ 5.10⁷ cellules) ont été déposés.

80 Une lecture de la zone d'inhibition (au pourtour des colonies de *P. fluorescens*) a été réalisée après 48 h d'incubation à 28°C.

(ii) La concentration minimale inhibitrice (CMI) du Phl a également été déterminée vis à vis des 73 isolats d'*E. coli* O157:H7, en suivant le protocole de référence décrit par le Comité Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Sur des boîtes contenant des concentrations croissantes en Phl, allant de 0 à 512 µg ml⁻¹, les 73 isolats d'*E. coli* O157:H7 ont été inoculés. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24 h.

(iii) Pour confirmer ces expérimentations et se rapprocher des conditions rencontrées *in situ*, des co-inoculations des souches *Pseudomonas* avec 1 souche *E. coli* O157:H7, résistante ou sensible à 256 µg ml⁻¹ de Phl, ont été réalisées dans la rhizosphère de blé. Les souches *P. fluorescens* F113 et F113G22 ont préalablement été marquées avec une protéine fluorescente, la GFP (pour green fluorescent protein), par acquisition du plasmide pMP2444 par conjugaison biparentale. Les souches *E. coli* O157:H7 39236 (sensible à une [Phl] de 256 µg ml⁻¹) et A33-35 (résistante à une [Phl] de 256 µg ml⁻¹) ont quant à elles été marquées avec une protéine fluorescente rouge, la DsRed, par acquisition du plasmide pQE60 P_{lac}-DsRed-Express selon la méthode décrite par Chung *et al.* (1989).

Des graines de blé ont été stérilisées, puis déposées sur milieu gélosé pendant 48 h à 28°C. Après germination (48 h), 3 graines ont été placées sur une grille préalablement fixée dans un tube en verre contenant un milieu liquide nutritif. Chaque souche d'*E. coli* O157:H7 marquée à la DsRed a été inoculée seule ou co-inoculée avec la souche *P. fluorescens* F113 ou F113G22 ; les inoculations étant réalisées en triplicat. Les souches marquées de *P. fluorescens* et d'*E. coli* O157:H7 ont respectivement été inoculées à un taux final de 10⁶ et 10³ UFC par système, au niveau des graines, sachant que *P. fluorescens* a été inoculé 48 h avant le pathogène pour favoriser la production du Phl. Tous les tubes ont ensuite été placés dans une chambre noire, à 28°C. Après 5, 12 et 19 jours suivant l'inoculation des *Pseudomonas*, 2 tubes par traitement (6 plantes) ont servi au dénombrement des populations bactériennes sur milieux semi-sélectifs. Le troisième tube a été

utilisé pour localiser les bactéries marquées au niveau des plantules de blé par microscopie confocale.

(iv) Enfin, une étude statistique (par un test du *Khi2*) visant à détecter les corrélations entre différentes variables qualitatives, à savoir l'origine des souches (incluant 3 modalités : fèces, environnement et viande hachée de bœuf), la présence des gènes *stx* (incluant 3 modalités : *stx1* et *stx2*, *stx1* ou *stx2*, *stx*⁻), l'appartenance à un cluster PFGE (incluant 3 modalités : C1, C2 et C3) et la résistance au Phl (incluant 2 modalités : sensible ou résistant à 256 µg ml⁻¹), a été réalisée.

3. Résultats et discussion

3.1. Analyse de la diversité d'une collection d'isolats d'*E. coli* O157:H7

L'analyse de la diversité de la collection d'isolats d'*E. coli* O157:H7 utilisée au cours de cette étude a indiqué que 23% des isolats portent les 2 gènes codant pour les Shiga-toxines Stx1 et Stx2, 56% ont soit *stx1* soit *stx2* et enfin 21% sont *stx*⁻. La répartition des différents profils de virulence en fonction de l'origine des souches montre que les souches isolées des fèces ont préférentiellement les gènes *stx1* et *stx2*. Au contraire, les isolats *stx1* ou *stx2* et ceux étant *stx*⁻ sont plus représentés dans les échantillons provenant de l'environnement ou de la viande hachée. A partir de l'analyse phylogénétique réalisée sur la base des profils PFGE obtenus pour les isolats *E. coli* O157:H7, 10 clades distinctes et 3 clusters (notés de C1 à C3) ont pu être identifiés à un degré de similarité de 88%. Chaque cluster regroupe des isolats provenant de diverses origines et présentant des profils de virulence variés. Notamment, le cluster C2 contient des isolats provenant à 50% de la viande hachée, à 37,5% de l'environnement et à 12,5% des fèces, et sont à 44% *stx1* ou *stx2*, à 31% *stx1* et *stx2* et à 25% *stx*⁻. En bref, une extrême diversité des isolats d'*E. coli* O157:H7 a été démontrée lors de cette première analyse.

3.2. Effet du Phl sur la croissance des isolats d'*E. coli* O157:H7

Nous avons observé que la croissance des 73 isolats d'*E. coli* O157:H7 est inhibée à une concentration en Phl de 512 µg ml⁻¹. Environ la moitié d'entre eux sont sensibles à une concentration de 256 µg ml⁻¹ et seulement 15 sont inhibés par une concentration ≤ 160 µg ml⁻¹. De manière similaire, Keel *et al.* (1992) ont obtenu une CMI en Phl de 500 µg ml⁻¹ pour des souches d'*E. coli* non pathogènes. Ces valeurs sont cependant bien supérieures aux concentrations que l'on pourrait retrouver dans la rhizosphère de plantes colonisées par *P. fluorescens* (de l'ordre de 2,4 µg par gramme de racines). En comparaison, les souches témoins de notre étude i.e.

Azospirillum brasilense Cd et *Pectobacterium carotovora* CFBP 2046 ont respectivement une CMI de 128 et 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

140

3.3. Effet de *P. fluorescens* F113 et F113G22 sur la croissance d'*E. coli* O157:H7 sur milieu gélosé

Afin de confirmer les précédents résultats, des essais de confrontations sur milieux gélosés entre les souches modèles de *P. fluorescens* et l'ensemble des isolats d'*E. coli* O157:H7 ont été effectués. La souche *P. fluorescens* F113 a un effet inhibiteur sur la plupart (97%) des isolats d'*E. coli* O157:H7, alors que son mutant F113G22 Phl⁻ n'a aucun effet. Cependant, l'inhibition d'*E. coli* O157:H7 par *P. fluorescens* F113 observée dans notre étude est de faible amplitude, allant de 0,5 à 2,5 mm, suggérant que le Phl n'a qu'une faible activité sur le pathogène. Par comparaison, la zone d'inhibition pour *A. brasilense* est de 6 mm.

150

3.4. Effet de *P. fluorescens* F113 et F113G22 sur la croissance d'*E. coli* O157:H7 sur des plantules de blé

Afin d'évaluer l'impact du Phl produit dans des conditions optimales (stimulation de la production par les exsudats de blé (Notz *et al.*, 2001)) par *P. fluorescens* F113, des essais de co-inoculation entre le pathogène et la PGPR ont été réalisés dans la rhizosphère de blé. La croissance et la survie des deux souches d'*E. coli* O157:H7 sensible et résistante au Phl sont similaires lorsqu'elles sont inoculées seules. Les souches *P. fluorescens* F113 et F113G22 retardent la colonisation des racines par *E. coli* O157:H7, sans différence notable entre la souche sauvage F113 et le mutant Phl⁻, F113G22. En effet, 5 jours après l'inoculation, le nombre de cellules d'*E. coli* O157:H7 39236 atteint respectivement $6,49 \pm 0,27$ et $6,09 \pm 0,9 \log_{10}$ UFC / système pour les traitements co-inoculés avec *P. fluorescens* F113 et F113G22 contre $7,76 \pm 0,03 \log_{10}$ UFC / système lorsque la souche *E. coli* O157:H7 39236 (souche sensible au Phl) est inoculée seule. Des résultats semblables ont été obtenus avec la souche A33-35 (souche résistante au Phl). Au temps T12 et T19 jours, les effectifs en *E. coli* O157:H7 sont identiques dans tous les traitements. Ces résultats montrent notamment que *P. fluorescens* n'est qu'un simple compétiteur d'*E. coli* O157:H7. Par ailleurs, les observations en microscopie confocale ont révélé que la présence de *P. fluorescens* n'affecte pas la colonisation de la plante par *E. coli* O157:H7. Les deux populations bactériennes sont visibles à la surface des racines, au niveau des poils, de leurs extrémités et

également sur les tiges. Contrairement à *P. fluorescens*, *E. coli* O157:H7 a également été localisée
à l'intérieur des racines jusqu'à une profondeur de 46 µm.

3.5. Relation entre la résistance au Phl et le profil de virulence, l'origine et le profil PFGE des 73 isolats d'*E. coli* O157:H7

Enfin, un dernier travail visant à corréler la résistance au Phl avec la diversité phénotypique et
génomique des isolats d'*E. coli* O157:H7 testés a été entrepris. Lors de cette étude, un isolat
présentant une CMI $\geq 256 \mu\text{g ml}^{-1}$ a été considéré comme résistant au Phl. Ainsi, les isolats issus
des fèces d'origines humaine et animale, ainsi que les isolats portant les gènes codant les 2 Shiga-
toxines sont significativement (respectivement, $P < 0,05$ et $P < 0,001$) plus résistants au Phl que les
autres isolats. L'hypothèse avancée pour expliquer ce constat serait une possible pression sélective
vis-à-vis du Phl ou d'un composé de la même famille (polycétone) dans le tube digestif des
ruminants, incitant les cellules à acquérir des gènes de résistance par transfert horizontal. De plus,
il serait intéressant de voir si l'acquisition de bactériophages portant les gènes codant les Shiga-
toxines faciliterait celle de gènes d'antibiorésistance (et réciproquement). Par ailleurs, l'analyse
phylogénétique des profils PFGE a révélé que les isolats appartenant au cluster C2 sont
significativement plus résistants que ceux des clusters C1 et C3, bien que ce cluster ne contienne
que 31% et 12,5% des isolats retrouvés dans les fèces et ayant les gènes codant pour les 2 Shiga-
toxines, respectivement.

4. Conclusion

Au vue de cette étude, *E. coli* O157:H7 est assez résistant au Phl, composé dont l'activité ne
devrait contribuer que très légèrement à l'inhibition de cet agent zoonotique dans le sol. Ainsi, *P.*
fluorescens est incapable de prévenir la croissance et la survie d'*E. coli* O157:H7 dans la
rhizosphère de blé. De plus, *E. coli* O157:H7 peut être internalisé à l'intérieur des racines jusqu'à
une profondeur de 46 µm, le protégeant de tout contact avec la flore compétitive indigène.

Effects of 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl) and of Phl-producing *Pseudomonas fluorescens*

F113 on contrasted strains of the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7

B. FREMAUX* ⁽¹⁾, C. PRIGENT-COMBARET ⁽²⁾, M.L. DELIGNETTE-MULLER ⁽¹⁾, P. PUJIC ⁽²⁾, Y. MOËNNE-LOCCOZ ⁽²⁾ and C. VERNOSY-ROZAND ⁽¹⁾

(1) Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 69280 Marcy l'Etoile, France

(2) Université de Lyon, Lyon, F-69003, France; Université Lyon 1, Lyon, F-69003, France; CNRS, UMR 5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, F-69622, France; IFR 41, Villeurbanne, F-69622, France

Keywords: Phl, *Pseudomonas fluorescens*, *E. coli* O157:H7, bacterial interaction, survival, root colonisation.

Running title: Phl and survival of *E. coli* O157:H7

* Corresponding author: Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 69280 Marcy l'Etoile, France. Phone : +33 4 78 87 25 53. Fax : +33 4 78 87 25 54. E-mail : b.fremaux@vet-lyon.fr

Abstract

Escherichia coli O157:H7 is a foodborne pathogen that can persist extensively in soil. Here, our objective was to assess whether 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl) and the Phl-producing soil bacterium *Pseudomonas fluorescens* F113 could affect survival of *E. coli* O157:H7. Among a collection of 73 *E. coli* O157:H7 isolates of diverse origins, all were inhibited by Phl on plate at concentrations higher than 128 µg ml⁻¹. On solid medium, F113 inhibited most of the isolates. In contrast, the Phl-mutant F113G22 did not inhibit any of the *E. coli* O157:H7 isolates. However, both F113 and F113G22 strains delayed colonization of wheat seedlings by *E. coli* O157:H7 strains. Microscopic observations showed that *P. fluorescens* F113 and F113G22 strains were exclusively found on the root surface, whereas *E. coli* O157:H7 strains were visualized on roots and within plant tissues. Diversity analysis of the *E. coli* O157:H7 collection indicated that Phl resistance was found in isolates that displayed *stx1*⁺ *stx2*⁺ virulence profile, originated from faeces, and/or belonged to one of three genomic groups based on PFGE analysis. Thus, despite differences in Phl resistance in *E. coli* O157:H7, Phl production by fluorescent pseudomonads is unlikely to be a significant factor determining survival of the foodborne pathogen in soil.

Introduction

Escherichia coli O157:H7 is an emerging foodborne human pathogen and is associated with either outbreaks or sporadic haemorrhagic colitis (HC) and haemolytic uraemic syndrome (HUS), especially in children and elderly persons (Riley *et al.*, 1983; O'Brien & Kaper, 1998). *E. coli* O157:H7 strains elaborate two potent phage-encoded cytotoxins called Shigatoxins (Stx1 and Stx2) (Karmali, 1989; Paton & Paton, 1998b). In addition to toxin production, another virulence-associated factor expressed by *E. coli* O157:H7 is a protein called intimin, which is responsible for attachment of *E. coli* O157:H7 to intestinal epithelial cells, causing attaching-and-effacing lesions in the intestinal mucosa (Jerse *et al.*, 1990). Intimin is encoded by the chromosomal gene *eae*, which is part of a pathogenicity island termed the locus for enterocyte effacement. Some *E. coli* O157:H7 strains produce another virulence factor, the enterohemolysin (Ehly), which is encoded by the gene *ehxA* (Schmidt *et al.*, 1995).

Ruminants are recognized as the principal reservoir of *E. coli* O157:H7, with prevalence rate ranging from 0.1% (in Spain; (Blanco *et al.*, 1996)) to 62 % (in Canada; (Jackson *et al.*, 1998)). Shedding of *E. coli* O157:H7 in cattle faeces and application of animal waste as soil fertilizers in agriculture contribute to environmental dissemination of this pathogen, which can then persist at least 99 days in soil (Bolton *et al.*, 1999; Gagliardi & Karns, 2002; Islam *et al.*, 2004). This persistence might be a significant factor for dissemination and contamination of humans and animals. A recent *E. coli* O157:H7 outbreak associated with soil contaminated by sheep faeces has been described (Team, 2000; Ogden *et al.*, 2002). Therefore, it is important to understand environmental factors controlling survival of *E. coli* O157:H7 in soil.

Both abiotic (temperature, pH, soil moisture or soil type) and biotic parameters (predation, competition and antagonism) affect the survival of faecal bacteria including *E. coli* in soil (Chandler & Craven, 1980; Recorbet *et al.*, 1992; Kerry, 2000). Jiang *et al.*, (2002) showed that the decline of *E. coli* O157:H7 was slower when manure-amended soil was autoclaved, pointing to the importance of biotic interactions with indigenous soil microorganisms. In addition, Cooley *et al.*, (2003) showed that lower CFU numbers of *E. coli* O157:H7 were recovered from *Arabidopsis* roots when it was inoculated in presence of the bacterial competitor *Enterobacter asburiae* rather than alone. Competitive and antagonistic interactions often involve the production of antimicrobial secondary metabolites, including antibiotics, bacteriocins and/or extracellular lytic enzymes, and iron chelators (Weller, 1988; Whipps, 1997). Antibiotic are produced by a wide range of soil and rhizosphere bacteria and fungi. In the soil environment, *E. coli* strains have been found abundant in certain plant rhizospheres (Trevisan *et al.*, 2002), i.e. in a microbial habitat where root exudates constitute a major source of carbon substrates (Hütsch *et al.*, 2002). The rhizosphere can also

harbor antibiotic-producing bacteria, but whether *E. coli* strains are sensitive to antibiotics produced by rhizobacteria is poorly documented.

Production of antibiotics by rhizosphere bacteria has been extensively documented in the case of 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl), which is synthesized by a diverse range of fluorescent *Pseudomonas* strains (Wang *et al.*, 2001). This polyketide has also antifungal properties against root and seedlings phytopathogens such as *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* or *Fusarium oxysporum* (Fenton *et al.*, 1992; Keel *et al.*, 1992; de Souza *et al.*, 2003). Phl-producing pseudomonads can protect plants from soil-borne fungal pathogens (Sharifi-Tehrani *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 2001) and they are involved in the disease-suppressive ability of certain soils (Weller *et al.*, 2002; Ramette *et al.*, 2003). However, Phl is also active against soil bacteria (Natsch *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 2003), including the phytopathogen *Erwinia* (now *Pectobacterium*) *carotovora* subsp. *atroseptica* (Cronin *et al.*, 1997). In addition, Phl may inhibit human pathogens such as *Enterobacter aerogenes* (Keel *et al.*, 1992), *Pseudomonas aeruginosa* (Keel *et al.*, 1992) and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (Isnansetyo *et al.*, 2001; Isnansetyo *et al.*, 2003).

The aim of the present study was to analyze the effect of synthetic Phl as well as the Phl-producing *P. fluorescens* F113 (and a Phl⁻ mutant) on the survival of a collection of 73 *E. coli* O157:H7 strains isolated from ground beef, human and bovine faeces, and environmental sources. Afterwards, the colonisation of wheat seedlings by two representative *E. coli* O157:H7 strains (one Phl-sensitive, the other Phl-resistant) was assessed in presence or absence of *P. fluorescens* F113 or its Phl⁻ mutant. Finally, potential relations were sought between Phl resistance of the 73 *E. coli* O157:H7 isolates and their virulence profile, habitat of origin and PFGE profile.

Materials and methods

Bacterial strains

Seventy three *E. coli* O157:H7 isolates of various origins and virulence profiles (Table 1) were used in this study. For pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis, the collection was completed with several reference *E. coli* strains, i.e. the North American *E. coli* O157:H7 strain EDL 933 (ATCC 43895), the two non-O157:H7 Shigatoxin-producing *E. coli* strains S1 and S2 (isolated from dairy cattle faeces, collection of the Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle (UMAP)) and four Shigatoxin-negative *E. coli* strains (the K12 derivatives MG1655 and MC4100, the O157 soil isolate E4, and the ground beef isolate E3, UMAP laboratory collection).

P. fluorescens strain F113, which originates from the rhizosphere of sugar beet (Shanahan *et al.*, 1992), was used as model of Phl-producing pseudomonad. Strain F113G22 is a Phl-negative

tel-00200118, version 1 - 20 Dec 2007

biosynthetic mutant of F113 (Fenton *et al.*, 1992; Shanahan *et al.*, 1992). The plant growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Cd (Eskew *et al.*, 1977) and the phytopathogen *Pectobacterium* (ex *Erwinia*) *carotovora* subsp. *carotovora* (CFBP 2046) (Hauben *et al.*, 1998) were used as Phl-sensitive controls in inhibition experiments.

Molecular characterization of *E. coli* O157:H7 isolates

All *E. coli* O157:H7 isolates were examined for the presence of the Shigatoxin genes *stx1* and *stx2* under the conditions described by Cebula *et al.*, (1995), as well as the virulence genes *eae* and *ehx*, as described by China *et al.*, (1996), and Paton & Paton, (1998a), respectively. Furthermore, each *E. coli* O157:H7 isolate was subject to molecular typing by PFGE using the method previously described by Fremaux *et al.*, (2006). PFGE Marker I (Promega, Madison, WI) and *E. coli* O157:H7 strain EDL 933 were included in each gel. Cluster analysis of PFGE profiles was performed using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA; with an error setting of 3%) and Dice coefficient (with a maximum position tolerance of 1%), and was carried out using the software GelCompar II version 4.2 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Growth inhibition test of *E. coli* O157:H7 isolates by *P. fluorescens* F113 and F113G22 on plates

The 73 *E. coli* O157:H7 isolates, *P. fluorescens* F113 and F113G22, and *A. brasilense* Cd were grown individually with shaking in flasks containing 20 ml of modified Luria Bertani (LBm) (i.e. LB (Sambrook *et al.*, 1989) with only 5 g l⁻¹ of NaCl) broth. For F113G22 strain, the medium also contained kanamycin at 10 µg ml⁻¹. *E. coli* O157:H7 isolates were incubated overnight at 37°C and the others for 48 h at 28°C. Each culture was centrifuged at 4000 *g* for 10 min and the pellet resuspended in Ringer solution (CaCl₂ 560 µM, KCl 1.4 mM, NaCl 19 µM, NaHCO₃ 300 µM), resulting in 2 x 10⁹ CFU ml⁻¹ for *P. fluorescens*, 10⁷ CFU ml⁻¹ for *E. coli* O157:H7 and 4 x 10⁷ CFU ml⁻¹ for *A. brasilense* Cd (estimated from OD_{600nm} measurements). For *E. coli* O157:H7 isolates and *A. brasilense* Cd, 2.5 ml of cell suspension was mixed with 2.5 ml of molten water agar (15 g.l⁻¹) and quickly poured onto modified LB plates. When the agar was solidified, 10 µl of *Pseudomonas* cell suspension was spotted onto the surface of each plate. The agar plates were incubated at 28°C for 48 h and inhibition was evaluated by measuring the width of the inhibition zone surrounding the *Pseudomonas* colony.

Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) for Phl

The effect of Phl against *E. coli* O157:H7 isolates was investigated using the reference growth inhibition bioassay described by the AntibioGram Committee of the Microbiology French Society (C.A.-S.F.M., 1993), as described below. Synthetic Phl (Toronto Research Chemicals Inc., North York, Canada) was dissolved in methanol at a concentration of 512 mg ml⁻¹ and serial two-fold dilutions were performed from 512 to 2 µg ml⁻¹. For the more Phl-sensitive isolates, intermediate concentrations were also tested. *E. coli* O157:H7 isolates were grown on blood sheep agar (bioMérieux, Craponne, France) for 24 h at 37 °C, and *A. brasilense* Cd and *P. carotovora* CFBP 2046 on LBm agar for 48 h at 28°C. The cells were suspended in Mueller Hinton (MH) broth (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and each suspension adjusted to 0.8 Mac Farland units using a densitometer (bioMérieux). A 10⁻² dilution was performed in MH broth and 400 µl placed in each well of a 21-well plate. A Steers replicator apparatus (Steers *et al.*, 1959) was then used to drop inoculate the bacteria onto MH plates containing Phl at the various concentrations (in duplicate). The plates were incubated during 24 h at 37°C for *E. coli* O157:H7 isolates and 48 h at 28°C for *P. carotovora* CFBP2046 and *A. brasilense* Cd.

360 **Autofluorescence labelling of *E. coli* O157:H7 and *P. fluorescens* strains**

The broad host-range vector pMP2444 (Bloemberg *et al.*, 2000) harbouring a P_{lac} -*egfp* gene fusion and a gentamycin resistance gene was introduced into *P. fluorescens* strains F113 and F113G22 by bi-parental mating, as follows. The S17-1 λ pir (pMP2444) *E. coli* donor cell (*recA endA thi pro hsdRM⁺ Ω RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7*) was mixed to *Pseudomonas* recipient cells on LB agar plates. After 16 h of incubation at 28°C, transconjugants were selected on King's B plates (King *et al.*, 1954) containing ampicillin 40 μ g ml⁻¹, chloramphenicol 13 μ g ml⁻¹ and gentamycin 25 μ g ml⁻¹ (i.e. King's B⁺⁺⁺ Gm). For labelling of *E. coli* O157:H7 isolates, a low-copy number vector coding a protein fusion with the DsRed Express protein and expressing a bright red fluorescence was constructed. The DsRed-Express encoding gene from pDsRed-Express (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) was amplified by PCR using primers DsRed-*Hind*III (CTCTCCAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGCAGGAACAGGTGGTGGCGGCCC) and DsRed-*Bam*HI (ATATCGGATCCGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAG), designed in this work. PCR amplifications were performed according to the *Taq* polymerase manufacturer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Each reaction tube contained 20 ng template DNA in 50 μ l. The amplification cycle consisted of an initial 5 min at 95°C, 35 cycles (30 s at 95°C, 30 s at 65°C, 45 s at 72°C), followed by a final 7 min extension at 72°C. The PCR product was then cloned using *Bam*HI and *Hind*III unique restriction sites into a derivative of the pQE60 vector (Qiagen) which contains the carbohydrate binding domain (CBD) of FAAL0616 gene from *Frankia alni*.

The resulting plasmid was named pQE60 *P_{lac}-DsRed-Express*. The CBD domain was first amplified by PCR using primers CBD-*NcoI* (GTGGTCCCATGGCACGACTGTCAATCCGTCTTG) and CBD-*BglIII* (TCGTTAGATCTGTGCCATCGCTGGTAATTT) designed in this work, using the same PCR conditions but with an annealing temperature of 56°C. The PCR fragment was cloned into pQE60 with *NcoI* and *BglIII* restriction enzymes. The pQE60 *P_{lac}-DsRed-Express* was introduced into Phl-resistant *E. coli* O157:H7 isolate A33-35 and the Phl-sensitive isolate 39236, according to Chung *et al.*, (1989). The labelled *E. coli* O157:H7 and *P. fluorescens* strains were used in wheat seedlings colonisation experiments (described below).

Effect of *P. fluorescens* F113 and its Phl⁻ mutant F113G22 on the survival of a Phl-sensitive and a Phl-resistant *E. coli* O157:H7 isolate on wheat seedlings

Wheat seeds cv. Fiorina were surface-sterilized under moderate vacuum by soaking in 50 ml 70 % (v/v) ethanol for 3 min, rinsing three times with sterile water (1 min per rinse), and subsequently treating the seeds with a sterile-filtered solution of 3 % (w/v) calcium hypochlorite and 0.1 % (w/v) SDS, for 30 min. Afterwards, seeds were rinsed three times with sterile water (1 min per rinse) and soaked in sterile-filtered 2 % (w/v) sodium thiosulfate solution. Finally, seeds were rinsed three times with sterile water, left in sterile water for another 30 min and germinated on water agar (15 g l⁻¹) for 48 h in the dark at 28 °C.

Before seedling inoculation, *P. fluorescens* F113 (pMP2444) and F113G22 (pMP2444) were grown in modified LBm broth at 28°C for 48 h with shaking. The two DsRed-labelled derivatives of the *E. coli* O157:H7 A33-35 (Phl-resistant) and 39236 (Phl-sensitive) strains were grown on BHI broth (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at 37°C for 24 h. *P. fluorescens* and *E. coli* O157:H7 cell suspensions were collected by centrifugation, gently washed and resuspended in 1 ml of Tryptone medium (Fluka, Buchs, Switzerland).

Plant experiments were done using an hydroponic system consisting of cotton-plugged glass tubes containing 20 ml of nitrogen-free Marvin-Prevel-Charpentier-Lavigne (MPCL) medium (Jofré, 1998) and three seedling deposited on a plastic grid. Each DsRed-labelled *E. coli* O157:H7 strain was inoculated alone or co-inoculated with the GFP-labelled *P. fluorescens* F113 or the GFP-labelled strain F113G22 (9 tubes per treatment). *P. fluorescens* and *E. coli* O157:H7 strains were inoculated (50 µl of an appropriate dilution) onto the three seedlings to yield a final concentration of 10⁶ and 10³ CFU per tube, respectively. *P. fluorescens* strains were inoculated 48 h before *E. coli* O157:H7 to favour strain establishment and Phl synthesis inside wheat microcosms. The tubes were incubated at 28°C in the dark. After 5, 12 and 19 days post-

inoculation of pseudomonads, two tubes from each treatment were used for enumeration of bacterial populations. Each entire wheat microcosm (i.e. MPCL medium and plant) was added to
 415 Tryptone medium (qsp 100 g) in a sterile bagfilter (Interscience, Saint Nom, France) and stomached for 30 s at medium speed. Appropriate dilutions were spread onto *E. coli* O157:H7 semi-selective cefixim-tellurite (bioMérieux, Craponne, France) Sorbitol Mac Conkey plates (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) supplemented with ampicillin 100 µg ml⁻¹, which were incubated at 37°C for 24 h, and onto *Pseudomonas* semi-selective King's B⁺⁺⁺ Gm plates, that were
 420 incubated at 28°C for 48 h. The third tube from each treatment was used to visualize bacteria using laser scanning confocal microscopy (LSCM). Additional tubes containing non-inoculated plants were used as negative controls.

Microscopic observations of bacterial colonisation of wheat seedlings by LSCM

425 Different parts of wheat plants (root apex, hair root zones, older root parts and shoots) were examined by LSCM after 5, 12 and 19 days post-inoculation of pseudomonads. Samples 1-2 cm in length were mounted in Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Eppelheim, Germany) and examined immediately using a 510 Meta LSCM microscope (Carl Zeiss S.A.S., Le Pecq, France) equipped with argon-krypton and HeNeon lasers, detectors and filter sets for green fluorescence (i.e. 488 nm for
 430 excitation and 509-531 nm for detection) and for red fluorescence (i.e. 543 nm for excitation and 552-584 nm for detection). Confocal images were captured and overlaid into a single image using the LSM software release 3.5 (Carl Zeiss S.A.S.).

Statistical analysis

435 The descriptive statistics were conducted using the R software version 1.9.0 (Ihaka & Gentleman, 1996). The nominal variables studied were the origin (with three modalities: faeces, environment and ground beef), *stx* virulence profile (with three modalities: both *stx1* and *stx2*, either *stx1* or *stx2* and neither *stx1* nor *stx2*), PFGE cluster (with three modalities: C1, C2, C3) and Phl resistance (with two modalities: sensitive or resistant to 256 µg Phl ml⁻¹) of *E. coli* O157:H7 isolates. The
 440 Chi-squared test was used to compare distributions ($P < 0.05$).

Results

Diversity analysis of the *E. coli* O157:H7 collection

A collection of 73 *E. coli* O157:H7 isolates was assembled to assess sensibility to synthetic Phl and
 445 Phl-producing *P. fluorescens* F113. Diversity analysis indicated that all *E. coli* O157:H7 isolates harbored the intimin gene *eae* and the enterohemolysin gene *ehx*, based on PCR data (Table 1). In

contrast, 23% isolates carried the two Shigatoxin genes *stx1* and *stx2*, 56% displayed either *stx1* or *stx2*, and 21% were *stx*⁻ (i.e. neither *stx1* nor *stx2*).

When *E. coli* O157:H7 isolates were classified according to their habitat of origin, i.e. ground beef, faeces and environment (Table 1), it appeared that the distribution of the virulence profiles for the different origins of *E. coli* O157:H7 isolates were significantly different ($P < 0.01$). Indeed, the majority of *stx1*⁺ *stx2*⁺ isolates were recovered from faeces, whereas the isolates carrying either *stx1* or *stx2* and the *stx*⁻ isolates originated mainly from ground beef and environmental samples, respectively (Fig. 1).

PFGE of *Xba*I-digested genomic DNA gave 15 to 25 fragments (ranging from less than 50 kb to 700 kb) from each of 70 *E. coli* O157:H7 isolates, whereas *Xba*I digestion was not successful for the three others (B76, ENV143 and 267). The similarity level between PFGE patterns was higher than 76% (Fig. 2). As many as 36 different PFGE patterns were observed, meaning that the *E. coli* O157:H7 isolates were genetically very heterogeneous. Fourteen patterns (i.e. 14 strains) were represented by at least two isolates. At an arbitrary similarity level of 88%, the *E. coli* O157:H7 isolates were divided in 10 distinct clades, and three main clusters (i.e. each with more than 9 isolates) were identified (noted clusters C1 to C3; Fig. 3). The isolates in each cluster were obtained from various origins and displayed different virulence profiles. Isolates from cluster C1 and C3 were recovered mainly from ground beef (85%) and environment (90%), respectively, and carried mainly one *stx* gene (70% and 100%, respectively), whereas those from C2 displayed a more heterogeneous distribution in terms of habitat (50% from ground beef, 37.5% from environment and 12.5% from faeces) and virulence profile (44% either *stx1* or *stx2*, 31% carrying both *stx1* and *stx2*, and 25% no *stx* gene). Isolates carrying both *stx1* and *stx2* were absent in C3 and rare in C1.

In summary, the collection of 73 *E. coli* O157:H7 isolates displayed significant diversity.

Effect of Phl on growth of *E. coli* O157:H7 in vitro

The growth of all 73 *E. coli* O157:H7 isolates was inhibited by Phl at 512 µg ml⁻¹ (Table 1). For 15 isolates (i.e. 20%), growth was inhibited at a Phl concentration below 160 µg ml⁻¹, whereas the reference soil bacteria *A. brasilense* Cd and *P. carotovora* CFBP2046 displayed MIC of 128 and 64 µg ml⁻¹, respectively. Growth inhibition of 50% of the isolates required a Phl concentration of 256 µg ml⁻¹ (Fig. 3). Consequently, 256 µg ml⁻¹ was used as reference concentration to distinguish Phl-resistant *E. coli* O157:H7 isolates from less resistant isolates (hereafter termed sensitive).

Effect of *P. fluorescens* F113 and its Phl-negative mutant F113G22 on growth of *E. coli* O157:H7 *in vitro*

On plate, *P. fluorescens* F113 inhibited growth of all *E. coli* O157:H7 isolates but two (i.e. isolates 261 and 267), which are Phl-resistant and originate from municipal sewage treatment plants. However, growth inhibition was of small magnitude, with inhibition zone width ranging from 0.5 to 2.5 mm (Table 1), whereas a larger inhibition zone (about 6 mm) was observed for the control strain *A. brasilense* Cd. In contrast, the Phl-negative biosynthetic mutant F113G22 did not inhibit growth of any of the 73 isolates of *E. coli* O157:H7 or of *A. brasilense* Cd.

There was no apparent relation between Phl-resistance and inhibition of *E. coli* O157:H7 by the Phl-producing strain F113. Indeed, the fraction of isolates sensitive to F113 was 22% in the group of Phl-sensitive *E. coli* O157:H7 isolates (CMI below 256 $\mu\text{g ml}^{-1}$) versus 27% in the group of Phl-resistant isolates.

Effect of *P. fluorescens* F113 and its Phl-negative mutant F113G22 on the survival of Phl-sensitive and Phl-resistant *E. coli* O157:H7 isolates on wheat seedlings

The impact of F113 on the survival of *E. coli* O157:H7 was assessed using wheat seedlings, because Phl production by fluorescent *Pseudomonas* occurs primarily on roots (Notz *et al.*, 2001). When inoculated alone, the Phl-resistant *E. coli* O157:H7 strain A33-35 and the Phl-sensitive strain 39236 grew similarly (Fig. 4). Strain F113 delayed colonization of wheat seedlings by *E. coli* O157:H7 strains. However, the effect of the Phl-negative mutant F113G22 was comparable to that of the wild-type strain. Indeed, at 5 days, the *E. coli* O157:H7 39236 strain reached 6.49 ± 0.27 and $6.09 \pm 0.09 \log_{10}$ CFU per tube when coinoculated with *P. fluorescens* F113 and F113G22, respectively, and $7.76 \pm 0.03 \log_{10}$ CFU per tube when inoculated alone. Similar results were obtained with strain A33-35. At 12 and 19 days, *E. coli* O157:H7 cell numbers were similar in all treatments.

Using confocal microscopy, fluorescent derivatives of both *P. fluorescens* and *E. coli* O157:H7 isolates were found as single cells as well as micro-colonies, all over plant roots, i.e. in the root hair zone, on root apex and stems (Fig. 5). The presence of *P. fluorescens* F113 or F113G22 did not affect qualitative colonisation patterns of wheat seedlings by *E. coli* O157:H7 isolates. Unlike *P. fluorescens*, the pathogen was also visualized at depths of up to 46 μm below the surface of plant tissues, suggesting migration to internal locations within roots (Fig. 6).

Relation between Phl resistance and virulence profile, habitat of origin and PFGE profile for the 73 *E. coli* O157:H7 isolates

Resistance of *E. coli* O157:H7 isolates to Phl (256 µg Phl ml⁻¹) varied ($P < 0.05$) according to the habitat of origin (Fig. 7A). Indeed, the faeces isolates were more often Phl resistant than the others.

Phl resistance of *E. coli* O157:H7 isolates depended also on virulence profile ($P < 0.001$). Noticeably, the *stx1*⁺ *stx2*⁺ isolates were associated to a higher level of Phl resistance compared with isolates carrying either *stx1* or *stx2* and *stx*⁻ isolates (Fig. 7B).

Finally, Phl resistance of *E. coli* O157:H7 isolates varied according to PFGE properties. The percentage of Phl-resistant isolates in cluster C2 (75 %) was higher ($P < 0.001$) than in clusters C1 and C3 (Fig. 7C). This result could not be explained by the fact that cluster C2 displayed more isolates recovered from faeces and/or that were *stx1*⁺ *stx2*⁺. Indeed, only 31% (i.e. 5 of 16) and 12.5% (2 of 16) of C2 isolates were respectively *stx1*⁺ *stx2*⁺ and recovered from faeces. In addition, the level of Phl resistance between closely-related isolates could differ. As illustrated in Table 1, isolate 36148 was inhibited by 160 µg Phl ml⁻¹ whereas isolate 36153 was able to grow until 512 µg Phl ml⁻¹, despite the fact that both isolates displayed the same PFGE pattern (Fig. 2).

Discussion

Recent results suggest that the rhizosphere might represent a significant reservoir for coliforms such as *E. coli* in grassland ecosystems (Trevisan *et al.*, 2002). Accordingly, the emerging pathogen *E. coli* O157:H7 was found to persist extensively in certain soils (Bolton *et al.*, 1999; Gagliardi & Karns, 2002; Islam *et al.*, 2004), and here *E. coli* O157:H7 effectively colonized wheat seedlings. In soil and especially the rhizosphere, *E. coli* O157:H7 is confronted to antibiotic-producing bacteria and the antibiotics the latter produce. A previous study evidenced that *P. fluorescens* isolates could inhibit *E. coli* O157:H7 growth in vitro, but the antibiotic(s) involved were not identified (Johannessen *et al.*, 2005). This prompted an assessment of the ability of Phl and of Phl⁺ biocontrol *P. fluorescens* strains (such as F113) to affect survival of *E. coli* O157:H7. Whereas Phl can inhibit a wide range of fungi and bacteria, Phl⁺ *P. fluorescens* strains are common inhabitants of the rhizosphere of a wide range of crops (Keel *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2001) and are effective rhizosphere antagonists (Rezzonico *et al.*, 2007).

First, Phl MIC were determined for a diverse range of *E. coli* O157:H7 isolates. Indeed, genetic diversity was indicated by the fact that the 73 isolates yielded as many as 36 different PFGE patterns. Diversity was even found among isolates from a same origin (e.g. from a same beef factory), and similar findings have been made on other occasions, for instance inside a same farm (Liebana *et al.*, 2003). In this context, it is important to note that all 73 *E. coli* O157:H7 isolates

were successfully inhibited by synthetic Phl, but with MIC values of 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ or higher. Similarly, (Keel *et al.*, 1992) measured a MIC value of 500 $\mu\text{g Phl ml}^{-1}$ for non-pathogenic *E. coli*. In comparison, several bacterial taxa are more sensitive to Phl, with MIC value lower than 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lividans*, *Staphylococcus aureus* or *Enterococcus* spp. (Keel *et al.*, 1992; Isnansetyo *et al.*, 2003). Other bacteria e.g. certain fluorescent pseudomonads (Moenne-Loccoz *et al.*, 2001) display Phl sensitivity levels similar to those of *E. coli* O157:H7, whereas *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* are resistant to Phl, with MIC values superior to 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Keel *et al.*, 1992). Therefore, it appears that *E. coli* O157:H7 strains are sensitive to Phl, but their sensitivity is not as high as that of certain bacterial taxa. Furthermore, the MIC values for *E. coli* O157:H7 isolates are superior to Phl levels recorded so far in the rhizosphere of *Pseudomonas*-inoculated plants (in the order of 2.4 $\mu\text{g per g}$ of root or per 4×10^8 CFU of Phl-producing pseudomonads) (Bonsall *et al.*, 1997; Raaijmakers *et al.*, 1999).

Second, we showed that Phl-producing *P. fluorescens* F113 had an inhibitory effect on most (97%) *E. coli* O157:H7 isolates on plate, whereas its Phl-negative biosynthetic mutant F113G22 had no effect at all on any of the isolates. Strain F113 could produce other antimicrobial factors, such as hydrogen cyanide, siderophore(s) and extracellular protease(s) (Wang *et al.*, 2001), but (i) F113G22 is a *phl*⁻ mutant unaffected in their productions and (ii) the antagonistic properties of strain F113 rely on Phl production (Shanahan *et al.*, 1992). However, the inhibition of *E. coli* O157:H7 by *P. fluorescens* F113 observed in our study was of small magnitude and suggests that Phl is poorly active against *E. coli* O157:H7 (only at concentrations higher than 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$). In contrary, (Shanahan *et al.*, 1992) showed that *E. coli* SM10 was markedly inhibited by *P. fluorescens*, but that strain is not a O157:H7 pathogen.

Third, *P. fluorescens* F113 delayed colonization of wheat by *E. coli* O157:H7, but (i) final cell numbers at the end of the 19-day experiment were not affected, and (ii) the *phl*⁻ mutant F113G22 had the same effect than the wild-type. Therefore, under experimental conditions which maximized potential antagonistic effects of the pseudomonad (Notz *et al.*, 2001), it appears that Phl did not play a significant role and that *P. fluorescens* F113 was only a weak competitor of *E. coli* O157:H7. This findings are reminiscent of short-term competitive effects previously documented for *Enterobacter asburiae* on roots of *Arabidopsis* and lettuce (Cooley *et al.*, 2003; Cooley *et al.*, 2006). LSCM visualization of inoculated wheat revealed that *E. coli* O157:H7 was present at the root surface and at subsurface locations, confirming previous results with lettuce (Solomon *et al.*, 2002) and *A. thaliana* (Cooley *et al.*, 2003). Various routes of entry exist for bacteria, especially areas of emergence of lateral roots, or root damages (Quadt-Hallman *et al.*, 1997). (Solomon & Matthews, 2005) suggested that the entry of O157:H7 into lettuce plants may be a passive event,

not mediated by specific bacterial factors but rather governed by the plant. In the current work, the root colonization pattern of O157:H7 isolates was the same in all treatments, i.e. regardless of whether a *P. fluorescens* strain was present. As consequence of their subsurface location, many *E. coli* O157:H7 cells were inaccessible for antagonistic or competitive bacteria such as root surface-colonizing *P. fluorescens* F113, which may favour survival of the pathogen. However, competitive effects of strains F113 and F113G22 towards Phl-sensitive *E. coli* O157:H7 isolate were also evidenced in sterile soil microcosms, and there again the impacts of F113 and F113G22 were similar (data not shown).

Therefore, it appears that the level of Phl resistance varied from one O157:H7 isolate to the next, but that Phl production by fluorescent pseudomonads was unlikely to be a significant factor determining survival and selection of the foodborne pathogen in soil ecosystems. A further assessment of the significance of Phl resistance in these bacteria was done by considering the diversity of the *E. coli* O157:H7 isolates. Indeed, isolates that displayed *stx1*⁺ *stx2*⁺ virulence profile, that originated from faeces isolates, and/or that belonged to one of three PFGE clusters were more resistant to Phl compared with isolates not displaying these properties. The physiological properties involved in enhanced resistance of bacteria to Phl are not known. In Phl producers, which are highly resistant to Phl, it is possible that the *phlE*-encoded permease protects the cell from Phl by functioning as an efflux pump (Abbas *et al.*, 2004). Whether this gene can be transferred to fellow γ -Proteobacteria such as *E. coli* O157:H7 has not been assessed. Conditions in the rumen fluid of cattle are favorable for the transfer of antibiotic-resistance plasmids to *E. coli* O157:H7 (Mizan *et al.*, 2002) and it is known that horizontal transfer of antibiotic-resistance genes has wider significance when antibiotics are present inside the intestinal tract (Sorum & Sunde, 2001). In this context, it is important to consider that many faeces isolates were *stx1*⁺ *stx2*⁺, a virulence profile that correlates with enhanced Phl resistance. Both *stx1* and *stx2* are phage-encoded, and it will be of interest to determine whether phage infection can lead to transduction of Phl-resistance gene and/or facilitate subsequent horizontal transfer of antibiotic-resistance genes.

There was no obvious link between the PFGE pattern of O157:H7 isolates and their MIC for Phl, and some isolates sharing an identical PFGE pattern did not display the same level of Phl resistance. Nevertheless, all *E. coli* O157:H7 isolates belonging to cluster C2 displayed high resistance to Phl. Only 31% and 12.5% of *E. coli* O157:H7 isolates from that cluster were *stx1*⁺ *stx2*⁺ and/or were recovered from faeces, two characteristics in correlation with Phl resistance. Consequently, genotypic features unrelated to the virulence profile and the habitat of origin must account for Phl resistance in isolates from cluster C2.

In conclusion, this study establishes that *E. coli* O157:H7 isolates of contrasted origins, virulence profiles and PFGE properties are rather resistant to Phl, and that this antibiotic is unlikely to contribute to growth inhibition of *E. coli* O157:H7 in natural soil. Despite the competitive effect of *P. fluorescens* on *E. coli* O157:H7, it is evident that *P. fluorescens* did not prevent the growth of *E. coli* O157:H7 on roots, where the pathogen may be able to survive.

Acknowledgments

This work was supported by funds from the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) and the GESSOL2 project PASTOR (Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable). We acknowledge the technical assistance provided by A. Beddiaf, C. Bavai (Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle) and M.A. Poirier (UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne). We also thank L. Jocteur-Monrozier (UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne) for useful discussions. We are grateful to F. O'Gara (BIOMERIT Center, National University of Ireland in Cork), C. Dorel and G. Condemine (UMR CNRS 5122, Adaptation et Pathogénie, Université Lyon 1) for gift of strains, G. V. Bloemberg (Leiden University, The Netherlands) for providing plasmids used in this work, and J.P. Flandrois (UMR CNRS 5558 Biométrie et Biologie Evolutive, Université Lyon 1) for lending of Steers replicator apparatus. We are also thankful to B. Burdin of the Centre Technologique des Microstructures (IFR 41, Lyon 1) for help with CLSM.

References

Abbas A, McGuire JE, Crowley D, Baysse C, Dow M & O'Gara F (2004) The putative permease PhIE of *Pseudomonas fluorescens* F113 has a role in 2,4-diacetylphloroglucinol resistance and in general stress tolerance. *Microbiol* **150**: 2443-2450.

Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Gonzalez EA, Mora A, Prado C, Fernandez L, Rio M, Ramos J & Alonso MP (1996) Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. *Epidemiol Infect* **117**: 251-257.

Bloemberg GV, Wijffjes AH, Lamers GE, Stuurman N & Lugtenberg BJ (2000) Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 1170-1173.

Bolton DJ, Byrne CM, Sheridan JJ, McDowell DA & Blair IS (1999) The survival characteristics of a non-toxigenic strain of *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol* **86**: 407-411.

Bonsall RF, Weller DM & Thomashow LS (1997) Quantification of 2,4 diacetylphloroglucinol produced by *fluorescent pseudomonas* spp. in vitro and in the rhizosphere of wheat. *Appl Environ Microbiol* **63**: 951-955.

C.A.-S.F.M. (1993) Recommandation n°2 du comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Méthode de détermination de la concentration minimale inhibitrice (C.M.I) en milieu solide pour les bactéries aérobies à croissance rapide. *Bull Soc Fr Microbiol* **8**: 156-161.

Cebula TA, Payne WL & 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. *J Clin Microbiol* **33**: 248-250.

Chandler DS & Craven JA (1980) Relationship of soil moisture to survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in soils. *Aust J Agric Res* **31**: 547-555.

China B, Pirson V & Mainil J (1996) Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3462-3465.

Chung CT, Niemela SL & Miller RH (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2172-2175.

Cooley MB, Miller WG & Mandrell RE (2003) Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4915-4926.

- 680 Cooley MB, Chao D & Mandrell RE (2006) *Escherichia coli* O157:H7 survival and growth on lettuce is altered by the presence of epiphytic bacteria. *J Food Prot* **69**: 2329-2335.
- Cronin D, Moënné- Loccoz Y, Fenton A, Dunne C, Dowling DN & O’Gara F (1997) Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* with the soft rot potato pathogen. *FEMS Microbiol Ecol* **23**: 685 95-106.
- De Souza JT, Arnould C, Deulvot C, Lemanceau P, Gianinazzi-Pearson V & Raaijmakers JM (2003) Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on *Pythium* : cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathology* **93**: 966-975.
- Eskew DL, Focht DD & Ting IP (1977) Nitrogen fixation, denitrification, and pleomorphic growth 690 in a highly pigmented *Spirillum lipoferum*. *Appl Environ Microbiol* **34**: 582-585.
- Fenton AM, Stephens PM, Crowley J, O’Callaghan M & O’Gara F (1992) Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl Environ Microbiol* **58**: 3873-3878.
- Fremaux B, Raynaud S, Beutin L & Vernozy-Rozand C (2006) Dissemination and persistence of 695 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Vet. Microbiol.* **117**: 180-191.
- Gagliardi JV & Karns JS (2002) Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on plant roots. *Environ Microbiol* **4**: 89-96.
- Hauben L, Moore ER, Vauterin L, Steenackers M, Mergaert J, Verdonck L & Swings J (1998) 700 Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst Appl Microbiol* **21**: 384-397.
- Hütsch BW, Augustin J & Merbach W (2002) Plant rhizodeposition - an important source for carbon turnover in soils. *J Plant Nutrit Soil Sci* **165**: 397-407.
- Ihaka R & Gentleman R (1996) R: a language for data analysis and graphics. *Journal of* 705 *Computational and Graphical Statistics* **5**: 299-314.
- Islam M, Doyle MP, Phatak SC, Millner P & Jiang X (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. *J Food Prot* **67**: 1365-1370.
- Isnansetyo A, Horikawa M & Kamei Y (2001) In vitro anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a 710 marine alga. *J Antimicrob Chemother* **47**: 724-725.

Isnansetyo A, Cui L, Hiramatsu K & Kamei Y (2003) Antibacterial activity of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga, against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* **22**: 545-547.

715 Jackson SG, Goodbrand RB, Johnson RP, Odorico VG, Alves D, Rahn K, Wilson JB, Welch MK & Khakhria R (1998) *Escherichia coli* O157:H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. *Epidemiol Infect* **120**: 17-20.

Jerse AE, Yu J, Tall BD & Kaper JB (1990) A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7839-7843.

720 Jiang X, Morgan J & Doyle MP (2002) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2605-2609.

Jofré E, Rivarola, V., Balegno, H. and G. Mori (1998) Differential gene expression in *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress. *Can J Microbiol* **44**: 929-936.

725 Johannessen GS, Bengtsson GB, Heier BT, Bredholt S, Wasteson Y & Rorvik LM (2005) Potential uptake of *Escherichia coli* O157:H7 from organic manure into crisphead lettuce. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2221-2225.

Karmali MA (1989) Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **2**: 5-38.

730 Keel C, Weller DM, Natsch A, Defago G, Cook RJ & Thomashow LS (1996) Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Appl Environ Microbiol* **62**: 552-563.

Keel C, Schnider U, Maurhofer M, Voisard C, Laville J, Burger U, Wirthner P, Haas D & Défago G (1992) Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol Plant-Microbe Interact* **5**: 4-13.

735 Kerry BR (2000) Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annu Rev Phytopathol* **38**: 423-441.

King EO, Ward MK & Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* **44**: 301-307.

740 Liebana E, Smith RP, Lindsay E, McLaren I, Cassar C, Clifton-Hadley FA & Paiba GA (2003) Genetic diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates from bovines living on farms in England and Wales. *J Clin Microbiol* **41**: 3857-3860.

Mizan S, Lee MD, Harmon BG, Tkalcic S & Maurer JJ (2002) Acquisition of antibiotic resistance plasmids by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 within rumen fluid. *J Food Prot* **65**: 1038-1040.

Moenne-Loccoz Y, Tichy HV, O'Donnell A, Simon R & O'Gara F (2001) Impact of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 on intraspecific diversity of resident culturable fluorescent pseudomonads associated with the roots of field-grown sugar beet seedlings. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3418-3425.

750 Natsch A, Keel C, Hebecker N, Laasik E & Défago G (1998) Impact of *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and a derivative with improved biocontrol activity on the culturable resident bacterial community on cucumber roots. *FEMS Microbiol Ecol* **27**: 365-380.

Notz R, Maurhofer M, Schnider-Keel U, Duffy B, Haas D & Défago G (2001) Biotic factors affecting expression of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis gene *phlA* in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 in the rhizosphere. *Phytopathology* **91**: 873-881.

755 O'Brien AD & Kaper JB (1998) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday, today and tomorrow, In J. B. Kaper and A. D. O'Brien(ed.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.

Ogden ID, Hepburn NF, MacRae M, Strachan NJ, Fenlon DR, Rusbridge SM & Pennington TH
760 (2002) Long-term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp. *Lett Appl Microbiol* **34**: 100-104.

Paton AW & Paton JC (1998a) Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol* **36**: 598-602.

765 Paton JC & Paton AW (1998b) Pathogenesis and diagnosis of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* **11**: 450-479.

Quadt-Hallman A, Hallman J & Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant associated bacteria. *Can J Microbiol* **43**: 577-582.

Raaijmakers JM, Bonsall RF & Weller DM (1999) Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat.
770 *Phytopathology* **89**: 470-475.

Ramette A, Moëne-Loccoz Y & Défago G (2003) Prevalence of fluorescent pseudomonads producing antifungal phloroglucinols and/or hydrogen cyanide in soils naturally suppressive or conducive to tobacco black root rot. *FEMS Microbiol Ecol* **44**: 35-43.

775 Recorbet G, Steinberg C & Faurie G (1992) Survival in soil of genetically engineered *Escherichia coli* as related to inoculum density, predation and competition. *FEMS Microbiol Ecol* **101**: 251-260.

- Rezzonico F, Zala M, Keel C, Duffy B, Moënné-Loccoz Y & Defago G (2007) Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? *New Phytol* **173**: 861-872.
- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT et al. (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **308**: 681-685.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. United States, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt H, Beutin L & Karch H (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* **63**: 1055-1061.
- Shanahan P, O'Sullivan DJ, Simpson P, Glennon JD & O'Gara F (1992) Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl Environ Microbiol* **58**: 353-358.
- Sharifi-Tehrani A, M. Zala, A. Natsch, Y. Moenne-Loccoz & Defago. G (1998) Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. *Eur J Plant Pathol* **104**: 631-643.
- Solomon EB & Matthews KR (2005) Use of fluorescent microspheres as a tool to investigate bacterial interactions with growing plants. *J Food Prot* **68**: 870-873.
- Solomon EB, Potenski CJ & Matthews KR (2002) Effect of irrigation method on transmission to and persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. *J Food Prot* **65**: 673-676.
- Sorum H & Sunde M (2001) Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Vet Res* **32**: 227-241.
- Steers E, Foltz EL, Graves BS & Riden J (1959) An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot Chem* **9**: 307-311.
- Team OC (2000) Report on the Outbreak of *E. coli* O157 at New Deer Millennium Scout Camp May/June 2000. *Gram-pian Health Board, UK*.
- Trevisan D, Vansteelant JY & Dorioz JM (2002) Survival and leaching of fecal bacteria after slurry spreading on mountain hay meadows: consequences for the management of water contamination risk. *Water Res* **36**: 275-283.
- Walsh UF, Morrissey JP & O'Gara F (2001) *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr Opin Biotechnol* **12**: 289-295.
- Walsh UF, Moënné-Loccoz Y, Tichy H-V, Gardner A, Corkery DM, Lohrke S & O'Gara F (2003) Residual impact of the biocontrol inoculant *Pseudomonas fluorescens* F113 on the resident population of rhizobia nodulating a red clover rotation crop. *Microbial Ecol* **45**: 145-155.

Wang C, Ramette A, Punjasamarnwong P, Zala M, Natsch A, Moënné-Loccoz Y & Défago G (2001) Cosmopolitan distribution of *phlD*-containing dicotyledonous crop-associated biocontrol pseudomonads of worldwide origin. *FEMS Microbiol Ecol* **37**: 105-116.

815 Weller DM (1988) Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **26**: 379-407.

Weller DM, Raaijmakers JM, Gardener BB & Thomashow LS (2002) Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **40**: 309-348.

820 Whipps JM (1997) Developments in the biological control of soil-borne pathogens. *Adv Bot Res* **26**: 1-133.

825

830

835

840 **Table 1.** F113 growth inhibition, Phl sensitivity, PFGE property and virulence profile of the 73 *E. coli* O157:H7 isolates used in the study.

Isolate	Origin	Growth inhibition by F113	MIC (µg ml ⁻¹)	PFGE cluster [*]	Virulence gene [†]		
					<i>stx</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
Ground beef isolates							
MKB	Factory F1 [‡]	++ [§]	512	C2	+	-	+
MK41242	Factory F1	++	512	C1	+	-	+
MK41242B	Factory F1	++	256	C1	+	-	+
05117A	Factory F1	++	160	C1	+	-	+
05117B	Factory F1	+	192	C1	+	-	+
05117C	Factory F1	++	160	C1	+	-	+
07065	Factory F1	++	160	C1	+	+	+
36148	Factory F1	+	160	C1	-	-	-
36151	Factory F1	++	160	C1	-	-	-
36153	Factory F1	+	512	C1	-	-	-
37006IDC	Factory F1	++	160	C1	+	-	+
37006IDC2	Factory F1	++	160	C1	+	-	+
39031C	Factory F1	++	192	C1	-	-	-
39071C	Factory F1	++	192	C1	+	-	+
39074C	Factory F1	++	160	C1	+	-	+
39086	Factory F1	+	512	C1	+	-	+
39236	Factory F1	++	160	C1	+	-	+
39239	Factory F1	++	192	C1	+	-	+
421971	Factory F1	++	128	C2	-	-	-
421972	Factory F1	+	512	C2	-	-	-
421975	Factory F1	++	224	C2	-	-	-
421976	Factory F1	+	512	C2	-	-	-
38214	Factory F1	++	512	C2	+	-	+
LS23	Factory F1	++	512	O	+	+	+
LS25	Factory F1	++	512	C2	+	+	-
435	Factory F1	++	512	O	+	+	+
448	Factory F1	++	512	O	+	+	+
LS2	Factory F2	++	512	O	+	+	+
LS27	Factory F2	++	512	O	+	+	+
LS28	Factory F2	++	512	O	+	+	+
LS30	Factory F2	++	512	C2	+	+	+
LS240	Factory F2	+	256	O	-	-	-
Environmental isolates							
B26	Slaughterhouse F3	++	512	C2	+	-	+
B68	Slaughterhouse F3	++	256	O	+	-	+
B76	Slaughterhouse F3	++	224	-	-	-	-
B77	Slaughterhouse F3	++	224	C1	-	-	-
B177	Slaughterhouse F3	++	256	C3	+	-	+

B178	Slaughterhouse F3	++	256	O	+	-	+
B182	Slaughterhouse F3	++	512	O	+	-	+
B183	Slaughterhouse F3	++	512	C3	+	-	+
B184	Slaughterhouse F3	++	512	O	+	-	-
B188	Slaughterhouse F3	++	512	C2	+	-	+
B195	Slaughterhouse F3	++	512	O	+	-	+
ENV143	STEP S1 [¶]	+	512	-	+	-	+
ENV166	STEP S1	+	512	O	+	-	+
ENV174	STEP S1	++	192	C3	+	-	+
ENV177	STEP S1	++	160	C3	+	-	+
ENV178	STEP S1	+	192	C3	+	-	+
ENV180	STEP S1	+	192	C3	+	-	+
ENV181	STEP S1	++	160	C3	+	-	+
ENV184	STEP S1	++	160	C3	+	-	+
ENV185	STEP S1	++	160	C3	+	-	+
E26SM1-1	STEP S1	++	512	C2	+	+	+
267	STEP S2	0	512	-	-	-	-
261	STEP S2	0	512	O	-	-	-
FCH6	STEP S3	+	512	C2	+	+	+
FVLA	STEP S3	+	512	C2	+	-	+
NFA	STEP S3	+	512	C2	+	-	+
6351B	Soil	+	256	C1	+	-	-
6352B	Soil	+	192	C1	+	-	-
Faeces isolates							
R33-9	Bovine faeces	+	512	O	+	-	+
R93-1	Bovine faeces	++	160	C3	+	-	+
A33-35	Bovine faeces	+	512	O	+	-	+
LS1	Human faeces	++	512	O	-	-	-
LS3	Human faeces	++	512	O	+	+	-
LS4	Human faeces	++	512	O	-	-	-
LS21	Human faeces	++	512	O	+	+	+
LS24	Human faeces	++	512	O	+	+	+
LS26	Human faeces	++	512	C2	+	+	+
LS29	Human faeces	++	512	C2	+	+	+
LS32	Human faeces	++	512	O	+	+	+
LS33	Human faeces	++	512	O	+	+	+
LS56	Human faeces	++	512	O	+	+	+

* Membership to main clusters C1, C2 and C3; O, PFGE pattern outside of main clusters; -, no PFGE pattern obtained.

[†] All isolates were *eae*⁺ *ehx*⁺

[‡] Beef factories F1, F2 and F3.

[§] 0, no growth inhibition by F113; +, inhibition zone from 0.5 to 1.5 mm; ++, inhibition zone ≥ 2 mm

[¶] STEP: effluent from municipal sewage treatment stations S1, S2, and S3.

Figure legends

Fig. 1. Distribution of *E. coli* O157:H7 virulence profiles according to the habitat of origin (white areas, *stx1* and *stx2*; shaded areas, *stx1* or *stx2*, black areas, *stx*-negative).

Fig. 2. Cluster analysis of 70 *E. coli* O157:H7 isolates based on UPGMA comparison of PFGE patterns. *E. coli* O157:H7 strain EDL 933, the non-O157:H7 Shigatoxin-producing *E. coli* strain S1, and Shigatoxin-negative *E. coli* strains MG1655, MC4100, E3 and E4 were included as reference. Three major clusters (C1 to C3) were arbitrarily defined at 88% similarity. * Phl sensitivity of *E. coli* O157:H7 isolates was indicated (+, Phl resistant isolates with MIC > 256 mg Phl ml⁻¹; blank, Phl sensitive isolates with MIC ≤ 256 mg Phl ml⁻¹).

Fig. 3. Effect of synthetic Phl on *E. coli* O157:H7 isolates (n = 73) in vitro. The frequency of *E. coli* O157:H7 isolates inhibited by synthetic Phl is indicated.

Fig. 4. Influence of *P. fluorescens* F113 (A, B) and F113G22 (C, D) on the survival of the Phl-resistant *E. coli* O157:H7 strain A33-35 (B, D, E) and the Phl-sensitive strain 39236 (A, C, F) in wheat microcosms. *P. fluorescens* strains were inoculated 48 h before *E. coli* O157:H7. *P. fluorescens* and *E. coli* O157:H7 strains were introduced at about 10⁶ and 10³ CFU per tube, respectively. Results (----: *E. coli* O157:H7; —: *P. fluorescens*) are expressed as mean of cell counts per tube.

Fig. 5. Colonization of wheat seedlings by the GFP-labelled *P. fluorescens* F113 strain and the DsRed- labelled *E. coli* O157:H7 A33-35 strain, based on CLSM image analysis, 10 days (A, B and D) and 18 days (C) post-inoculation of seedlings by *P. fluorescens*. Similar seedlings colonization patterns were observed between F113 and F113G22 and between A33-35 and 39236. Bacterial cells expressing GFP are green and those expressing DsRed are red, whereas white/grey backgrounds correspond to the plant root (A-C) or stem (D) images formed by the transmitted light. Bacterial colonization of a root apex (A), a lateral root (B), a primary root (C) and a stem (D) are shown. In C, a maximum-intensity X-projection was generated from a z-series of 33 optical sections using Zeiss LSM software 3.5. *rs*, root surface, *a* apex, *lrs* lateral root surface, *prs* primary root surface, *ss* stem surface.

Fig. 6. Colonization of the root surface by the GFP-labelled *P. fluorescens* F113 strain and the DsRed- labelled *E. coli* O157:H7 39236 strain, 7 days after inoculation of seedlings by *P. fluorescens*. Digital images of the x-projections (A) and of the sagittal section (B) of the root were generated from a z-series of 46 optical sections using Zeiss LSM software 3.5. The location of the sagittal section (z-projection) is materialised by a white line in A and the boundary of the root surface by a white curve in B. Bacterial cells expressing GFP are green and those expressing DsRed are red, whereas white/grey backgrounds correspond to the root image formed by the transmitted light. Unlike *P. fluorescens* F113, *E. coli* O157:H7 39236 was found on the root surface and within the root tissue. *rs*, root surface, *rh* root hair, *ir* inside root.

Fig. 7. Sensitivity of *E. coli* O157:H7 isolates to 256 µg Phl ml⁻¹ (the white areas correspond to resistant *E. coli* O157:H7 isolates and the black ones to sensitive *E. coli* O157:H7 isolates) according to their origin (A), virulence profile (B) and main PFGE cluster (C).

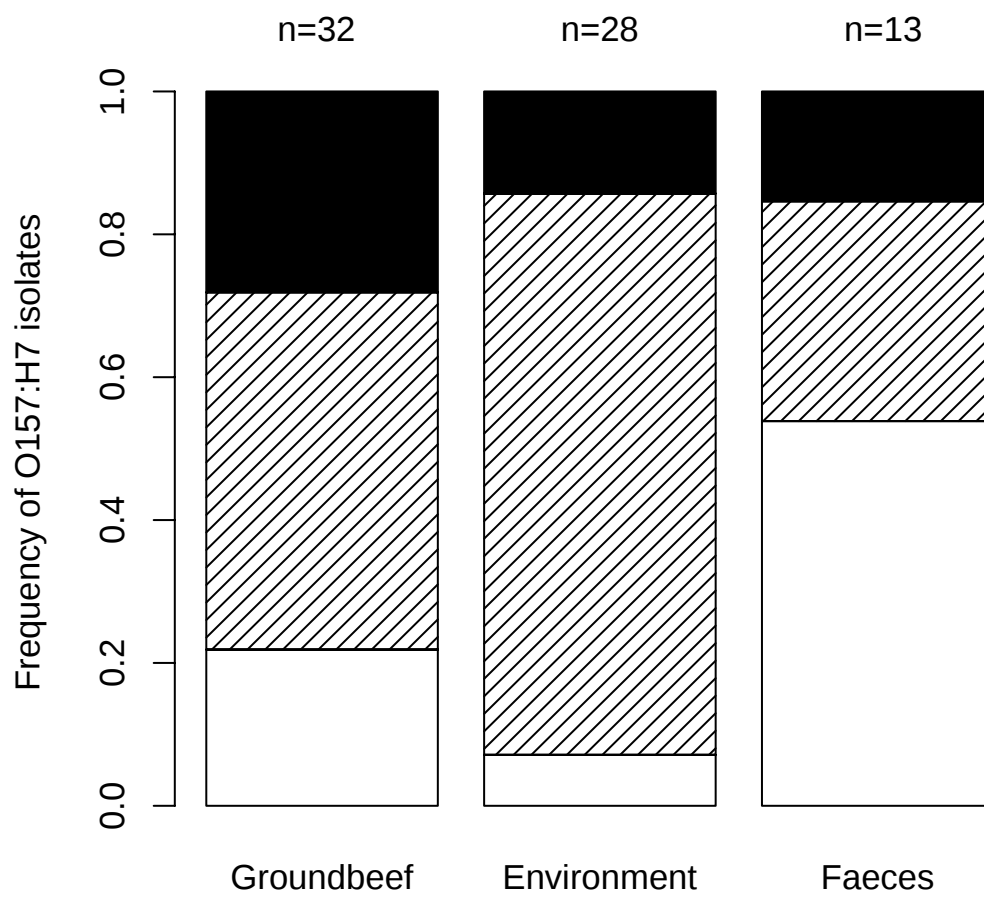


Fig. 1.

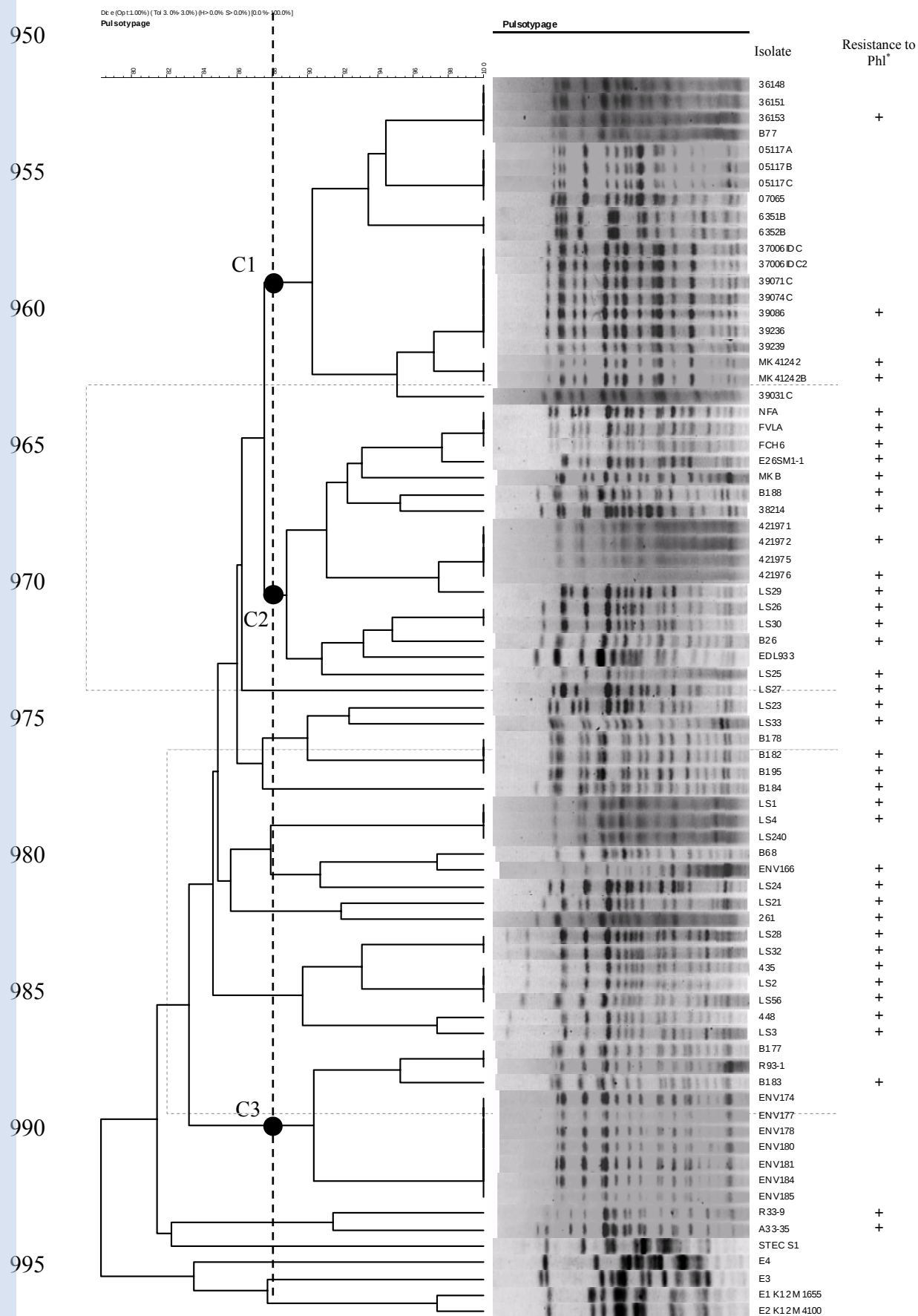
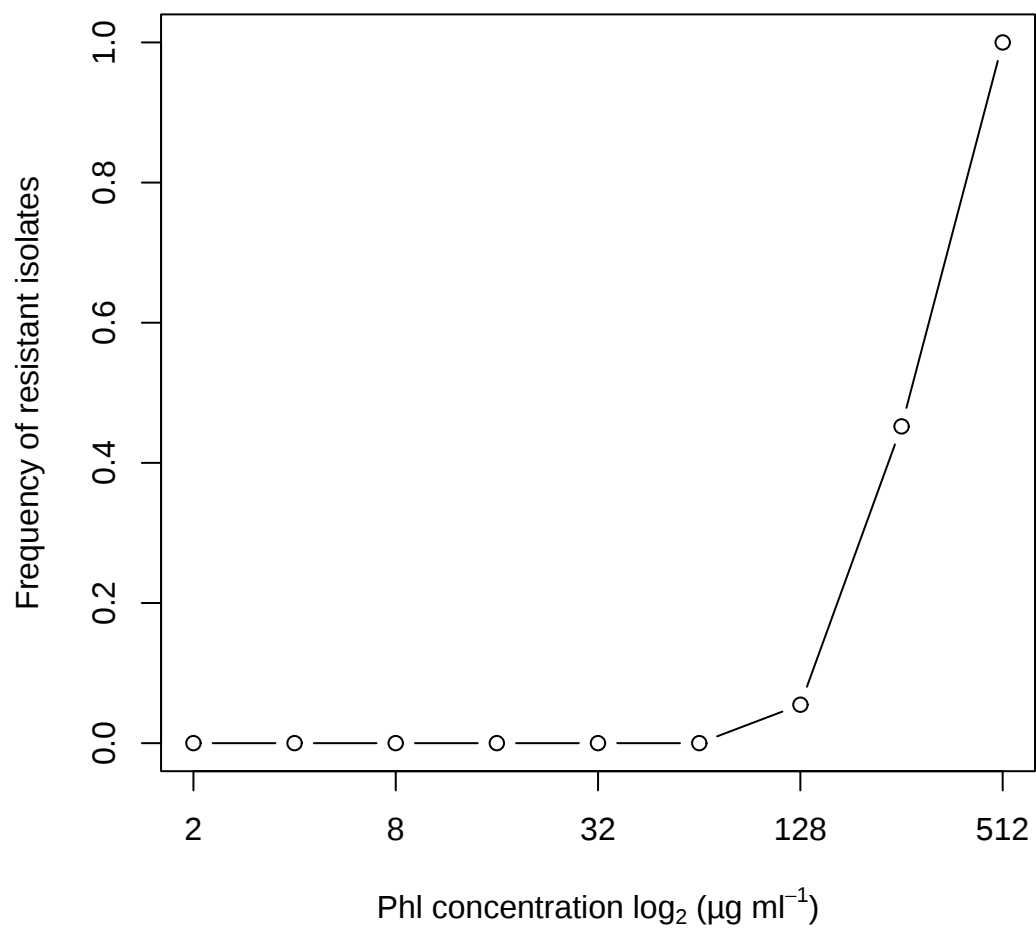
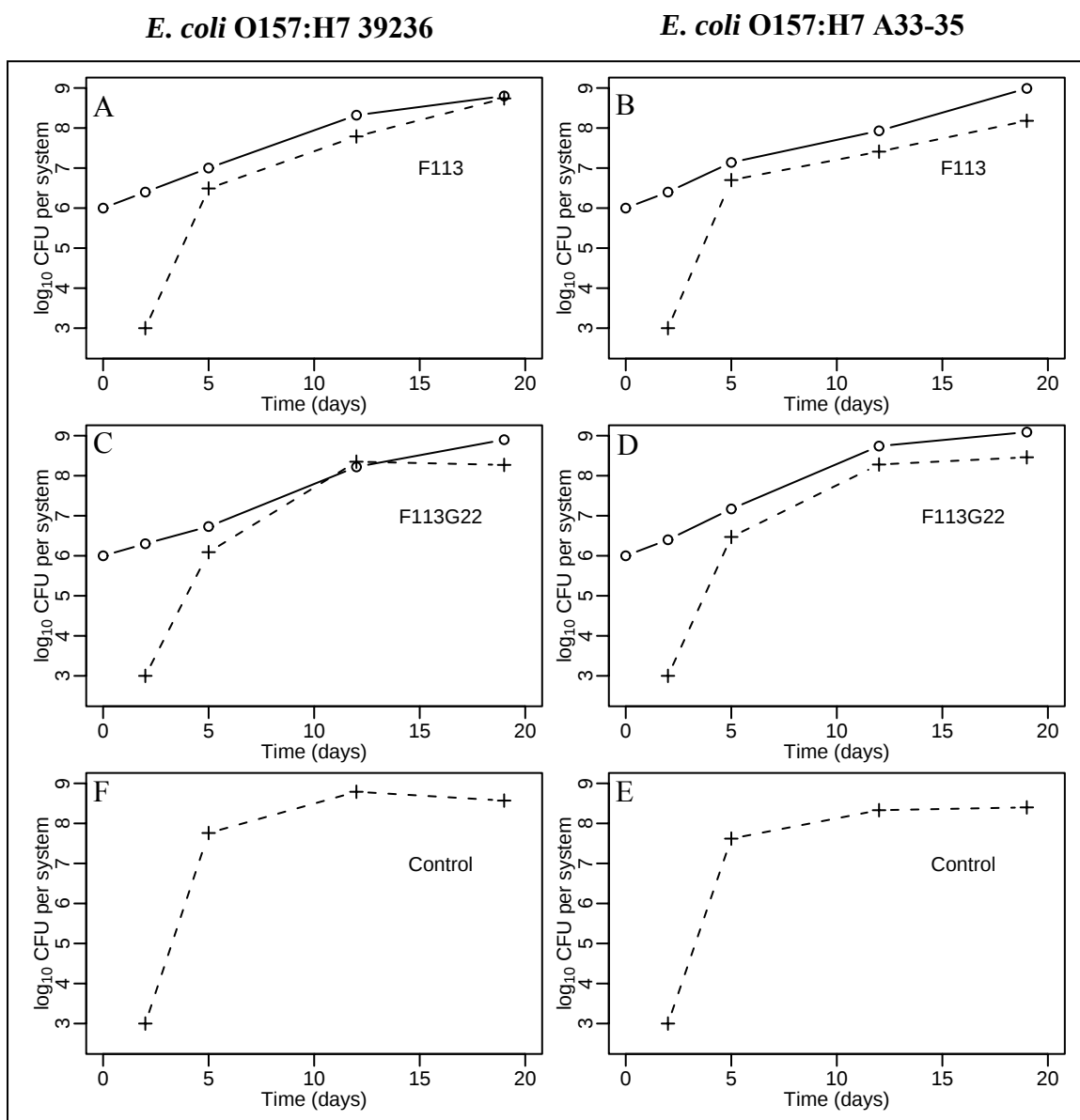


Fig. 2.

**Fig. 3.**

**Fig. 4.**

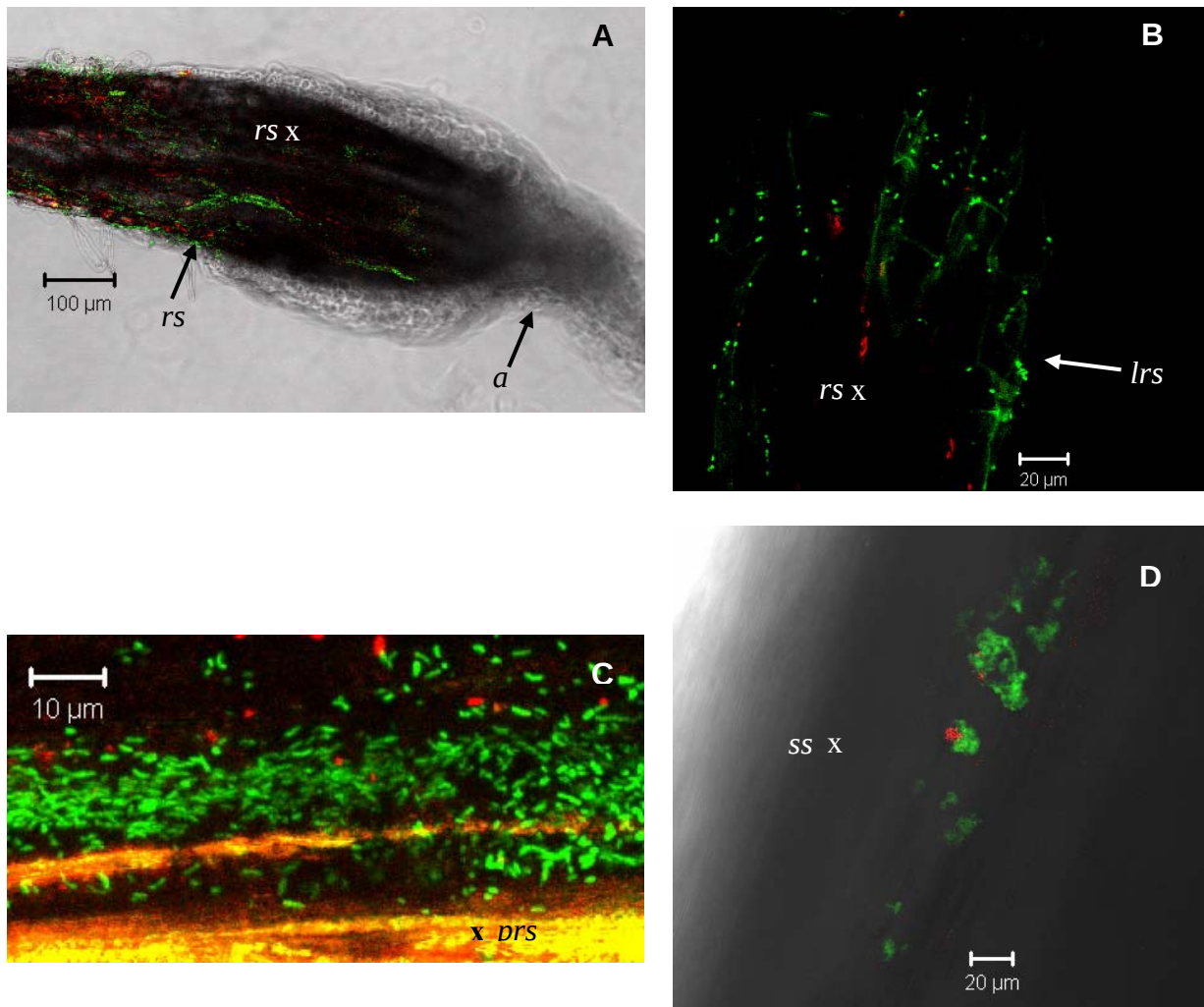


Fig. 5.

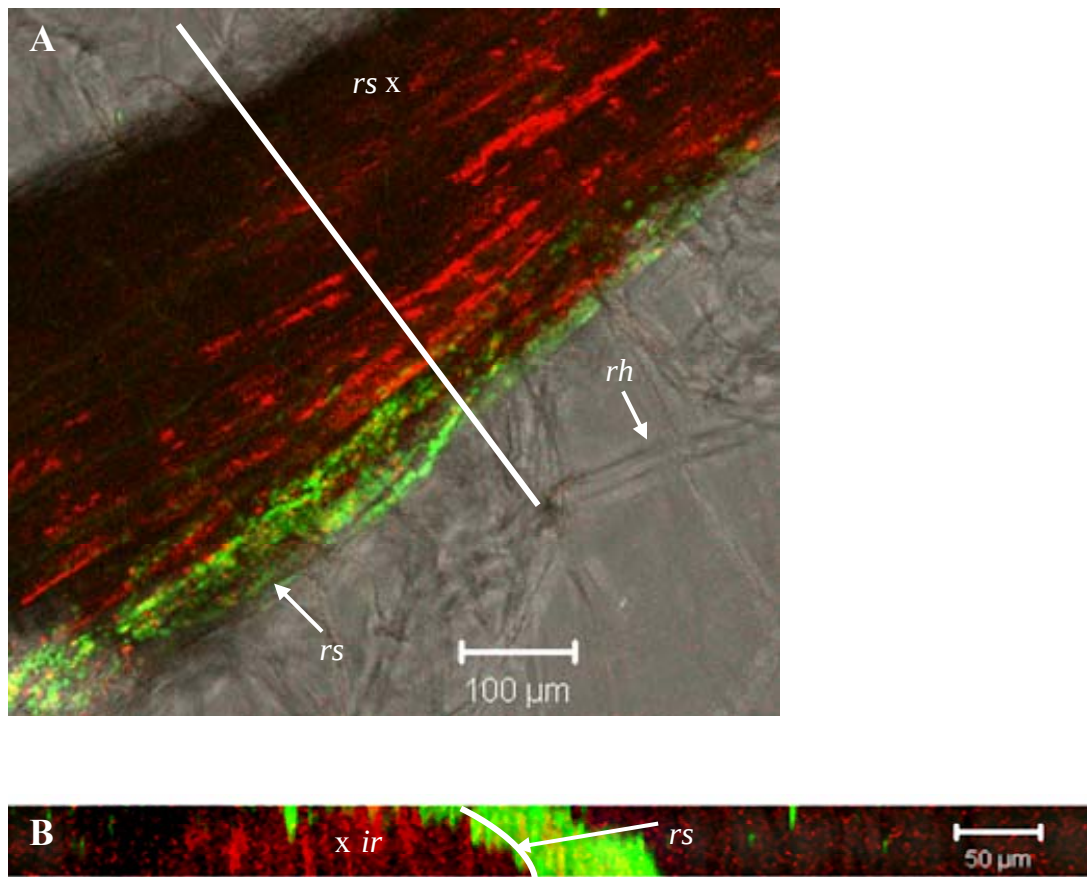


Fig. 6.

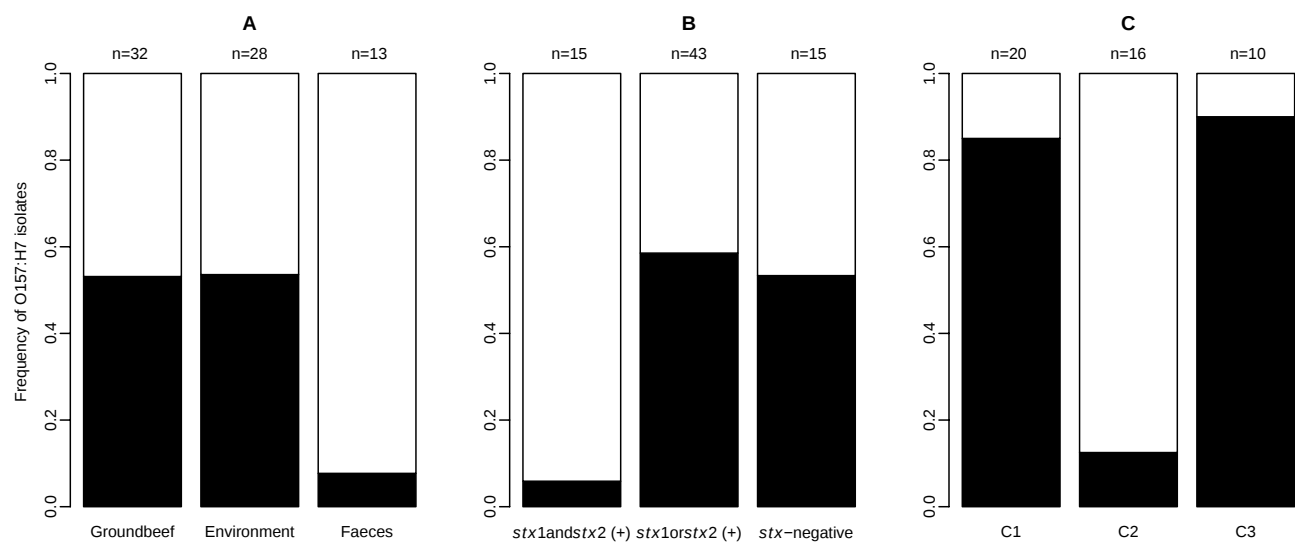


Fig. 7.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Cette partie sera consacrée à la discussion globale des résultats obtenus au cours de la thèse et surtout aux perspectives de recherche pouvant faire suite à ce travail.

1- Ecologie complexe des STEC dans les exploitations laitières.

Notre étude souligne une forte prévalence en STEC au sein des exploitations laitières testées. Une importante diversité des souches STEC isolées et la présence de clones persistants ont été mises en évidence. Certaines sont capables de coloniser divers supports présents dans les exploitations tels que les abreuvoirs, les murs, les mamelles ou encore les trayons. Ces substrats sont régulièrement souillés par la matière fécale des animaux ou par d'autres vecteurs tels que la salive, notamment lorsque le niveau de contamination en STEC est fort ou lorsque les mesures d'hygiène générale sont défectueuses. Ils constituent par la suite les véritables plaques tournantes de la circulation des STEC dans les élevages, qu'ils faudrait tarir. Des investigations supplémentaires devraient donc être menées afin d'estimer la part de chacun de ces substrats dans la contamination horizontale du troupeau par les STEC. Afin de répondre à cet objectif, des inoculations contrôlées de diverses matrices de l'exploitation avec des souches STEC marquées pourraient être effectuées. La dissémination horizontale de ces souches au sein du troupeau devrait ensuite être évaluée sur plusieurs mois.

Par ailleurs, ces résultats laissent suggérer un risque important de contamination du lait lors de la traite. Une étude parallèle à la notre a montré que 15% des échantillons de lait collectés étaient *stx*⁺, dont 8 ont permis l'isolement d'une souche STEC (Raynaud et Heuchel, 2005). Au vu de ces résultats, il semble important d'estimer la prévalence de la contamination par les STEC dans les fromages au lait cru et d'identifier en parallèle la diversité des souches présentes dans ces matrices. Ceci fait partie intégrante du plan de surveillance, financé par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche et par les industries laitières, actuellement en cours au laboratoire.

2- Survie des STEC dans les effluents d'élevages bovins

La présence d'animaux porteurs sains en STEC dans les exploitations rend indispensable le contrôle systématique des effluents épandus sur les sols, afin de limiter la dissémination environnementale de la bactérie. Les expérimentations ont révélé une persistance accrue de la bactérie dans du lisier et du fumier issus de bovins laitiers, atteignant environ 3 mois. Le retournement des tas lors du compostage du fumier peut cependant réduire de moitié le temps de survie des STEC. La température enregistrée au cœur des andains lors de la phase

thermophile du compostage, laquelle dépasse le plus souvent les 65°C, est létale pour les cellules STEC. Le fait de retourner les andains permet d'une part de relancer la phase thermophile du compostage mais également d'homogénéiser le processus à l'ensemble du tas.

On peut cependant reprocher à ces travaux d'avoir été réalisés en zones confinées, du fait du risque biologique encouru. Les tas de fumier et le lisier n'ont donc pas été exposés aux conditions environnementales, notamment aux radiations solaires (UV) ou aux fluctuations de températures qui auraient pu affecter négativement la survie des STEC dans le fumier et accentuer par conséquent le déclin des bactéries en surface des tas. Cependant, le fait qu'aucun réapprovisionnement en matière première (donc en éléments nutritifs et en bactéries (STEC)) n'ait été effectué lors de ces expérimentations, contrebalance l'effet inhibiteur des facteurs environnementaux sur la survie des STEC dans les effluents. Afin de mieux cerner ces 2 paramètres, la réalisation d'expérimentations *in situ*, par exemple dans des fermes expérimentales, permettrait d'estimer avec précision la survie des STEC dans les effluents. Ces études devraient être étendues aux sérogroupes à risque cités par l'avis de l'AFSSA (Saisine n° 2001-SA-0184 du 28 novembre 2001), et aux effluents provenant des autres filières.

En outre, ces travaux ont permis de dégager plusieurs points essentiels afin de maîtriser au mieux le risque STEC associé à la gestion des effluents. La première recommandation serait de ne pas épandre les effluents bovins en l'état sur les sols et de les stocker au minimum 3 mois après le dernier ajout de matières premières, sur des emplacements adaptés. La seconde préconiserait de retourner les andains ou de brasser le lisier afin d'assurer une homogénéisation des processus biologiques hygiénisants. D'autres expérimentations devraient être menées afin d'évaluer l'efficacité des traitements chimiques sur les effluents d'élevages bovins contaminés par des STEC. En effet, l'utilisation de la chaux ou de la cyanamide calcique a montré une bonne action hygiénisante des effluents d'élevages hors-sol. Les quantités nécessaires de chaux sont généralement de 30 kg/t pour un traitement d'effluents solides et de 7 kg/m³ pour des effluents liquides avec des durées moyennes de traitement de 7 jours (Heinonen *et al.*, 2006). Il serait donc intéressant de valider des couples concentration-durée d'exposition permettant d'assainir différents types d'effluents contaminés en STEC. Cependant, leur utilisation reste encore controversée du fait des risques potentiels pour la santé et l'environnement. De plus, le coût élevé généré par ce type de traitement freine leur utilisation dans les exploitations bovines possédant généralement une surface agricole suffisante pour permettre l'épandage des effluents.

3- Persistance et transfert des STEC dans l'environnement

Il est d'autant plus important de traiter les effluents que les STEC se montrent extrêmement résistants dans l'environnement. En conditions *in vitro*, les temps de survie des STEC O26 dans la plupart des sols testés atteignent plus de 1 an. Certains facteurs, tels qu'une basse température, la présence d'argile et probablement un taux élevé de matière organique, contribuent à la persistance des STEC O26 dans les sols. Au contraire, un pH élevé semble accélérer le déclin de la bactérie. Comme pour les effluents, il serait intéressant de confirmer ces résultats en conditions *in situ*, par exemple après épandage d'effluents bovins, contaminés en STEC de divers sérogroupes, sur les sols. Une autre perspective de travail serait d'évaluer l'impact des saisons et des aléas climatiques associés, sur la survie des STEC dans cet écosystème. De telles expérimentations ont déjà été réalisées dans le cas de populations non pathogènes d'*E. coli* par Vansteelant (2004), lequel a évalué la dynamique de ces populations suite à l'épandage de matières organiques sur des prairies de montagne. Ces travaux pourraient constituer un support intéressant pour la mise en oeuvre d'expérimentations similaires dans le cadre de populations d'*E. coli* pathogènes.

Dans un contexte bien différent, les expérimentations menées *in situ* dans un bassin versant pâturé par des ruminants et situé à plus de 1400 m d'altitude, montrent que dans les déjections des bovins, les STEC sont capables de survivre pendant plus de 2 mois malgré les conditions extrêmes rencontrées sur le bassin. Cette persistance contribue à leur transfert régulier dans les sols à des profondeurs d'au moins 20 cm. La rapide disparition des STEC dans les sols dès la complète dégradation de la matière fécale résulte probablement des phénomènes de mortalité et/ou de leur mobilisation par les eaux de percolation puis de leur redistribution à travers le flux hydrique du bassin. Il serait donc intéressant de réaliser un suivi plus précis des cellules STEC introduites dans les différents compartiments environnementaux afin de confirmer cette hypothèse. Ainsi, l'utilisation d'un lysimètre serait idéale pour estimer le nombre de cellules qui sont réellement mobilisées par les eaux de ruissellement et/ou de percolation. Par ailleurs, les données obtenues à partir de cette étude ont montré une prévalence élevée des STEC dans les eaux collectées à l'exutoire du bassin qui ont permis lors de deux collectes, l'isolement de souches STEC viables. La question de la qualité microbiologique de l'eau est rendue cruciale par l'urbanisation de la montagne et le développement du tourisme, notamment hivernal avec le développement de la neige de culture. Aujourd'hui, 19% de l'eau prélevée dans les unités d'eau potable est ainsi utilisée (Dugleux et Roux, 2002). D'autres activités sont également touchées par la qualité

microbiologique de l'eau, telles que les usages agro-alimentaires (alimentation des troupeaux, risque pour les fabrications fromagères fermières) ou les fonctions récréatives (baignade, sports d'eaux vives). Cette situation sanitaire des eaux n'est pas en accord avec l'image largement répandue d'eaux pures de montagne ; elle n'est pas non plus compatible avec les fonctions portées par cet espace, celui de château d'eau, de support à une politique de développement agricole basé sur la haute qualité des produits. Ainsi une autre perspective de travail serait la mise en place d'un plan de surveillance visant à établir la qualité microbiologique, notamment vis-à-vis des STEC, des eaux de montagne et de manière plus générale des eaux de surface en France.

4- Moyens de prévention et de maîtrise de la dissémination environnementale des STEC

Nos études montrent globalement une remarquable adaptation et une extrême résistance des STEC dans l'environnement. Ils soulignent également le manque de moyens que l'on a à l'heure actuelle face aux pollutions biologiques diffuses. Leur contrôle dans les sols par des flores compétitives ou antagonistes sélectionnées pourrait constituer une piste intéressante même si nos résultats avec une souche de *P. fluorescens* productrice de Phl n'ont pas permis d'identifier une bactérie antagoniste d'*E. coli* O157:H7. Dans cette étude, le modèle de bactérie rhizosphérique productrice d'antibiotique choisi, *P. fluorescens*, n'est qu'un simple compétiteur d'*E. coli* O157:H7 sans effet notable du Phl. Il serait cependant intéressant de confirmer ces résultats sur d'autres sérogroupes tels que O26 ou O103. Par ailleurs, une recherche plus approfondie, et visant à identifier d'autres populations bactériennes capables de limiter la croissance des pathogènes dans les sols rhizosphériques, devrait être entreprise.

Au vu de ces résultats, il est évident que le problème doit être traité à la source. Eviter toute entrée des STEC dans l'environnement semble primordiale. Lorsque les animaux sont regroupés dans les étables en période hivernale, le traitement des effluents suffit à limiter la dissémination des STEC dans l'environnement. Par contre, lorsque les animaux sont mis en pâture lors de la transhumance d'été par exemple, il devient alors impossible de maîtriser le devenir du pathogène une fois excrété dans les déjections des ruminants sur les sols. Un moyen de lutte efficace serait le contrôle du réservoir de ces bactéries, à savoir le tube digestif des bovins. Cela passe essentiellement par l'utilisation de probiotiques ou de bactériophages anti-STEC. Comme on a pu le décrire dans le mémoire bibliographique, des résultats encourageants ont été obtenus pour *E. coli* O157:H7. Au vu de la diversité (en terme de

sérotypes et/ou de pulsotypes) des souches STEC rencontrée en élevages, des études plus abouties et surtout étendues aux différents sérogroupes à risque, tels qu'ils ont été définis par l'avis de l'AFSSA, devraient être menées.

5- Vers une analyse comparative avec des souches STEC de diverses origines

Les souches STEC isolées lors de nos différentes études en élevages bovins pourraient être comparées du point de vu de leur sérotype ou de leur pulsotype avec des souches STEC isolées des différentes filières agroalimentaires et de l'environnement. Cela permettrait entre autres de déterminer si il existe, malgré la diversité des souches STEC observée, des clones persistants au sein des différentes filières, et si certains sont plus fréquemment isolés dans les denrées ou impliqués lors d'épidémies. Une banque européenne visant à rassembler les données sur les souches STEC isolées en Europe, obtenues à l'aide d'un outil de typage de référence, est en cours de réflexion.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ces travaux ont entre autres permis de déterminer avec précision la prévalence de la contamination en STEC dans les exploitations laitières françaises. L'extrême diversité des STEC et leur importante dissémination au sein de ces exploitations rendent illusoire (comme pour la plupart des agents zoonotiques) la totale maîtrise des STEC en élevages. Seul le contrôle du réservoir bovin permettrait de maîtriser le risque STEC. En attendant que les différents traitements soient en passe d'atteindre des résultats probants, il est essentiel de respecter des mesures d'hygiène strictes afin de limiter la propagation des STEC dans l'environnement.

Cela passe notamment par une gestion adaptée des effluents d'élevages avant leur épandage sur les terres destinées aux cultures maraîchères ou au pâturage des animaux. Nos travaux révèlent que les STEC sont capables de survivre durant 3 mois dans les effluents d'élevages bovins non traités, le retournement des andains permettant de réduire leur temps de survie de moitié. Le stockage des effluents est le moyen le plus économique afin d'assainir naturellement les déchets organiques d'une exploitation. Il doit cependant durer plus de 3 mois après le dernier ajout d'excréments, être réalisé dans des emplacements prévus à cet effet, et être inaccessible à la faune sauvage. Pour les andains, tous les lixiviats doivent être collectés au niveau de trappes spécifiques.

Ces mesures devraient d'autant plus être appliquées que les STEC sont extrêmement résistants dans le sol. Notre étude souligne qu'ils sont capables de survivre de 6 mois à plus d'un an dans les sols testés, qu'ils soient conditionnés à 4°C ou 20°C. Malgré les conditions *in vitro* de cette étude, il est important de considérer la persistance du pathogène dans cet écosystème.

Par ailleurs, l'étude réalisée dans un bassin versant d'altitude pâturé par des ruminants, souligne que les STEC sont capables de persister dans la matière fécale de bovins naturellement contaminée durant plus de 2 mois. Ceci malgré leur exposition à des conditions climatiques extrêmes telles que des variations marquées de températures et/ou des fortes précipitations. Pré-requis indispensable, la persistance des STEC dans la matière fécale contribue à leur transfert dans le sol. Une faible population de STEC ($< 200 \text{ UFC g}^{-1}$) a été détectée jusqu'à une profondeur de 20 cm dans le sol situé sous les déjections des bovins. Par le biais de divers vecteurs tels que le transfert via les eaux de percolation, étroitement associé aux événements de pluies, et via les insectes, la bouse permet d'inoculer régulièrement le sol sous-jacent en STEC. Le devenir des cellules est ensuite incertain, principalement régi par leur transfert dans des zones de sol plus profondes ou par les phénomènes de mortalité. Malgré l'importante prévalence des gènes *stx* dans les eaux du bassin ainsi que l'isolement de

souches STEC viables dans ces échantillons, le transfert des STEC dans l'eau à partir des déjections des animaux et/ou des sols n'a pu être démontré, même si il est fortement probable.

Dans la rhizosphère, la survie des STEC peut être affectée par des populations microbiennes productrices de métabolites antibactériens. Les essais effectués avec une souche de *P. fluorescens* productrice de Phl sont peu concluants. La souche *P. fluorescens* ne fait que retarder la colonisation de la plante par le pathogène, sans effet notable du Phl. Les observations en microscopie confocale soulignent la présence d'*E. coli* O157:H7 à l'intérieur des racines, le rendant en partie inaccessible aux agents hygiénisants ou aux flores indigènes compétitives et/ou antagonistes.

Au vu de ces résultats, dire que l'environnement peut constituer un second réservoir pour les STEC n'est pas complètement abusif. La persistance ainsi que l'entrée régulière et non maîtrisée de la bactérie dans l'environnement risque de devenir une réelle problématique écologique à laquelle les agriculteurs vont devoir faire face avec l'appui des scientifiques.

ANNEXES

**ANNEXE 1 : REVUE SUR L'ÉCOLOGIE DES STEC DANS LES
EFFLUENTS D'ÉLEVAGES BOVINS ET
L'ENVIRONNEMENT**

Publication N°7

**Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in
cattle effluents and environment: an updated review**

B. Fremaux, C. Prigent-Combaret et C. Vernozy-Rozand

Synthèse en révision favorable dans *Veterinary Microbiology*

Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an updated review

Authors: B. Fremaux ^{1*}, C. Prigent-Combaret ² and C. Vernozzy-Rozand ¹

(1) Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle – Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon 69280, Marcy l'étoile, France.

(2) Université de Lyon, Lyon, F-69003, France ; Université Lyon 1, Lyon, F-69003, France ; CNRS, UMR 5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, F- 69622, France ; IRR 41, Villeurbanne, F-69622, France.

Keywords: STEC, environment, cattle, effluents

* Corresponding author - Phone: +33 4 78 87 25 53; Fax: +33 4 78 87 25 54

Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle – Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon
69280, Marcy l'étoile, France. E-mail: c.vernozy@vet-lyon.fr (C. Vernozzy-Rozand)

Contents

Abstract.....	3
1. Introduction.....	3
2. Overview of the environmental outbreaks associated with water, soil, raw fruits and vegetables.....	5
2.1. Outbreaks linked to water exposure.....	6
2.2. Outbreaks linked to soil exposure and consumption of raw fruits or vegetables contaminated by STEC.....	7
3. Survival of STEC in cattle effluents.....	8
3.1. Survival of STEC in untreated cattle effluents.....	9
3.2. Impact of cattle effluents treatments on the survival of STEC.....	11
4. Survival of STEC in environment.....	14
4.1. Survival of STEC in soil.....	15
4.2. Survival of STEC in water.....	19
4.3. Behavior of STEC on plants.....	21
5. Dissemination of STEC in environment.....	24
5.1. Transfer in soil and water.....	24
5.2. Environmental transfer to vegetables and fruits.....	25
6. Conclusion.....	27
7. References.....	29

Abstract

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are one of the most important emergent foodborne pathogens. STEC are common as colonizers in the intestine of healthy cattle and are spread into the environment by fecal shedding or following surface application of farm effluent on soil. The bacteria can be transmitted to humans through food, such as inadequately cooked ground beef or raw milk. During the last decade, a wide variety of environment-related exposures have emerged as new routes of transmission. Major outbreaks due to the consumption of raw fruits and vegetables or natural soil and water contaminated by STEC have been increasingly reported. STEC behavior in cattle effluents, soil, plants and water is discussed in the light of new knowledge about both biotic and abiotic factors which may affect their survival or enhance their dissemination in environment. The ability to persist in cattle environment may be one factor that contributes to the contamination and recontamination of cattle, as well as for human infection. Consequently, effective control strategies must be considered on cattle farms, in order to limit entry of STEC cells into the environment.

1. Introduction

Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains are an important group of foodborne pathogens. STEC strains elaborate two potent phage-encoded cytotoxins called Shigatoxins (Stx1 and Stx2) (Karmali, 1989; Paton and Paton, 1998). In addition to toxins production, STEC pathogenicity involved other factors including factors associated with attaching and effacing lesions, such as intimin encoded by *eae* and enterohemolysin encoded by *ehx* (Jerse et al., 1990; Schmidt et al., 1995). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are STEC strains isolated from human infections. They can cause a broad spectrum of human illnesses ranging from uncomplicated diarrhoea to hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic-uremic syndrome (HUS) (Riley et al., 1983; O'Brien and Kaper, 1998). Although everyone is susceptible to EHEC infection, young children and the elderly are most at risk for developing serious complications and sometimes blood transfusions and kidney dialysis are required. Several serogroups have been associated with human diseases (O26, O55, O91, O103, O111 or O145) but the most frequent EHEC serotype implicated worldwide in outbreaks is *E. coli* O157:H7.

Well-known vehicles for transmission of STEC include contaminated food products, especially of bovine origin, such as dairy products and undercooked minced beef which were directly contaminated by cattle feces during milking and slaughtering processes, respectively. In addition, raw fruit and vegetables, which were indirectly contaminated via irrigation water or through soil treated with farm effluents, are also an important vehicle of STEC contamination (Hilborn et al., 1999; Michino et al., 1999). Other modes of transmission are person-to-person spread, contact with animals, and contact with contaminated water or soil (Ogden et al., 2002; Olsen et al., 2002; Kassenborg et al., 2004).

In the past ten years, remarkable changes in the epidemiology of EHEC-associated human infections have occurred, and environment related exposures have been increasingly reported (Caprioli et al., 2005). Cattle feces are the main reservoir of STEC. Fecal pathogens may enter environment through direct deposition of feces to land or through overland runoff of fecal material deposited on soils, especially after heavy rainfall events (Thurston-Enriquez et al., 2005). As in bovine feces, STEC has a great capacity to survive for extended periods of time in soil and water. An in vitro study illustrated, that after application of fecal samples previously inoculated with *E. coli* O157:H7, the organism was still detectable in the surrounding soil for up to 99 days (Bolton et al., 1999). Another study showed that *E. coli* O157:H7 was able to survive for 13 weeks in lake water held at 15°C (Wang and Doyle, 1998). This great persistence in soil and water combined with intensive agricultural practices such as regular application of farms effluents to land and high cattle density on farms, may explain the recent increase of STEC outbreaks linked to the environmental pathways.

A lot of information has been reported on the survival of STEC and especially of the serotype O157:H7 since the publication of the reviews of Maule (2000) and Duffy (2003), and this work aims at compiling all these data in order to better understand the fate of STEC in cattle effluents, soil, plants and water. Special attention is given to the major abiotic and biotic factors which may affect their persistence or enhance their dissemination in the environment.

2. Overview of the environmental outbreaks associated with water, soil, raw fruits and vegetables

During the 1980s, most of the outbreaks of EHEC O157 infection were foodborne and the food vehicles implicated were mostly undercooked ground-beef or dairy products (Caprioli et al., 2005). During the ten past years, STEC outbreaks associated with environment-related exposures have been increasingly reported. Between 1994 and 2003, out of the 35 *E. coli*

O157:H7 outbreaks identified in Scotland, 19 (54%) implicated environment as suspected vehicle (Strachan et al., 2006). Among them, 8 (23 %) and 4 (11 %) were respectively linked to contaminated water and soil and one may have involved both. In the United States, the same phenomenon was reported by Rangel et al. (2005) who observed that approximately half of all *E. coli* O157:H7 outbreaks were transmitted by non-food routes between 1982 and 2002, with an increase of the incidence of environmental transmission from 1995. Although, other STEC-serogroups are frequently isolated in Europe (Caprioli et al., 1997) and North America (Brooks et al., 2005), *E. coli* O157:H7 is currently the most frequently isolated serotype from human patients infected through exposure to contaminated water or soil or through consumption of contaminated fruits or vegetables. However, in 1999 and 2001, 2 waterborne outbreaks linked to recreational water contaminated with STEC O26 and O121:H19, respectively, were reported in the United-States and another one implicating drinking water contaminated with STEC O26 was identified in Japan (Hoshina et al., 2001).

2.1. Outbreaks linked to water exposure

Worldwide, the presence of zoonotic agents such as EHEC in potable and recreational waters is a major concern to the general public. Between 1997 and 2004, the surveillance system of the United States reported that EHEC were implicated in 6% of the waterborne outbreaks of zoonotic disease (Barwick et al., 2000; Lee et al., 2002; Blackburn et al., 2004; Yoder et al., 2004; Dziuban et al., 2006; Liang et al., 2006) versus 3% in United Kingdom (Smith et al., 2006).

Waterborne EHEC diseases implicating contaminated drinking water can occur as a result of contamination of the water source, water treatment failure or post-treatment water contamination. The most important outbreak of EHEC infections occurred in May 2000, in Ontario (Canada). An estimated 2,300 people became seriously ill and 7 died from microbially contaminated public drinking water supply. Subsequently, there has been a consistent decline in the number of waterborne outbreaks associated with public water supplies due to the intensification of preventive measures, including water disinfection treatments (by chlorination, ozonation or exposure to ultraviolet light), and the increase of the number of water quality controls. Currently, numerous outbreaks were associated with consumption of untreated water from both surface and groundwater sources, and private wells were particularly incriminated (Lee et al., 2002; Smith et al., 2006; Strachan et al., 2006). Surface water and unprotected groundwater are susceptible to fecal contamination from humans, livestock, wild animals and house pets. A cohort study of farm workers identified

exposure to private water supplies as an important risk factor of contamination by *E. coli* O157 (Chalmers et al., 2000). Recently, a large *E. coli* O157 outbreak due to private group water scheme was reported in a small area of Midwest Ireland, and 18 cases including 2 with HUS were identified (Mannix et al., 2005).

Swimming in contaminated waters appears to be another important route of exposure. Recreational waterborne outbreaks attributed to *E. coli* O157:H7 in United-States, were primarily associated with swimming in fresh waters such as lake or streams, due to the relative susceptibility of *E. coli* O157 to water treatment processes applied in swimming-pools (Craun et al., 2005). The most recent outbreaks were reported in England (Ihekweazu et al., 2006) and Canada (Canada Communicable Disease Report, 2005), where children played in a stream and a water spray park both contaminated with *E. coli* O157:H7, respectively.

2.2. Outbreaks linked to soil exposure and consumption of raw fruits or vegetables contaminated by STEC

Contaminated soil was recently described as an important transmission route for STEC. Some outbreaks have occurred among persons attending open-air events such as a music festival (Crampin et al., 1999) or camp-sites (Ogden et al., 2002). In Scotland 4 of the 35 outbreaks reported were linked to soil contaminated by cattle feces. Among them, the most important one occurred in May 2000 for which twenty scouts aged between 8 and 20 were later confirmed as having *E. coli* O157 (Ogden et al., 2002). Investigations revealed that the field had been grazed by approximately 300 sheep prior to the camp and among them, that 17 of the sheep shed the pathogen.

STEC infections in humans can also occur through the consumption of raw fruits and vegetables directly contaminated through soil treated with farm effluents or during water irrigation processing. A large spectrum of fruit and vegetables were described as potential vectors of contamination such as potatoes, onions, radish, lettuce or spinach. They are major components of a healthy diet, but eating fresh uncooked produce is not risk free. In fact, after the massive outbreak associated with consumption of radish sprouts in Japan (Michino et al., 1999), other ones associated with the consumption of bagged fresh spinach and lettuce were reported in the United States, in September (183 patients infected with *E. coli* O157:H7 including 29 HUS and 1 died) and in December 2006, respectively (Centers for Disease Control and Prevention, 2006). Furthermore, *E. coli* O157:H7 was also recovered from 120 infected patients after the consumption of fresh lettuce, in Sweden (Soderstrom et al., 2005).

To conclude, environment is implicated in various EHEC outbreaks. The keys to breaking transmission of these bacteria through drinking water are to (i) protect the water source by preventing contamination from occurring, (ii) protect the population from ingesting contaminated water by treating the contaminated supply, and (iii) secure the distribution of treated water. The same precautions should be taken to ensure quality of water used for vegetable crop irrigation. Post-harvest measures must also be followed, and vegetables should be washed under running water and even disinfected with a chlorine solution. In some cases, these processes are however insufficient to sanitize them due to the internalization of the bacteria in the inner tissues of the plant. An effective alternative strategy to ensure their safety should be the use of ionizing radiations (see chapter 4.3).

In contrast, it is rather difficult to draw strategies in order to limit the dissemination of the pathogen in recreational water and soil, especially in the case of non-point source pollutions. The best one will be to reduce STEC carriage in cattle. The control of STEC in cattle has been recently reviewed by Lejeune and Wetzel (2007). The supply of probiotics such as *Lactobacillus acidophilus* in cattle feeding appears as an effective strategy to reduce STEC carriage in cattle and has gained widespread adoption. More research has to be carried out in order to determine the effectiveness of parallel and simultaneous application of one or more control strategies to substantially reduce the incidence of human EHEC-related illness, by intervention at the farm level. Pathogen controls can also be based upon treatment of cattle effluents before their amendment to land, because it has been demonstrated that STEC are able to survive for extended periods of time in farm waste.

3. Survival of STEC in cattle effluents

The persistence of STEC in animal feces and derived effluents (manure and slurry) can be influenced by various factors such as the: (i) chemical characteristics of the waste including pH, moisture content or composition; (ii) microbial interactions (antagonism, competition and predation) (Kuczynska and Shelton, 1999) and biological activities of insects; (iii) outside-exposure including diurnal temperature fluctuations, solar radiation (UV) or rainfall events; (iv) and regular addition of fresh material, leading to possible long-term survival of STEC. Impact of these factors was evaluated with survival experiments of STEC in farm waste.

3.1. Survival of STEC in untreated cattle effluents

STEC are able to survive for an extended period of time in cattle feces. The survival of *E. coli* O157:H7 in bovine feces ranges from 49 to 126 days, and STEC O26:H11 and O111 have been documented to survive for 16 and 10 weeks in feces held at 15°C, respectively (Fukushima et al., 1999). Moreover, in a high mountain watershed, non-O157 STEC cells were able to persist for approximately 2 months until the fecal material had completely decayed (Fremaux et al., *submitted*).

On farms, bovine feces are generally mixed with urine (slurry) or with bedding plus urine (manure), and these supplies are likely to modify the physicochemical parameters and the microbial populations of cattle feces. However, it appears that the long-term survival of STEC in fecal material is not affected by these changes. Indeed, different studies showed that *E. coli* O157:H7 and STEC O26:H11 strains could survive for up to 3 months in cattle slurry (McGee et al., 2001; Avery et al., 2005; Nicholson et al., 2005; Fremaux et al., 2007b). Similarly, STEC of non-O157 serogroup could survive *in vitro* for 90 days in unturned manure heaps stored at a temperatures of 15°C (Fremaux et al., 2007a).

The survival of STEC in cattle effluents largely depends on the external temperature. High temperatures are generally associated with a high decline of *E. coli* O157:H7 cells in bovine effluents. Thus, *E. coli* O157:H7 viable cells fell from approximately 10^7 CFU ml⁻¹ to undetectable levels within 5 days in bovine slurry held at 23°C whereas they were detectable for more than 28 days in slurry incubated at 4°C or -20°C (Kudva et al., 1998). This phenomenon is mainly due to the slowdown of metabolic activities of indigenous competitive or antagonistic microorganisms, but also of an important effluent-drying which occurred at low temperatures. Indeed, under different experimental conditions, *E. coli* O157:H7 survived better in feces stored at 5°C than at 22°C or 37°C (70 days versus 56 and 49 days). This can be explained by the low water activity a_w (amount of free water available for microbial populations) values recorded at 22°C and 37°C (i.e. $a_w < 0.5$ versus 0.98-0.99 at 5°C) (Wang et al., 1996). According to these results, the temperature in winter often reaches low or negative values of Celcius and presumably survival would be longer. However, under environmental conditions, Hutchison et al. (2005) showed that the *E. coli* O157:H7 decline in various cattle slurries was not significantly affected by the season of waste deposition and storage, with mean D-values (decimal reduction time) of 21.15 days (± 16.7) in summer versus 27.85 days (± 7.7) in winter, nor by the dry matter content of the slurries.

In specific cases, *E. coli* O157:H7 survival seems to be enhanced by an ambient storage temperature of cattle effluents (Himathongkham et al., 1999; Bach et al., 2005). For example, the survival of *E. coli* O157:H7 was evaluated to be two-fold increased at 22°C compared to

at 4°C and -10°C in feces previously inoculated by *E. coli* O157:H7 (Bach et al., 2005). In this study, authors demonstrated a positive correlation between the decline of the pathogen and the presence of fecal volatile fatty acids and a pH below 6.5 units.

Whether cattle diet can influence the survival of *E. coli* O157:H7 in cattle effluent was also determined. Roughage type may be important not only in controlling shedding but also with respect to pathogen survival in fecal material. Franz et al. (2005) showed that bacterial survival decreases faster in manure derived from a diet of straw (lower energy and higher fiber content) compared to low-digestible grass silage and to high-digestible grass silage plus maize (higher energy and lower fiber content). *E. coli* O157:H7 was detected by plate counting for 84 days in the manure derived from a straw diet and for more than 133 days in manures derived from grass silages. In their study, the rate of decline was positively correlated with high pH ($P=0.003$) and high fiber content ($P=0.017$). However, high-grain diets are thought to create a more acidic rumen environment because the starch is incompletely digested and is fermented in the colon, leading to the selection of more acid-tolerant *E. coli* (Diez-Gonzalez et al., 1998). Furthermore, cattle diet may modify indigenous microbial populations thereafter recovered in manure, like unicellular protozoa which are able to feed on bacteria (Kuczynska and Shelton, 1999). However, some authors demonstrated that *E. coli* O157:H7 is still able to survive for an extended period of time after being consumed by protozoa (Barker et al., 1999).

These data suggest that STEC are able to survive for extended periods of time in cattle effluents. Persistence of STEC in effluents seems to be enhanced by low temperatures ($\leq 5^{\circ}\text{C}$) and when effluents are originated from cattle fed with high-grain diets. These factors may play a role in the seasonality of transmission and prevalence of this bacterium in cattle. According to this persistence, good management practices of farm effluents should be implemented during their storage and following their amendment to land.

3.2. Impact of cattle effluents treatments on the survival of STEC

As recently outline by Fenlon et al. (2000), several good management practices of farm effluents could be proposed: (i) effluents should be stored on a cement floor for a sufficient period (≥ 3 months), which is also necessary to provide optimal fertilizing properties; (ii) all liquids should be collected in a specific trap, in order to minimize run-off and leaching of liquid manure into groundwater; (iii) a no-grazing or cutting period for grass following effluent application should be respected; (iv) farm effluents should not be applied to fruit and vegetable crops that will be eaten raw. In addition, practical and effective treatments must be

applied in order to sanitize farm effluents. These include biological processes (aerobic and anaerobic digestions), physical treatment such as heat drying, and chemical treatments by addition of lime, urea or calcium cyanamid (Duffy, 2003). However, the last ones have not been readily adopted due to environmental risks. More precisely, after land application of treated farm effluents, chemical compounds may have harmful effects on the environment as they could be easily leached into ground and surface water causing eutrophication, accumulate into plants or evaporate into the atmosphere.

In most cases long-term storage cannot be expected to completely eliminate STEC cells from slurry. Treatments particularly suited to slurries include anaerobic digestion typically at 30-35°C, with 20 days retention for cattle and poultry slurry, or 12 days for pig slurry. The addition of lime (leading to a pH rise to 12 for at least 2 h) also results in significant pathogen reduction (Bujoczek et al., 2001).

Feces composting, i.e. manure, is frequently included in farming practices to recycle organic materials mainly because it allows the transformation of organic compounds into biologically stable humic substances which constitute excellent soil amendments. This process also leads to the reduction of contamination by numerous pathogenic micro-organisms. This clearance is readily explained by a thermal destruction. More precisely, the composting process may be divided into three distinct phases: a mesophilic phase, a thermophilic phase, for which common pathogens are killed, followed by a gradual decrease of temperature, called the curing phase. The temperature increase is mainly due to the action of indigenous aerobic flora (fungi, bacteria and protozoa) and is associated with an important release of water, CO₂ and ammonia. Composting with some turning results in establishment of aerobic conditions allowing the increase of the aerobic flora activity and then a more efficient decomposition of the fecal material (Rynk, 1992). The manure should be stored under a large heap form (> 2 m³), allowing a temperature rise (> 60°C), and turned a minimum of 3 times to sanitize the manure heap (Fremaux et al., 2007a). Thus, GFP-labelled STEC strains inoculated into a large manure heap at a rate of 10⁷ CFU g⁻¹ were detected for only 42 days in turned manure heaps (versus 90 days in unturned ones). These results confirm the importance of the turning of manure heaps to decrease their bacterial load, and were similar to the earlier findings of Kudva et al. (1998) who detected *E. coli* O157:H7 in turned cattle manure heaps for 47 days. However, another study reported that *E. coli* O157:H7 could survive no more than 8 days in unturned manure heaps and 4 days in turned manure heaps (Nicholson et al., 2005). This short survival duration could be explained by the low inoculum size and the small

manure heaps used in this study that strongly contrast with the composting processes usually done on farms.

High temperature recorded in the main body of the manure heaps was strongly correlated with an important decline of STEC cells (Jiang et al., 2003b; Nicholson et al., 2005; Fremaux et al., 2007a). In a laboratory-scale bioreactor, *E. coli* O157:H7 was still detected after 36 days of composting at 21°C. When manure was heated to an external temperature of 50°C, *E. coli* O157:H7 was not detected 14 days post-composting (Jiang et al., 2003a). Jiang et al. (2003b) evaluated the thermal inactivation of *E. coli* O157:H7 in cow manure compost, and showed that the pathogen concentration decreased by 4 log₁₀ CFU g⁻¹ within 3 h at 55°C versus within only 15 min at 60°C and 3 min at 65°C. In contrast, a weaker survival time was observed for *E. coli* K12 (16.3 min versus 28.8 min for *E. coli* O157) in compost heated at 60°C (Gong et al., 2005). This result strongly suggests that the pathogen, unlike the non pathogenic *E. coli* K12 strain, was able to express specific heat shock genes that enhance its heat-resistance. Finally, anaerobic conditions seem to speed up the *E. coli* O157:H7 decline during composting of cattle effluents. Thus, in a thermophilic anaerobic digester, the D-value for *E. coli* O157:H7 in manure was in the order of only 10 min at 55°C and 1-3 h at 50°C (Aitken et al., 2007).

Moreover, some chemical treatments could be used to sanitize manure waste. Some studies indicated that accumulation of free ammonia in manure as well as drying of manure to a moisture content of 10% resulted in a marked reduction of the pathogen (Himathongkham and Riemann, 1999; Himathongkham et al., 2000). A reduction of *E. coli* O157:H7 in manure can be achieved by a combination of high concentrations of carbonate and ammonia which are pH-dependent parameters. In fact, control of CO₃²⁻ and NH₃ concentrations in cattle manure by pH adjustment to 9.5 with sodium hydroxide killed more than 10⁶ cells g⁻¹ in 7 days (Park and Diez-Gonzalez 2003). Furthermore, addition of sodium carbonate enhanced the killing effect of NaOH by increasing the CO₃²⁻ and NH₃ concentrations. Addition of 100 mmol l⁻¹ urea, produced high levels of CO₃²⁻ and NH₃ and decreased the pathogen count by at least 10⁶ cells g⁻¹ after 7 days.

Currently, biological treatments (aerobic and anaerobic digestions) constitute the best approach to sanitize farm effluents because (i) they constitute an ecological strategy to significantly reduce the number of EHEC pathogens, (ii) they are not expensive, (iii) and they are easily applicable on farms. As mentioned above, important management practices should be rigorously followed during the sanitizing processes. In the case of aerobic digestion,

aeration of effluents by turning them at least three times and their storage on an impermeable area for a sufficient period (≥ 3 months) should be performed.

4. Survival of STEC in environment

The most obvious route by which STEC cells may enter the environment is in feces shed directly onto pasture land by animals, particularly cattle and sheep. But domestic and wild animals such as pigeons (Morabito et al., 2001), deer (Asakura et al., 1998), or rabbits (Scaife et al., 2006) also constitute important reservoirs for these bacteria (Beutin, 2006). Moreover, the long-term survival of STEC in cattle feces has important health implications since they might be spread to crops during direct application of farm effluents to land (Fukushima et al., 1999). Traditionally, land application is becoming a routine procedure for the disposal of animal wastes of fecal origin, and the potential transfer of zoonotic agents to environment through the application of animal excreta to agricultural land has often been addressed (Cieslak et al., 1993; Pell, 1997).

4.1. Survival of STEC in soil

During the past ten years, the behavior of STEC in soil has been increasingly studied, especially for STEC of serotype O157:H7. Many studies reported that it persists for extended periods of time in manure-amended soil, but this persistence varied according to the experimental conditions (e.g. environmental conditions or level of STEC inocula), ranging from 25 to more than 231 days (Table 1). Concerning the other STEC serotypes, only one study carried out in our laboratory showed that STEC O26:H11 could survive *in vitro* more than 1 year in various manure-amended soils at both temperatures of 4°C and 20°C (Fremaux et al., in press). These data correlate well with those obtained for commensal *E. coli* strains, which are able to survive for a long-time in silty clay loam (SCL) and loamy sand (LS) soils fertilized with manure. In these soils, exposed daily to 10 h at 22 °C and 14 h at 9°C, *E. coli* decreased by only < 1 and about 2 log CFU g⁻¹ in SCL and LS, respectively, after 12 weeks of experimentation (Lau and Ingham, 2001).

This persistence might be a significant factor in the initial contamination and recontamination of cattle, as well as for human infection. Therefore, it is important to better understand environmental factors controlling survival of STEC in soil. In fact, both abiotic (pH, soil moisture or soil texture) and biotic soil parameters (predation, competition and antagonism) can affect the survival of fecal bacteria entering into this ecosystem (Chandler

and Craven, 1980; Recorbet et al., 1992; Kerry, 2000). In addition, fluctuating environmental conditions encountered in a field situation such as rainfall events, solar radiation (UV) or temperature variations (Yaun et al., 2003, 2004) may affect the STEC survival in soil.

Numerous researchers have described the positive effect of low temperatures on *E. coli* O157:H7 survival, because (i) they are responsible of a slowdown of competitive and antagonistic activities of indigenous bacteria (Ogden et al., 2001; Gagliardi and Karns, 2002; Islam et al., 2004a), and (ii) they avoid major decrease of the moisture content of the soil. However, a different result was obtained by Jiang et al. (2002) who reported that *E. coli* O157:H7 strains inoculated in manure-amended soil were not detected after 77 days at 5°C versus 231 days at 21°C. Similarly, Mukherjee et al. (2006) showed that the *E. coli* O157:H7 cells decline was faster at 4°C than in ambient conditions (92 vs 10 days). But it is possible that additional factors, linked to the use of different experiment designs, could have influenced soil survival of the EHEC pathogen.

Physicochemical properties of soil have also an important impact on the STEC persistence in the soil ecosystem. The pH constitutes an important factor controlling the survival of bacteria in soil, but its impact on STEC cells remained unambiguous. A study reported that high soil pH values (around 8 pH units) favour the survival of *E. coli* O157:H7 (Jiang et al., 2002). A similar result was obtained for a non pathogenic *E. coli* strain which is able to survive longer at a neutral to alkaline pH than at an acidic pH in soils of similar texture and organic matter content (Sjogren, 1994). However, it appears that the alkaline tolerance of STEC cells is limited, especially when pH values were ≥ 9 . Indeed, a recent study revealed that STEC O26:H11 cells were strongly inhibited in manure-amended soil with a pH of 9 units (Fremaux et al., in press). By comparison, Nauta and Dufrenne (1998) estimated that the maximal pH value enabling the growth of 75 *E. coli* O157:H7 strains in broth medium was around 9.4 units.

Moisture status was previously defined as a critical factor for the survival of enteric bacteria, but it seems to poorly influence the persistence of STEC in soil. Indeed, *E. coli* O157:H7 cell numbers remained unchanged until a moisture level of 0.25 g H₂O g⁻¹ dry feedlot surface material (FSM) (Berry and Miller, 2005). In addition, Jiang et al. (2002) revealed that *E. coli* O157:H7 can survive for extended periods of time in manure-amended soil even under very dry conditions, i.e. less than 1% moisture content. Similarly, STEC of serotype O26:H11 could persist in soil even in presence of low moisture levels, i.e. less than 0.08 g H₂O g⁻¹ dry soil (Fremaux et al., in press). Soil moisture content depends on its texture (Jamieson et al., 2002). Soil organic matter and clay content influence the retention of

nutrients and water in soils, thus affecting the survival of pathogens inside soil micro-aggregates. Berry and Miller (2005) demonstrated that manure modulated the effect of water availability on *E. coli* O157 growth. At a same water content of 0.43 g H₂O g⁻¹ dry FSM, increasing the amount of manure added to soil (from 25% manure to 75%) was not associated with an increase of *E. coli* O157:H7 population level, because the level of free water available to sustain microbial growth decreases. Other experiments reported that addition of manure will not systematically enhance survival of enteric bacteria, especially in the case of a soil rich in nutrients. A study showed that addition of manure to fallow soil did not enhance the persistence of *E. coli* O157:H7 in any of the three soils tested, mainly due to the high nutrients content of these soils (Gagliardi and Karns, 2002). Moreover, intensive application of manure to soil (e.g., 1 part manure to 10 parts soil versus 1:25, 1:50 or 1:100) generally resulted in a greater inactivation of *E. coli* O157:H7 due to the increase of competitive flora level (Jiang et al., 2002). On the other hand, soil organic matter and other binding agents stabilize the arrangement of pore spaces and of sand, silt, and clay particles. High-quality soil structure allows air, water, and nutrients to move through the spaces within and between aggregates (Acton and Gregorich, 1995), and the establishment of bacterial populations within soil porosity. In contrast, sandy soil is composed by non-cohesive particles and poorly retains organic matter, resulting in the decline of *E. coli* O157:H7 cells (Fenlon et al., 2000; Nicholson et al., 2005). Indeed, *E. coli* O157:H7 inoculated in clay, loam and sandy soils exposed to external ambient temperatures, survived for up to 4 months in the clay and loam soils versus 8 weeks in the sandy soil (Fenlon et al., 2000).

Survival of STEC in the field is also controlled to a certain extent by complex interactions i.e. competitive and antagonistic, with indigenous soilborne bacteria. Competition may be the result of consumption by telluric bacteria of carbon and nitrogen resources, also used by STEC. Jiang et al. (2002) showed that the decline of *E. coli* O157:H7 was slower when manure-amended soil was autoclaved, pointing to the importance of biotic interactions with indigenous soil microorganisms. Similarly, cell numbers of *E. coli* O157:H7 inoculated on roots of aseptically-grown *Arabidopsis* plants were lower in presence of a bacterial competitor, *Enterobacter asburiae* (Cooley et al., 2003). However, they were insufficient to alter the persistence of the pathogen in soil, which is able to compete with other microorganisms. In fact, even under rhizosphere soil, the survival of *E. coli* O157:H7 was poorly affected. A recent study revealed that *E. coli* O157:H7 counts were similar in unplanted soil cores and in cores planted with maize seedlings, demonstrating that, the presence of a plant rhizosphere did not significantly influence the pathogen survival

(Williams et al., 2007b). Nevertheless, rhizosphere soil differs substantially from bulk soil because roots modify their immediate soil environment through the processes of nutrient uptake, root sloughing and the release of carbon-rich exudates, which support the growth of the soil microflora. Microflora and exudates present in rhizosphere vary according to the type of plant, and influence the persistence of exogenous bacteria. Indeed, a study performed on onions and carrots illustrated that *E. coli* O157:H7 cell numbers increased within 64 days by 3 log CFU g⁻¹ in soil in which green onions were grown and only by 2.3 log CFU g⁻¹ within 84 days in soil beneath carrot roots (Islam et al., 2004b). The same authors demonstrated that *E. coli* O157:H7 persisted longer (by >60 days) in soil covered with parsley plants rather than lettuce (Islam et al., 2004a).

Finally, survival data obtained for *E. coli* O157:H7 in soil experiments were often underestimated because protozoan feeding processes were not actually taken into account. In fact, *E. coli* O157:H7 has been shown to survive and replicate in various parasites such as a common environmental protozoan, *Acanthamoeba polyphaga* (Barker et al., 1999) or a free-living soil nematode, *Caenorhabditis elegans* (Kenney et al., 2005; Anderson et al., 2006). According to their wide distribution in soil, they constitute an important environmental reservoir for transmission of the pathogen.

In conclusion, many factors may influence the survival of STEC in soil, but these foodborne bacteria may be able to persist durably in this type of ecosystem. It seems that low temperatures (< 5°C) and a high-quality soil structure enhancing the air, water and nutrient circulation through soil spaces may favour the survival of STEC in soils. The effect of pH on the STEC survival in soil remains not clear, and supplementary studies are necessary to really draw conclusions on this point. Finally, the presence of competitive flora in soil poorly affects the persistence of this zoonotic agent, which is able to compete with other microorganisms.

During rainfall events, numerous STEC cells present in soil and/or in fecal material can be disseminated in ground-water and surface-water. Whether STEC can survive in water is discussed below.

4.2. Survival of STEC in water

Survival data showed that *E. coli* O157:H7 could survive for extended periods of time in water, depending on the experimental conditions and the type of water tested. In farm water stored outdoors in a field, *E. coli* O157:H7 survived for 14 days at temperatures < 15°C (McGee et al., 2002). It appears that the pathogen survival in cattle drinking water may be

enhanced by its passage through the gastrointestinal tract, with survival time up to 109 days (Scott et al., 2006).

Surprisingly, *E. coli* O157:H7 was able to persist for 15 days in marine water and could multiply in a medium containing 5% NaCl (higher than marine water) and in sterilized marine water (Miyagi et al., 2001). Nevertheless, the pathogen activity declined with increasing seawater concentration (Williams et al., 2007a). Furthermore, in these conditions STEC cells can enter into a probable viable but non culturable (VBNC) state, as previously reported by Kogure and Ikemoto (1997) and Wang and Doyle (1998).

Several studies have reported a long-term survival of *E. coli* O157:H7 in cold water (Rice et al., 1992; Wang and Doyle, 1998; Maule, 1999). For example, Rice et al. (1992) showed that the pathogen could survive in water for only 40 days at 21°C and for more than 70 days at 5°C. Similarly, Wang et Doyle (1998) monitored the survival characteristics of a mixture of five *E. coli* O157:H7 strains in filtered and autoclaved municipal water, in reservoir water, and in water from two recreational lakes for a period of 91 days at 8 and 25°C. Greater survival was observed in filtered autoclaved municipal water compared with lake water, especially when water is held at cold temperatures. *E. coli* O157:H7 populations decreased by 1 to 2 log within 91 days at 8°C, whereas the pathogen was not detectable (≥ 3 log decrease) within 49 to 84 days at 25°C in most of the water sources tested. The fact that *E. coli* O157:H7 persist longer in filtered autoclaved municipal water highlights the inhibitory effect of indigenous microflora on the pathogen survival in water. The lack of nutrients mainly explains that competition is one of the most important factors controlling microbial population sizes in this ecosystem. Moreover, Rebekka and Artzaa (2002) highlighted significant protozoan predation effects on the survival of *E. coli* O157:H7 in drinking water wells.

Finally, *E. coli* O157 has been shown to persist in commercial bottled water (previously inoculated at a rate of 10^3 - 10^6 CFU ml⁻¹) in which it was still detectable after 300 days of storage at 22°C (Warburton et al., 1998). It was suspected that survival of this pathogen in these very low nutrient systems was permitted by the ability of this organism to form biofilms at the surface of bottles, where bacteria can benefit from nutrients released during cell lysis of other members of this complex consortium (Maule, 2000).

On the other hand, due to the difficulties in working with pathogenic bacteria and the risk of environmental contamination, no data is available concerning the fate of STEC in streams and lakes. However, recent studies have attempted to describe and simulate the behavior of fecal bacteria into flowing water. So once suspended in water, fecal bacteria can travel as free

cells or be attached to suspended manure or soil particles. Sediments in streams may also present a favourable environment for bacterial survival (Pachepsky et al., 2006). In both conditions (in water and in sediments), STEC may be inactivated by high temperature, pressure, solar radiation or predation. A recent study demonstrated that fecal bacteria can survive much longer, with cells content 10-10,000 times higher, in stream sediments than in the water column in both fresh water and marine environments (Bai and Lung, 2005). Another study, conducted in Swan Creek (Grand River watershed of Ontario), showed that *E. coli* can survive in stream bed sediments for up to 6 weeks and that sediment-associated bacteria are available for resuspension during individual storm events (Jamieson et al., 2005).

The high persistence of STEC cells in soils and water appears as an important risk factor for contamination of crops, and the ability of STEC cells to survive on the surface of, and within plants has been increasingly reported during the last 5 years. A survey of the recent literature is provided below.

4.3. Behavior of STEC on plants

A high survival of *E. coli* O157:H7 was described on a great variety of fruits and vegetables (Islam et al., 2004b; Jablasone et al., 2005; Stine et al., 2005), but also on various fresh culinary herbs (Hsu et al., 2006). On onions and carrots, *E. coli* O157:H7 cell numbers decreased within 64 days by more than 2 log CFU g⁻¹ and within 84 days by 1.7 log CFU g⁻¹, respectively (Islam et al., 2004b). Jablasone et al. (2005) inoculated *E. coli* O157:H7 on the seed of various ready-to-eat products (carrots, cress, lettuce, radish, spinach and tomato) at a rate of 3.3-4.7 log CFU g⁻¹, and placed them in glass tubes containing solidified hydroponic nutrient solution. The pathogen became rapidly established shortly after germination, attaining cell densities of 5.5-6.5 log CFU g⁻¹. Regardless of the seed type, it was able to persist at more than 6 log CFU g⁻¹ on the surface of plants, but was not detected in internal locations, 49 days post-germination. In this work, they isolated one *Enterobacter cloacae* strain from lettuce rhizosphere, which reduced *E. coli* O157:H7 level by 1 log CFU g⁻¹ on lettuce, during co-inoculation experiments. Another study revealed that *Enterobacter asburiae* decreased *E. coli* O157:H7 survival 20- to 30-fold on lettuce foliage grown from coinoculated lettuce seed (Cooley et al., 2006). Moreover, critical factors such as humidity and temperature were investigated by some researchers. The survival of *E. coli* O157:H7 on the surface of cantaloupe, lettuce, and bell peppers was not uniformly affected by low (45.1 to 48.4 %) or high (85.7 to 90.3 %) relative humidity (Stine et al., 2005). Moreover, two studies revealed

that the *E. coli* O157:H7 decline in lettuces and oranges was faster at cold temperature than in ambient conditions (Abdul-Raouf et al., 1993; Eblen et al., 2004).

Many works reported the ability of *E. coli* O157:H7 to attach to vegetable and fruit surfaces. It would seem that curli were not necessary for the binding of pathogenic strains to plant surfaces and that these bacteria may harbor different types of appendages to attach to plant surfaces (Jeter and Matthysse, 2005). Brandl (2006) reported that long aggregative fimbriae that mediate binding to, and invasion of, epithelial cells in *E. coli* O157:H7, are also implicated in the attachment of these pathogens to alfalfa sprouts. Some factors were reported as enhancing the attachment of *E. coli* O157:H7 cells, especially to damaged lettuce tissues such as high oxygen content (21% versus 2.7%) or ambient conditions (22°C versus 10°C and 37°C) (Takeuchi et al., 2001). Furthermore, it appears that *E. coli* O157:H7 and plant-associated bacteria adhered 10 to 1,000 fold less than *S. enterica* Newport (Barak et al., 2002). In fact, most of the *E. coli* O157:H7 cells were removed from alfalfa sprouts with 3 repeated washing steps, while 1 to 2 log CFU of *S. enterica* remained attached per sprout. Although these results showed that *E. coli* O157:H7 could be easily rinsed from alfalfa sprouts, they did not suggest a diminished risk for human infection by *E. coli* O157:H7 in association with alfalfa sprouts. Earlier work clearly showed that small populations of *E. coli* O157:H7 (i.e., 10^0 to 10^1 CFU) could grow on vegetables to high populations over several days, depending on environmental conditions and this might occur between production and consumption of fruit and vegetable (Charkowski et al., 2002).

E. coli O157:H7 was able to colonize various plant surfaces. Janes et al. (2005) showed that *E. coli* O157:H7 formed bacterial aggregates on apple tissues and can grow by causing degradation of the apple cellular components. On lettuce, *E. coli* O157 was found attached to the surface, especially in trichomes, stomata, and cut edges whereas in carrots, it was found mainly at cell junctions and in intracellular spaces up to 50 µm deep by confocal scanning laser microscopy (Seo and Frank, 1999; Auty et al., 2005). Furthermore, some studies revealed that the pathogen can be internalized in the inner tissues (at depths of up to 45µm) of various plants, including radish (Itoh et al., 1998) or lettuces (Solomon et al., 2002a). As consequence of their subsurface location, many *E. coli* O157:H7 cells were inaccessible to antagonistic or competitive bacteria and were protected to the antimicrobial effects of surface chemical treatments (with chlorine solutions), enhancing the survival of the pathogen inside plants. Various routes of entry exist, including areas of root damage, areas of emergence of lateral roots, stomata or vasculature (Quadt-Hallman et al., 1997). It appears that bacteria may not require any specific structures or gene products for entry into plants. In fact, after

irrigation of lettuce plants with water containing either *E. coli* O157:H7 or FluoSpheres (particles devoid of bacterial surface moieties, appendages and adaptive responses), Solomon and Matthews (2005) showed that their numbers in plant tissue were similar. Consequently, they suggested that the entry of the pathogen into lettuce plants may be a passive event not mediated by specific bacterial factors but rather governed by the plant.

This brief survey of the recent literature highlights the ability of *E. coli* O157:H7 to persist on the surface and within vegetables. In the case of plants that have been shown to internalize EHEC, washing might not be a sufficient process to guarantee their safety, especially when they are eating raw. Ionizing radiations are known to penetrate foods, and could be an alternative strategy to inhibit internalized bacteria. A recent study showed that, unlike chemical sanitizers, ionizing radiations eliminated efficiently internalized *E. coli* O157:H7 cells from leafy green vegetables. In this study, the bacteria was pushed inside the leave with a vacuum perfusion process. Therefore, the leaves were treated with a 3 minute chemical (sodium hypochlorite solution) or a physical antimicrobial treatment. Results showed that a ionizing radiation of 1.5 KGy reduced *E. coli* O157:H7 cell numbers by 99.99% on romaine lettuce and 99.9% on spinach, whereas the chemical treatment gave less than 90% reduction (Niemira, 2007). Nevertheless, these encouraging results should be confirmed by supplementary assays, and the organoleptic quality as well as the innocuousness of the irradiated products should be checked.

The long-term survival of STEC in environment challenges the notion that enteric pathogens are defined mostly by their ability to colonize the intestinal habitat. Environment might constitute an important reservoir of these bacteria, and their persistence might be a significant factor for their transfer between the different environmental compartments. Numerous pathways by which STEC can be disseminated in the environment are described in the next part of this review.

5. Dissemination of STEC in the environment

5.1. Transfer in soil and water

After shedding in cattle feces or application of STEC-contaminated animal waste as soil fertilizers in agriculture, the fecal bacteria dynamics in soil is the result of a balance between inputs from leaching and biological activities (insects or coprophages), outputs linked to water percolation, the retention properties on the soil layer and to a lesser extent the phenomena of mortality (Trevisan et al., 2002). Environmental conditions have thus an important impact on

the STEC transfer through soil, which is closely dependent of rainfall events. Crane et al. (1983) demonstrated that a small proportion of bacterial populations carried by fecal matter, are likely to move with vertical water runoff. The transport of *E. coli* O157:H7 cells in intact soil cores could be enhanced by the presence of manure (Gagliardi and Karns, 2000). In fact, bacteria could be attached to a mixture of fecal and soil particles which could serve as carriers for microbes through the water flow and might contribute to their dissemination towards deep layers soil after heavy precipitations. Furthermore, their results showed that for most of the soil cores, the total amount of the pathogen in leachate samples (calculated by adding the amounts obtained after eight 25.4 mm rainfall events) ranged from 10^5 to 10^8 CFU on the day of inoculation and from 10^4 to 10^6 CFU after 18 days, except in the intact clay loam soil cores in which leaching ceased after 3 days due to clogging. By comparison, Williams et al. (2007a) obtained a dissipation of *E. coli* O157:H7 within sand and seawater, after 5 days of repeated tidal simulation with seawater due to the soil texture (sand) and the low amount of organic matter. In fact, retention and leaching largely depend of the structural and textural soil characteristics. Compaction and the occurrence of pores providing preferential water flows are prime determinants in the degree of leaching of *E. coli* O157:H7 through soil (Artz et al., 2005). Moreover, leaching rates of *E. coli* O157:H7 significantly decreased in *in vitro* conditions with increasing of dry bulk density, and increased by the presence of earthworms (*Lumbricus terrestris*) (Artz et al., 2005). Similarly, Williams et al. (2006) highlighted the fact that anecic earthworms might significantly aid vertical movement of *E. coli* O157:H7 in soil.

On the other hand, the vegetated buffer strips between fields or pastures and streams, could prevent STEC from entering the streams, by acting as an efficient filter which let few pass and go out of exogenous bacteria (Pachepsky et al., 2006). However, some ones were able to transfer through surface and/or subsurface water flow, which move through a network of drainage pathways to converge into streams, rivers or other water reservoirs, where microorganisms can be trapped in sediments or remained as free cells (Pachepsky et al, 2006). After rainfall events which produce runoff from livestock manure-applied to agricultural fields but also resuspension of bacteria from sediments, large microbial loads are released and could have a significant impact on water bodies (Meyer et al., 2005; Thurston-Enriquez et al., 2005).

5.2. Environmental transfer to vegetables and fruits

The persistence of STEC in feces and in the environment may play a significant part in the contamination and recontamination of vegetables and fruits. Common vehicles by which STEC may be introduced into crops are (i) STEC-contaminated irrigation water, which is of

particular concern for production of fruits and vegetables in areas where the supply of fresh water is scarce, and where water reclaimed from effluents serves for agricultural purposes; (ii) STEC-contaminated soil treated with improperly composted manure or other farm effluents; (iii) biological activities of insects.

Irrigation water was relatively well described as transmission route to ready-to-eat produce. The spatial distribution of GFP-labelled *E. coli* O157:H7 has been determined through lettuce seedlings planted in soil treated with contaminated irrigation water (Ibekwe et al., 2004). These authors observed that *E. coli* O157:H7 concentrations were higher in the rhizosphere than in the non-rhizosphere soil and in the phyllosphere, but it can persist for over 45 days in all of these compartments. Similarly, Wachtel and Charkowski (2002) demonstrated the cross-contamination of lettuce by the way of irrigation water in *in vitro* conditions. Thus, soil-grown seedlings were inoculated via irrigation water contaminated with various *E. coli* O157:H7 levels i.e. 10^8 , 10^6 , 10^4 and 10^2 CFU ml⁻¹. Results showed that the highest inoculation doses resulted in the greatest association levels, especially on the roots, 10 days post-inoculation. In addition to irrigation water, the transmission of *E. coli* O157:H7 also occurred from contaminated manure to plants. The pathogen was transmitted to lettuce and parsley previously planted in a manure amended-soil contaminated at a rate of 10^7 CFU g⁻¹ and persist for 77 and 177 days on lettuce and parsley, respectively, after seedlings were planted (Islam et al., 2004a). However, the levels of *E. coli* O157:H7 used in these studies are far greater than what may be found on an agricultural field.

Under field conditions, lettuce seeds were planted in soil fertilized with naturally *E. coli* O157:H7 contaminated manure (Johannessen et al., 2004). In contrast to *in vitro* studies, no *E. coli* O157:H7 was recovered from the lettuce plants at harvest, although it was isolated from manure and manure amended-soil 8 and 7 weeks before harvesting, respectively. A further work performed by these authors concurs with this result. More precisely, lettuce seedlings were transplanted into soil fertilized with bovine manure which had been inoculated with approximately 10^4 CFU g⁻¹ of *E. coli* O157:H7. After 50 days of growth in climate-controlled room, the bacterium was not detected on leaves or lettuce roots.

Finally, the ubiquitous presence of insects in effluents and soil warrants examination of this type of transmission as a factor in the preharvest contamination of produce (Brandl, 2006). Evidence was found for the transmission of pathogenic *E. coli* via insect vectors such as the fruit fly (*Ceratitis capitata*) to apples and for its excretion from inoculated house-flies (Brandl, 2006). Recently, Gibbs et al. (2005) showed that a free-living soil bacterial-feeding nematode (*Diploscapter*) commonly found in compost and soil in the US has the potential to

serve as a vector of *E. coli* O157:H7 in soil, leading to the contamination of the surface of preharvest fruits and vegetables in contact with soil.

6. Conclusion

This review emphasized the survival of STEC for an extended period of time in cattle effluents and following their shedding in soil, water and plants, which might constitute important reservoirs of these bacteria. Because of the difficulties to control this zoonotic agent once deposited into the environment, effective strategies to limit their dissemination including control of the bovine reservoir and appropriate management practices for farm effluents should be followed. Nevertheless, further research aimed at determining the efficient adaptive mechanisms that contributed to their great resistance in new environmental and biological circumstances should be performed. A better understanding of the factors contributing to their environmental long-term survival is an important issue to be addressed in order to inhibit STEC cells once present in these ecosystems.

7. References

- Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R., Ammar, M.S., 1993. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1999-2006.
- Acton, D.F., Gregorich, L.J., 1995. The Health of our Soils: Toward sustainable agriculture in Canada. *Agric. Agri-Food Can., CDR Unit, Ottawa, Canada.* 111-120.
- Aitken, M.D., Sobsey, M.D., Van Abel, N.A., Blauth, K.E., Singleton, D.R., Crunk, P.L., Nichols, C., Walters, G.W., Schneider, M., 2007. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 during thermophilic anaerobic digestion of manure from dairy cattle. *Water Res.* 41, 1659-1666.
- Anderson, G.L., Kenney, S.J., Millner, P.D., Beuchat, L.R., Williams, P.L., 2006. Shedding of foodborne pathogens by *Caenorhabditis elegans* in compost-amended and unamended soil. *Food Microbiol.* 23, 146-153.
- Artz, R.R., Townend, J., Brown, K., Towers, W., Killham, K., 2005. Soil macropores and compaction control the leaching potential of *Escherichia coli* O157:H7. *Environ. Microbiol.* 7, 241-248.
- Asakura, H., Makino, S., Shirahata, T., Tsukamoto, T., Kurazono, H., Ikeda, T., Takeshi, K., 1998. Detection and genetical characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from wild deer. *Microbiol. Immunol.* 42, 815-822.
- Auty, M., Duffy, G., O'Beirne, D., McGovern, A., Gleeson, E., Jordan, K., 2005. In situ localization of *Escherichia coli* O157:H7 in food by confocal scanning laser microscopy. *J. Food Prot.* 68, 482-486.
- Avery, L.M., Killham, K., Jones, D.L., 2005. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in organic wastes destined for land application. *J. Appl. Microbiol.* 98, 814-822.
- Bach, S. J., Stanford, K., McAllister, T. A., 2005. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in feces from corn- and barley-fed steers. *FEMS Microbiol. Lett.* 252, 25-33.
- Bai, S., Lung, W.S., 2005. Modeling sediment impact on the transport of fecal bacteria. *Water Res.* 39, 5232-5240.
- Barak, J.D., Whitehand, L.C., Charkowski, A.O., 2002. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars and *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4758-4763.
- Barker, J., Humphrey, T.J., Brown, M.W., 1999. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol. Lett.* 173, 291-295.

- Barwick, R.S., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J., Calderon, R.L., 2000. Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1997-1998. *MMWR CDC Surveill. Summ.* 49, 1-21.
- Berry, E.D., Miller, D.N., 2005. Cattle Feedlot Soil Moisture and Manure Content: II. Impact on *Escherichia coli* O157. *J. Environ. Qual.* 34, 656-663.
- Beutin, L., 2006. Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 53, 299-305.
- Blackburn, B.G., Craun, G.F., Yoder, J.S., Hill, V., Calderon, R.L., Chen, N., Lee, S.H., Levy, D.A., Beach, M.J., 2004. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water--United States, 2001-2002. *MMWR Surveill. Summ.* 53, 23-45.
- Bolton, D.J., Byrne, C.M., Sheridan, J.J., McDowell, D.A., Blair, I.S., 1999. The survival characteristics of a non-toxigenic strain of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Appl. Microbiol.* 86, 407-411.
- Brandl, M.T., 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 367-392.
- Brooks, J.T., Sowers, E.G., Wells, J.G., Greene, K.D., Griffin, P.M., Hoekstra, R.M., Strockbine, N.A., 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J. Infect. Dis.* 192, 1422-1429.
- Bujoczek, G., Reiners, R.S., Olaszkiwicz, J.A., 2001. Abiotic factors affecting inactivation of pathogens in sludge. *Water Sci. Technol.* 44, 79-84.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugere, H., Oswald, E., 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 36, 289-311.
- Caprioli, A., Tozzi, A.E., Karch, H., 1997. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 578 -579.
- Canada Communicable Disease Report, 2005. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a children's water spray park and identified by two rounds of pulsed-field gel electrophoresis testing. *Can. Commun. Dis. Rep.* 31, 133-140.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2006. Multistate Outbreak of *E. coli* O157 Infections, November-December 2006. Retrieved from: <http://www.cdc.gov/ecoli/2006/december/121406.htm>, on 27 July, 2007.
- Chalmers, R.M., Aird, H., Bolton, F.J., 2000. Waterborne *Escherichia coli* O157. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 29, 124S-132S.

- Chandler, D.S., Craven, J.A., 1980. Relationship of soil moisture to survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in soils. *Aust. J. Agric. Res.* 31, 547-555.
- Charkowski, A.O., Barak, J.D., Sarreal, C.Z., Mandrell, R.E., 2002. Growth and colonization patterns of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouts and the effects of sprouting temperature, inoculum dose, and frequency of irrigation on bacterial levels. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3114-3120.
- Cieslak, P.R., Barrett, T.J., Griffin, P.M., Gensheimer, K.F., Beckett, G., Buffington, J., Smith, M.G., 1993. *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. *Lancet* 342, 367.
- Cooley, M.B., Chao, D., Mandrell, R.E., 2006. *Escherichia coli* O157:H7 survival and growth on lettuce is altered by the presence of epiphytic bacteria. *J. Food Prot.* 69, 2329-2335.
- Cooley, M.B., Miller, W.G., Mandrell, R.E., 2003. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4915-4926.
- Crampin, M., Willshaw, G., Hancock, R., Djuretic, T., Elstob, C., Rouse, A., Cheasty, T., Stuart, J., 1999. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with a music festival. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 286-288.
- Crane S.R., M.J.A., Grismer M.E. and Rimer J.R., 1983. Bacterial pollution from agricultural sources: a review. *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.* 26, 858-866.
- Craun, G.F., Calderon, R.L., Craun, M.F., 2005. Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int. J. Environ. Health Res.* 15, 243-262.
- Diez-Gonzalez, F., Callaway, T.R., Kizoulis, M.G., Russell, J.B., 1998. Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. *Science.* 281, 1666-1668.
- Duffy, G., 2003. Verocytotoxic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *J. Appl. Microbiol.* 94, 94S-103S.
- Dziuban, E.J., Liang, J.L., Craun, G.F., Hill, V., Yu, P.A., Painter, J., Moore, M.R., Calderon, R.L., Roy, S.L., Beach, M.J., 2006. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water--United States, 2003-2004. *MMWR Surveill. Summ.* 55, 1-30.
- Eblen, B.S., Walderhaug, M.O., Edelson-Mammel, S., Chirtel, S.J., De Jesus, A., Merker, R.I., Buchanan, R.L., Miller, A.J., 2004. Potential for internalization, growth, and survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in oranges. *J. Food Prot.* 67, 1578-1584.

- Fenlon, D.R., Ogden, I.D., Vinten, A., Svoboda, I., 2000. The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 29, 149S-156S.
- Franz, E., van Diepeningen, A.D., de Vos, O.J., van Bruggen, A.H., 2005. Effects of cattle feeding regimen and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* in manure, manure-amended soil, and lettuce. Appl. Environ. Microbiol. 71, 6165-6174.
- Fremaux, B., Delignette-Muller, M.L., Prigent-Combaret, C., Gleizal, A., Vernozy-Rozand, C., 2007a. Growth and survival of non-O157:H7 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. J. Appl. Microbiol. 102, 89-99.
- Fremaux, B., Prigent-Combaret, C., Beutin, L., Gleizal, A., Trevisan, D., Quetin, P., Jocteur-Monrozier, L., Vernozy-Rozand, C. Survival and spread of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in a high mountain pastured watershed, Appl. Env. Microbiol., in submission.
- Fremaux, B., Prigent-Combaret, C., Delignette-Muller, M.L., Dothal, M., Mallen, B., Gleizal, A., Vernozy-Rozand, C. Persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26 in various manure-amended soil types, J. Appl. Microbiol., in press.
- Fremaux, B., Prigent-Combaret, C., Delignette-Muller, M.L., Dothal, M., Vernozy-Rozand, C., 2007b. Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in cow slurry. Lett. Appl. Microbiol. 45, 55-61.
- Fukushima, H., Hoshina, K., Gomyoda, M., 1999. Long-term survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5177-5181.
- Gagliardi, J.V., Karns, J.S., 2000. Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices. Appl. Environ. Microbiol. 66, 877-883.
- Gagliardi, J.V., Karns, J.S., 2002. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on plant roots. Environ. Microbiol. 4, 89-96.
- Gibbs, D.S., Anderson, G.L., Beuchat, L.R., Carta, L.K., Williams, P.L., 2005. Potential role of *Diploscapter* sp. strain LKC25, a bacterivorous nematode from soil, as a vector of food-borne pathogenic bacteria to preharvest fruits and vegetables. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2433-2437.
- Gong, C.M., Koichi, I., Shunji, I., Takashi, S., 2005. Survival of pathogenic bacteria in compost with special reference to *Escherichia coli*. J. Environ. Sci. 17, 770-774.

- Hilborn, E.D., Mermin, J.H., Mshar, P.A., Hadler, J.L., Voetsch, A., Wojtkunski, C., Swartz, M., Mshar, R., Lambert-Fair, M.A., Farrar, J.A., Glynn, M.K., Slutsker, L., 1999. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Arch. Intern. Med.* 159, 1758-1764.
- Himathongkham, S., Bahari, S., Riemann, H., Cliver, D., 1999. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in cow manure and cow manure slurry. *FEMS Microbiol. Lett.* 178, 251-257.
- Himathongkham, S., Riemann, H., 1999. Destruction of *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in chicken manure by drying and/or gassing with ammonia. *FEMS Microbiol. Lett.* 171, 179-182.
- Himathongkham, S., Riemann, H., Bahari, S., Nuanualsuwan, S., Kass, P., Cliver, D.O., 2000. Survival of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in poultry manure and manure slurry at sublethal temperatures. *Avian Dis.* 44, 853-860.
- Hoshina, K., Itagaki, A., Seki, R., Yamamoto, K., Masuda, S., Muku, T., Okada, N., 2001. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 outbreak caused by contaminated natural water supplied by facility owned by local community. *Jpn. J. Infect. Dis.* 54, 247-248.
- Hsu, W.Y., Simonne, A., Jitareerat, P., 2006. Fates of seeded *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on selected fresh culinary herbs during refrigerated storage. *J. Food Prot.* 69, 1997-2001.
- Hutchison, M.L., Walters, L.D., Moore, A., Avery, S.M., 2005. Declines of zoonotic agents in liquid livestock wastes stored in batches on-farm. *J. Appl. Microbiol.* 99, 58-65.
- Ihekweazu, C., Barlow, M., Roberts, S., Christensen, H., Guttridge, B., Lewis, D., Paynter, S., 2006. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection in the south west of the UK: risks from streams crossing seaside beaches. *Euro. Surveill.* 11, 128-130.
- Ibekwe, A.M., Watt, P.M., Shouse, P.J., Grieve, C.M., 2004. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in irrigation water on soils and plants as validated by culture method and real-time PCR. *Can. J. Microbiol.* 50, 1007-1014.
- Islam, M., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P., Jiang, X., 2004a. 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. *J. Food Prot.* 67, 1365-1370.
- Islam, M., Morgan, J., Doyle, M.P., Jiang, X., 2004b. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure compost-amended soil and on carrots and onions grown in an environmentally controlled growth chamber. *J. Food Prot.* 67, 574-578.

- Itoh, Y., Sugita-Konishi, Y., Kasuga, F., Iwaki, M., Hara-Kudo, Y., Saito, N., Noguchi, Y., Konuma, H., Kumagai, S., 1998. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1532-1535.
- Jablasone, J., Warriner, K., Griffiths, M., 2005. Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 7-18.
- Jamieson, R.C., Gordon, R.J., Sharples, K.E., Stratton, G.W., Madani, A., 2002. Movement and persistence of fecal bacteria in agricultural soils and subsurface drainage water: A review. *Can. Biosys. Eng.* 44, 1.1-1.9.
- Jamieson, R.C., Joy, D.M., Lee, H., Kostaschuk, R., Gordon, R.J., 2005. Resuspension of sediment-associated *Escherichia coli* in a natural stream. *J. Environ. Qual.* 34, 581-589.
- Janes, M.E., Kim, K.S., Johnson, M.G., 2005. Transmission electron microscopy study of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple tissue. *J. Food Prot.* 68, 216-224.
- Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D., Kaper, J.B., 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87, 7839-7843.
- Jeter, C., Matthyse, A.G., 2005. Characterization of the binding of diarrheagenic strains of *E. coli* to plant surfaces and the role of curli in the interaction of the bacteria with alfalfa sprouts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 1235-1242.
- Jiang, X., Morgan, J., Doyle, M.P., 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2605-2609.
- Jiang, X., Morgan, J., Doyle, M.P., 2003a. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during composting of bovine manure in a laboratory-scale bioreactor. *J. Food Prot.* 66, 25-30.
- Jiang, X., Morgan, J., Doyle, M.P., 2003b. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in cow manure compost. *J. Food Prot.* 66, 1771-1777.
- Johannessen, G.S., Froseth, R.B., Solemdal, L., Jarp, J., Wasteson, Y., L, M.R., 2004. Influence of bovine manure as fertilizer on the bacteriological quality of organic Iceberg lettuce. *J. Appl. Microbiol.* 96, 787-794.
- Karmali, M.A., 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 5-38.
- Kassenborg, H.D., Hedberg, C.W., Hoekstra, M., Evans, M.C., Chin, A.E., Marcus, R., Vugia, D.J., Smith, K., Ahuja, S.D., Slutsker, L., Griffin, P.M., 2004. Farm visits and

undercooked hamburgers as major risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: data from a case-control study in 5 FoodNet sites. Clin. Infect. Dis. 38 Suppl 3, S271-S278.

Kenney, S.J., Anderson, G.L., Williams, P.L., Millner, P.D., Beuchat, L.R., 2005. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Newport*, and *Salmonella Poona* in the gut of a free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*, and transmission to progeny and uninfected nematodes. Int. J. Food Microbiol. 101, 227-236.

Kerry, B.R., 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. Annu. Rev. Phytopathol. 38, 423-441.

Kogure, K., Ikemoto, E., 1997. Wide occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in natural freshwater environment. Jpn. J. Bacteriol. 52, 601-607.

Kuczynska, E., Shelton, D.R., 1999. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2820-2826.

Kudva, I.T., Blanch, K., Hovde, C.J., 1998. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3166-3174.

Lau, M.M., Ingham, S.C., 2001. Survival of faecal indicator bacteria in bovine manure incorporated into soil. Lett. Appl. Microbiol. 33, 131-136.

Lee, S.H., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J., Calderon, R.L., 2002. Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1999-2000. MMWR Surveill. Summ. 51, 1-47.

LeJeune, J.T., Wetzel, A.N., 2007. Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle. J. Anim. Sci. 85, 73-80.

Liang, J.L., Dziuban, E.J., Craun, G.F., Hill, V., Moore, M.R., Gelting, R.J., Calderon, R.L., Beach, M.J., Roy, S.L., 2006. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with drinking water and water not intended for drinking--United States, 2003-2004. MMWR Surveill. Summ. 55, 31-65.

Mannix, M., O'Connell, N., McNamara, E., Fitzgerald, A., Prendiville, T., Norris, T., Greally, T., Fitzgerald, R., Whyte, D., Barron, D., Monaghan, R., Whelan, E., Carroll, A., Curtin, A., Collins, C., Quinn, J., O'Dea, F., O'Riordan, M., Buckley, J., McCarthy, J., McKeown, P., 2005. Large *E. coli* O157 outbreak in Ireland, October-November 2005. Euro. Surveill. 10, 051222-051223.

Maule, A., 1999. Environmental aspects of *E. coli* O157. Int. Food Hyg. 9, 21-23.

- Maule, A., 2000. Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 88, 71S-78S.
- McGee, P., Bolton, D.J., Sheridan, J.J., Earley, B., Kelly, G., Leonard, N., 2002. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in farm water: its role as a vector in the transmission of the organism within herds. J. Appl. Microbiol. 93, 706-713.
- McGee, P., Bolton, D.J., Sheridan, J.J., Earley, B., Leonard, N., 2001. The survival of *Escherichia coli* O157:H7 in slurry from cattle fed different diets. Lett. Appl. Microbiol. 32, 152-155.
- Meyer, K.J., Appletoft, C.M., Schwemm, A.K., Uzoigwe, J.C., Brown, E.J., 2005. Determining the source of fecal contamination in recreational waters. J. Environ. Health 68, 25-30.
- Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A., Yanagawa, H., 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. Am. J. Epidemiol. 150, 787-796.
- Miyagi, K., Takegaki, Y., Nakano, T., Nakano, Y., Honda, T., Sano, K., 2001. Survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in marine water and frequent detection of the Shiga toxin gene in marine water samples from an estuary port. Epidemiol. Infect. 126, 129-133.
- Morabito, S., Dell'Omo, G., Agrimi, U., Schmidt, H., Karch, H., Cheasty, T., Caprioli, A., 2001. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. Vet. Microbiol. 82, 275-283.
- Mukherjee, A., Cho, S., Scheftel, J., Jawahir, S., Smith, K., Diez-Gonzalez, F., 2006. Soil survival of *Escherichia coli* O157:H7 acquired by a child from garden soil recently fertilized with cattle manure. J. Appl. Microbiol. 101, 429-436.
- Nauta, M.J., Dufrenne, J., 1998. Variability in growth characteristics of different *E. coli* O157:H7 isolates, and its implications for predictive microbiology. Quant. Microbiol. 1, 137-155.
- Nicholson, F.A., Groves, S.J., Chambers, B.J., 2005. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. Bioresour. Technol. 96, 135-143.
- Niemira, B.A., 2007. Relative efficacy of sodium hypochlorite wash vs. ionizing radiation to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 internalized in leaves of romaine lettuce and baby Spinach. J. Food Prot., *in press*.

- O'Brien, A.D., Kaper, J.B., 1998. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday, today and tomorrow, In J. B. Kaper and A. D. O'Brien (ed.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.
- Ogden, I.D., Hepburn, N.F., MacRae, M., Strachan, N.J., Fenlon, D.R., Rusbridge, S.M., Pennington, T.H., 2002. Long-term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 100-104.
- Ogden, L.D., Fenlon, D.R., Vinten, A.J., Lewis, D., 2001. The fate of *Escherichia coli* O157 in soil and its potential to contaminate drinking water. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 111-117.
- Olsen, S.J., Miller, G., Breuer, T., Kennedy, M., Higgins, C., Walford, J., McKee, G., Fox, K., Bibb, W., Mead, P., 2002. A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 370-375.
- Pachepsky, Y.A., Sadeghi, A.M., Bradford, S.A., Shelton, D.R., Guber, A.K., Dao, T., 2006. Transport and fate of manure-borne pathogens: modeling perspective. *Agric. water Manage.* 86, 81-92.
- Park, G.W., Diez-Gonzalez, F., 2003. Utilization of carbonate and ammonia-based treatments to eliminate *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* DT104 from cattle manure. *J. Appl. Microbiol.* 94, 675-685.
- Paton, J.C., Paton, A.W., 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450-479.
- Pell, A.N., 1997. Manure and microbes: public and animal health problem? *J. Dairy Sci.* 80, 2673-2681.
- Quadt-Hallman, A., Hallman, J., Kloepper, J.W., 1997. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant associated bacteria. *Can. J. Microbiol.* 43, 577-582.
- Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M., Swerdlow, D.L., 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 603-609.
- Rebekka, R., Artzaa, K., 2002. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in private drinking water wells: influences of protozoan grazing and elevated copper concentrations. *FEMS Microbiol. Lett.* 216, 117-122.

- Recorbet, G., Steinberg, C., Faurie, G., 1992. Survival in soil of genetically engineered *Escherichia coli* as related to inoculum density, predation and competition. FEMS Microbiol. Ecol. 101, 251-260.
- Rice, E.W., Johnson, C.H., Wild, D.K., Reasoner, D.J., 1992. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in drinking water associated with a waterborne disease outbreak of hemorrhagic colitis. Lett. Appl. Microbiol. 15, 38-40.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgersen, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A., Cohen, M.L., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308, 681-685.
- Rynk, 1992. *On-Farm Composting Handbook*. Northeast Regional Agricultural and Engineering Service (NRAES), Cooperative Extension, Ithaca, NY Pub. No. 54, 51-83.
- Scaife, H.R., Cowan, D., Finney, J., Kinghorn-Perry, S.F., Crook, B., 2006. Wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as potential carriers of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Vet. Rec. 159, 175-178.
- Schmidt, H., Beutin, L., Karch, H., 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect. Immun. 63, 1055-1061.
- Scott, L., McGee, P., Sheridan, J. J., Earley, B., Leonard, N., 2006. A comparison of the survival in feces and water of *Escherichia coli* O157:H7 grown under laboratory conditions or obtained from cattle feces. J. Food Prot. 69, 6-11.
- Seo, K.H., Frank, J.F., 1999. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. J. Food Prot. 62, 3-9.
- Sjogren, R.E., 1994. Prolonged survival of an environmental *Escherichia coli* in laboratory soil microcosms. Water Air Soil Pollut. 75, 389-403.
- Smith, A., Reacher, M., Smerdon, W., Adak, G.K., Nichols, G., Chalmers, R.M., 2006. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. Epidemiol. Infect. 134, 1141-1149.
- Soderstrom, A., Lindberg, A., Andersson, Y., 2005. EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August-September 2005. Euro. Surveill. 10, E050922050921.

- Solomon, E.B., Matthews, K.R., 2005. Use of fluorescent microspheres as a tool to investigate bacterial interactions with growing plants. *J. Food Prot.* 68, 870-873.
- Solomon, E.B., Yaron, S., Matthews, K.R., 2002a. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 397-400.
- Stine, S.W., Song, I., Choi, C.Y., Gerba, C.P., 2005. Effect of relative humidity on preharvest survival of bacterial and viral pathogens on the surface of cantaloupe, lettuce, and bell peppers. *J. Food Prot.* 68, 1352-1358.
- Strachan, N.J., Dunn, G.M., Locking, M.E., Reid, T.M., Ogden, I.D., 2006. *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *Int. J. Food Microbiol.* 112, 129-137.
- Takeuchi, K., Hassan, A.N., Frank, J.F., 2001. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce as influenced by modified atmosphere and temperature. *J. Food Prot.* 64, 1820-1823.
- Thurston-Enriquez, J.A., Gilley, J.E., Eghball, B., 2005. Microbial quality of runoff following land application of cattle manure and swine slurry. *J. Water Health* 3, 157-171.
- Trevisan, D., Vansteelant, J.Y., Dorioz, J.M., 2002. Survival and leaching of fecal bacteria after slurry spreading on mountain hay meadows: consequences for the management of water contamination risk. *Water Res.* 36, 275-283.
- Wachtel, M.R., Charkowski, A.O., 2002. Cross-contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 65, 465-470.
- Wang, G., Doyle, M.P., 1998. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *J. Food Prot.* 61, 662-667.
- Wang, G., Zhao, T., Doyle, M.P., 1996. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2567-2570.
- Warburton, D.W., Austin, J.W., Harrison, B.H., Sanders, G., 1998. Survival and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated bottled water. *J. Food Prot.* 61, 948-952.
- Williams, A.P., Avery, L.M., Killham, K., Jones, D.L., 2007a. Persistence, dissipation, and activity of *Escherichia coli* O157:H7 within sand and seawater environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 24-32.
- Williams, A.P., Avery, L.M., Killham, K., Jones, D.L., 2007b. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the rhizosphere of maize grown in waste-amended soil. *J. Appl. Microbiol.* 102, 319-326.

- Williams, A.P., Roberts, P., Avery, L.M., Killham, K., Jones, D.L., 2006. Earthworms as vectors of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and vermicomposts. FEMS Microbiol. Ecol. 58, 54-64.
- Yaun, B.R., Sumner, S.S., Eifert, J.D., Marcy, J.E., 2003. Response of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 to UV energy. J. Food Prot. 66, 1071-1073.
- Yaun, B.R., Sumner, S.S., Eifert, J.D., Marcy, J.E., 2004. Inhibition of pathogens on fresh produce by ultraviolet energy. Int. J. Food Microbiol. 90, 1-8.
- Yoder, J.S., Blackburn, B.G., Craun, G.F., Hill, V., Levy, D.A., Chen, N., Lee, S.H., Calderon, R.L., Beach, M.J., 2004. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with recreational water--United States, 2001-2002. MMWR Surveill. Summ. 53, 1-22.

Table 1: Survival of *E. coli* O157:H7 in un-planted and planted soils.

Soil type	Inoculum (CFU g ⁻¹)	Addition of cattle effluents	Survival time (days)	References
Clay	10 ⁵	-	175	(Fenlon <i>et al.</i> , 2000)
Loam	10 ⁵	-	175	(Fenlon <i>et al.</i> , 2000)
Clay/loam	10 ³ -10 ⁴	+	31	(Nicholson <i>et al.</i> , 2005)
Loam/sandy	<10 ²	+	105	(Ogden <i>et al.</i> , 2002)
Sandy/loam	10 ⁶	+	> 213	(Islam <i>et al.</i> , 2004b)
Sandy	10 ⁵	-	56	(Fenlon <i>et al.</i> , 2000)
Sandy	10 ³ -10 ⁴	+	31	(Nicholson <i>et al.</i> , 2005)
Soil (texture not defined)	10 ⁸	-	> 130	(Maule 2000)
Fallow soils (loam, clay or sandy soils)	10 ⁶	-	25 à 41	(Gagliardi et Karns 2002)
Cultivated soil (loam, clay or sandy soils)	10 ⁶	-	92 à 96	(Gagliardi et Karns 2002)
Garden soil (texture not defined)	10 ³ -10 ⁴	+	69	(Mukherjee <i>et al.</i> , 2006)
Grassland soil (texture not defined)	10 ⁸	+	> 99	(Bolton <i>et al.</i> , 1999)
Grassland soil (texture not defined)	10 ⁷	+	231	(Jiang <i>et al.</i> , 2002)

ANNEXE 2 : COMMUNICATIONS N°1 ET 2

Poster présenté aux congrès :

✓ **3rd Congress of the European Society for Emerging Infections, Octobre 2004, Paris (France)**

✓ **VTEC 2006, Octobre 2006, Melbourne (Australie)**

Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms

Some Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains (STEC), and in particular *E. coli* O157:H7, are known to cause severe illness in humans. STEC have been responsible for large foodborne outbreaks and some of these have been linked to dairy products. The aim of the present study was to determine the dissemination and persistence of STEC on 13 dairy farms in France, which were selected out of 151 randomized dairy farms. A total of 1,309 samples were collected, including 415 faecal samples from cattle and 894 samples from the farm environment. Bacteria from samples were cultured and screened for Shiga toxin (*stx*) genes by polymerase chain reaction (PCR). STEC isolates were recovered from *stx*-positive samples after colony blotting, and characterized for their virulence genes, serotypes and *Xba*I digestion patterns of total DNA separated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Stx* genes were detected in 145 faecal samples (35%) and 179 (20%) environmental samples, and a total of 118 STEC isolates were recovered. Forty-six percent of the STEC isolates were positive for *stx*1, 86% for *stx*2, 29% for intimin (*eae*-gene) and 92% for enterohemolysin (*ehx*), of which 16% of the STEC strains carried these four virulence factors in combination. Furthermore, we found that some faecal STEC strains belonged to serotypes involved in human disease (O26:H11 and O157:H7). PFGE profiles indicated genetic diversity of the STEC strains and some of these persisted in the farm environment for up to 12 months. A large range of contaminated samples were collected, in particular from udders and teats. These organs are potential sources for contamination and re-contamination of dairy cattle and constitute an important risk for milk contamination.

Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms

B. Fremaux ^{1*}, S. Raynaud ², L. Beutin ³, C. Vernozy-Rozand ¹

¹ Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, BP 83, 1, Avenue Bourgelat, F-69280 Marcy l'Etoile, France

² Institut de l'Elevage, 149, rue de Bercy, F-75595 Paris Cedex 12, France

³ National Reference Laboratory for *Escherichia coli* (NRL-E. coli), Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Diedersdorfer Weg 1, D-12277 Berlin, Germany

* Presenting author



INTRODUCTION

Some Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains (STEC), and in particular *E. coli* O157:H7, are known to cause severe illness in humans. STEC have been responsible for large foodborne outbreaks and some of these have been linked to dairy products. Two outbreaks linked to raw milk cheeses contaminated by enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) were recently reported in France. The bovine intestinal tract is the principal reservoir of STEC strains. Through faecal contamination from ruminants, STEC can be found in some environmental reservoirs, e.g. drinking troughs, collective feeders or soil pens.



Objective: the aims of this present work were to determine the prevalence, the dissemination and the persistence of STEC strains on French dairy farms.

MATERIAL AND METHODS



SAMPLING DESIGN

13 farms were selected out of 151 randomized dairy farms by means of two criteria :

- (1) presence of *stx* genes in samples from bulk tank milk or faecal samples,
- (2) presence of serogroups O157, O26, O111 and the like.

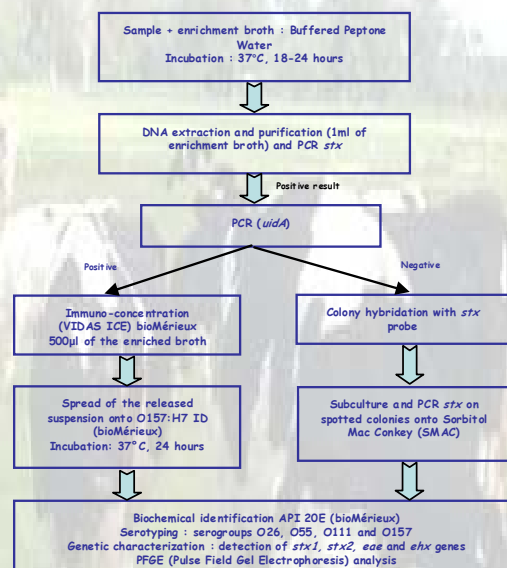
1309 samples: 415 faecal samples from cattle and 894 samples from the farm environment were collected and analysed for STEC.

Characterization of the 151 dairy farms initially selected for this study

Criteria	Total of farms selected
Presence of drop calf	6
Surface waters in cowshed and field, and presence of sheeps or goat	10
Surface waters in cowshed and field	24
Surface waters in cowshed or field	53
Absence of surface waters	52
Farms tests not randomized	6
Grand Total	151



ISOLATION AND DETECTION OF STEC



RESULTS



Positive PCR-*stx* samples :

Samples	Number of samples tested	Number of PCR positive- <i>stx</i> sample
Faeces	415	145 (35%)
Environmental samples	894	179 (20%)
Bulk tank milk	64	10 (16%)



Highest rate of contamination by STEC obtained for samples collected from farm environment

Sample	No of samples analysed	No and percentage of samples <i>stx</i> ⁺	Confidence interval
Swab udder	175	54 (31%)	[24.11%-38.27%]
Swab teat	161	49 (30%)	[23.44%-38.17%]
Water trough	81	16 (20%)	[11.73%-30.09%]
Pen wall	44	7 (16%)	[6.64%-30.07%]
Cow trap	114	15 (13%)	[7.56%-20.77%]



118 isolates were recovered (77 isolates from environmental samples, 3 from bulk tank milk and 38 isolates from cattle faeces) : 46% *stx1* (+), 86% *stx2* (+), 29% *eae* (+), 92% *ehx* (+)

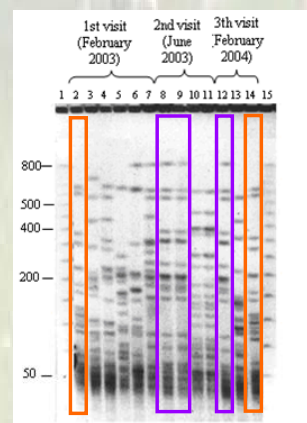
16% of the isolates were *stx1* (+), *stx2* (+), *eae* (+) and *ehx* (+)



6 isolates, all from faeces, belong to serogroups implicated in human diseases : 2 [O26], 1 [O55], 3 [O157:H7].



PFGE OF STEC ISOLATES FROM ONE FRENCH DAIRY FARM



An important diversity of STEC strains and a persistence of some of them, in the farm's environment, during 12 months were demonstrated by PFGE (—). A large range of contaminated samples were recovered, in particular the udders (n°8-9) and the drinking troughs (n°12), and the circulation of STEC was demonstrated between them (—).

CONCLUSION

Udders and drinking troughs are potential sources for contamination of milk and dairy products by STEC in farms. However no serotype implicated in human diseases was recovered from milk. The low rate of STEC strains isolated in milk, suggests that STEC were present in small quantity in bulk tanks. Consequently classical hygiene's rules and adapted farm's handling applied for all faecal pathogens, would be able to prevent milk contamination.

This study was carried out within the framework of the Aliment'Qualité 2002 program and was supported by funds from ARILAIT RECHERCHES and French Research Ministry. We are especially grateful to Mr. Vincent Heuchel for his significant contributions to this work. We also thank the dairy companies, Groupements de Défense Sanitaire (GDS) from the Calvados, Eure and Orne regions, the Syndicat Interprofessionnel du Rablechon, INRA from Tours and the stockbreeders who participated in this study.

ANNEXE 3 : COMMUNICATIONS N°3 ET 4

Posters présentés aux congrès :

- ✓ **8th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology, BAGECO, Juin 2005, Lyon (France)**
- ✓ **13ème édition des 3R Rencontres Recherches Ruminants, Décembre 2006, Paris (France)**

Survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in cow manure

The main objective of this study was to evaluate the behaviour of non O157:H7 STEC strains in cow manure. In this attempt, a mixture of 8 green fluorescent protein labelled STEC strains were inoculated around 10^6 - 10^7 CFU g⁻¹ into four manure heaps. Two heaps were regularly turned and the two others remained unturned. STEC counts and physical parameters (temperature, pH, moisture content and Oxido-Reduction Potential) were monitored for one thousand manure samples. The highest mean pH values were obtained near the surface at the base of all manure heaps. At the surface, the moisture content decreased from 76.5% to 42% in turned heaps. Temperatures reached 65°C near the main body of all manure heaps, and only 35°C near the superficial parts located at the base of them. These two sites (the center and the base) were associated with D-values for the STEC counts of 0.48 and 2.39 days, respectively. We were able to detect STEC strains during 42 days in turned manure heaps and during at least 90 days in unturned ones. According to the long-term survival of non O157:H7 STEC in cow manure good management practices (e.g. turning) should be respected in order to minimize the risk of environmental contamination by STEC.

INTRODUCTION

The Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains are associated with sporadic and epidemic bloody diarrhea, hemorrhagic colitis, and potentially life-threatening hemolytic-uremic syndrome, especially among children and elderly persons. The bovine's intestinal tract is the principal reservoir of STEC strains. Ten to 25% of cattle are healthy carriers and this rate can reach 70% in France. A composting process of animal excrements is frequently included in farming practices to convert agricultural effluents into organic fertilizers and to reduce the pathogen levels. It can be divided in 3 phases: a mesophilic phase, a thermophilic phase (temperature increase is linked to aerobic flora activity) and a curing phase.



OBJECTIVE

> The aim of this present work was to evaluate the survival and growth of STEC strains isolated from feces of dairy cattle in cow manure.

MATERIAL AND METHODS

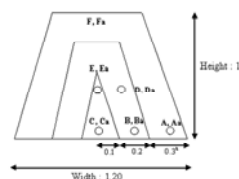
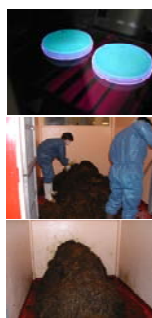
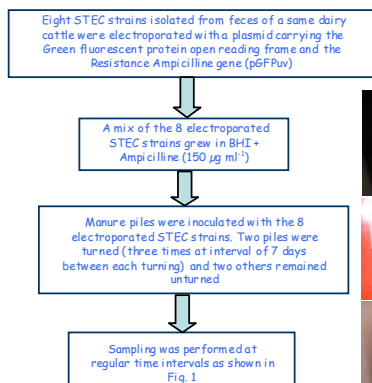


Fig. 1. Cross section of a manure pile and localisation of the different sampling sites: noted A to F and A₁ to F₁ for unturned and turned manure piles, respectively (* measures were expressed in meters)

Parameters measured for each site in all manure piles

> STEC counts by direct plating (under UV light)

25 g of manure were added to 225 ml of Buffered Peptone Water: dilutions series were spread onto selective BHI agar plates containing Ampicilline (150 µg ml⁻¹)

> Physical and chemical parameters

- The pH and Oxido Reduction Potential
- The moisture content
- The temperature (it was measured using a specific probe)

RESULTS AND DISCUSSION

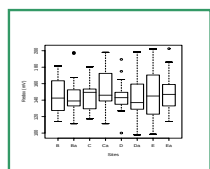


Fig. 2. Boxplots of REDOX values obtained for sites in deep layers and in main body in all manure piles

No significant difference was noted between all the sites

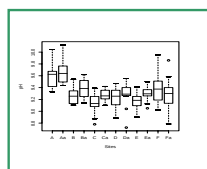


Fig. 3. Boxplots of pH values obtained for each sites in all manure piles

The pH was significantly superior near the bottom of all manure heaps

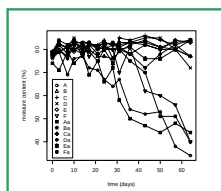


Fig. 4. Mean values of MOISTURE CONTENT profiles during the course of the study for each sites in turned and unturned manure piles

A drying was observed at the surface of the manure piles. The other sites remained fairly steady

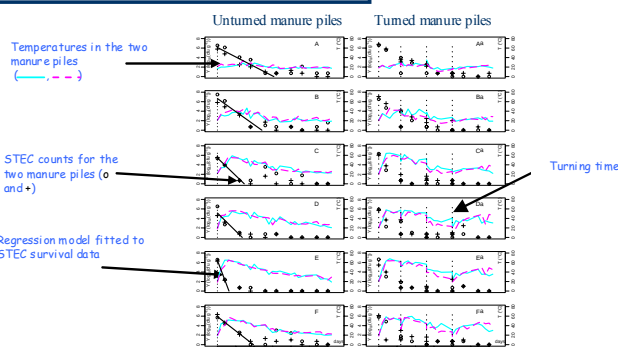


Fig. 5. Evaluation of the STEC counts and temperature profiles of each site in turned and unturned manure piles

STEC count's decrease was observed at the beginning of the study. STEC populations survived for 42 days in turned manure piles and for 90 days in unturned ones, at the surface of the piles. This result permits to confirm the benefit of the turning effect associated with the increase of aerobic flora activity

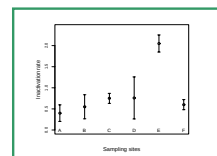


Fig. 6. Specific inactivation rate in cow manure with 95% confidence interval estimated for each site in unturned manure piles

> The site E showed a temperature $\geq 65^\circ\text{C}$ leading to a best clearance of STEC cells
> The other sites (A, B, C, D and F) showed rather similar inactivation rates. But the temperature was not a crucial factor. Indeed, different factors such as high pH, antagonist flora or low moisture content could be the main causes of the STEC clearance.

CONCLUSIONS

> Our study demonstrated a long-term survival of non O157:H7 STEC strains in cow manure (90 days in unturned piles). In order to minimize the risk of environmental contamination by STEC, during the storage and following the amendment of manure to land, good managements practices should be followed. The manure should be stored on a cement floor for a sufficient period and turned to sanitize the manure heap and all liquid manure should be collected. These farming practices minimize run-off and leaching of liquid manure into groundwater. A no-grazing or cutting period for grass following manure application was also recommended. Finally, farm manures should not be applied to fruit or vegetable crops which will be eaten raw.

Fiche 3R réalisée

Croissance et survie des *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines de sérotype non O157:H7 dans du fumier d'origine bovine

Growth and survival of non O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in cow manure

B. FREMAUX (1), M.L. DELIGNETTE-MULLER (1), C. PRIGENT-COMBARET (2), A. GLEIZAL (1), AND C. VERNZOY-ROZAND (1)

(1) Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle – Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon 69280, Marcy l'étoile, France.

(2) UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Université Claude Bernard (Lyon1), 69622 Villeurbanne, France.

INTRODUCTION

Les *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) sont des pathogènes émergents, associés à des diarrhées sanglantes et au syndrome hémolytique et urémique, touchant particulièrement les enfants en bas âge et les personnes âgées (O'Brien and Kaper, 1998). Le tube digestif des bovins est le principal réservoir des STEC. Dix à 25% des troupeaux sont porteurs sains, ce taux pouvant atteindre 70% en France (Pradel et al., 2001). Le compostage des excréments d'origine animale est fréquemment utilisé afin de convertir les effluents d'élevage en engrais organiques. Ce procédé peut être divisé en 3 phases : une phase dite mésophile, une phase thermophile où une élévation conséquente de la température est observée, suivie d'une phase de maturation. Le but de cette étude était d'évaluer la survie de souches STEC dans du fumier.

1. MATERIEL ET METHODES

Huit souches STEC toutes isolées de fèces provenant de cheptels bovins laitiers ont été marquées par électroporation avec un plasmide portant deux gènes codant respectivement pour une protéine de fluorescence et une protéine de résistance à l'ampicilline (pGFPuv). Quatre tas de fumier d'environ 2 m³ ont été inoculés avec un mélange des 8 souches transformées à un taux de 10⁶-10⁷ CFU g⁻¹. Deux piles ont été retournées (trois fois à 7 jours d'intervalle) et deux autres n'ont subi aucun retournement. Le taux de STEC ainsi que plusieurs paramètres physico-chimiques tels que le pH, la température et le taux d'humidité ont été mesurés en différents points du tas (Figure 1).

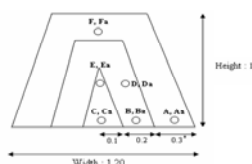


Figure 1. Coupe d'un tas de fumier présentant les différents sites de prélèvements

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les STEC inoculés ont été détectés à la surface des tas pendant 42 jours dans les tas de fumier retournés et 90 jours dans ceux non retournés (Tableau 1). Ce résultat confirme le bénéfice du retournement qui permet un accroissement de la température lié à l'augmentation de l'activité de la flore aérobie indigène du fumier.

Tableau 1. Survie des STEC et température maximale enregistrée dans chacun des sites prélevés

Site	Inoculum en STEC (log ₁₀ CFU g ⁻¹)	D-value (jours)	Température maximale (°C)	Survie des STEC (jours)
Tas non retournés				
A	6,17	2,39	35	90
B	6,67	1,54	46,5	42
C	5,45	1,15	59	23
D	5,57	0,78	56	16
E	6,45	0,48	65	9
F	6,03	1,57	58	90
Tas retournés				
Aa	6,7	ND	35	42
Ba	6,81	ND	46,5	42
Ca	6,17	ND	65	20
Da	5,81	ND	58	35
Ea	6,07	ND	68	23
Fa	5,97	ND	59,5	23

Une diminution conséquente du nombre de STEC a été observée durant les 10 premiers jours de l'étude pour l'ensemble des sites prélevés. Celle-ci étant plus marquée pour les sites dont la température atteignait les 60-65°C avec une D-value de 0,48 pour le site E. Des valeurs de pH élevées (comprises entre 9,14 et 9,67), un taux d'humidité faible (42% en périphérie du tas vs 76% au début de l'étude) et une forte activité antagoniste de la flore indigène pourraient également expliquer l'inhibition du pathogène.

CONCLUSION

Les STEC non O157:H7 sont capables de survivre jusqu'à 90 jours dans du fumier bovin non retourné. Afin de réduire au minimum le risque de contamination environnemental le fumier devrait être stocké sur un sol cimenté pendant une période suffisante et retourné afin d'hygiéniser le tas. Tous les jus de fumier devraient être collectés afin de réduire au minimum l'écoulement et la lixiviation des jus dans les eaux souterraines. Enfin les effluents d'élevages bovins ne devraient pas être appliqués sur les récoltes de fruits et légumes qui sont destinés à être consommés crus.

Cette étude a été financée par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA).

O'Brien, A.D., Kaper, J.B., 1998. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday, today and tomorrow. In J. B. Kaper and A. D. O'Brien(ed.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.

Pradel, N., Boukhors, K., Bertin, Y., Forestier, C., Martin, C., Livrelli, V., 2001. Heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients, cattle, and food samples in central France. *Appl Environ Microbiol* 67, 2460-2468.

Croissance et survie des *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines de sérotype non O157:H7 dans du fumier d'origine bovine

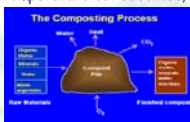
B. FREMAUX¹, M.L. DELIGNETTE-MULLER¹, C. PRIGENT-COMBARET², A. GLEIZAL¹, AND C. VERNZOY-ROZAND¹

¹ Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle - Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 69280 Marcy l'étoile, France.

² UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Université Claude Bernard (Lyon1), 69622 Villeurbanne, France.

INTRODUCTION

Les *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) sont des pathogènes émergents, associés à des diarrhées sanglantes et au syndrome hémolytique et urémique, touchant particulièrement les enfants en bas âge et les personnes âgées. Le tube digestif des bovins est le principal réservoir des STEC. Dix à 25% des troupeaux sont porteurs sains, ce taux pouvant atteindre 70% en France. Le compostage des excréments d'origine animale est fréquemment utilisé afin de convertir les effluents d'élevages en engrais organique. Ce procédé peut être divisé en 3 phases : une phase dite mésophile, une phase thermophile où une élévation conséquente de la température est observée, suivie d'une phase de maturation.



OBJECTIF : Le but de cette étude était d'évaluer la croissance et la survie de souches STEC dans du fumier en compostage

MATERIELS ET METHODES

Huit souches STEC isolées de fèces de bovins laitiers ont été électroporées avec un plasmide (pGFPuv) codant :
- une protéine de fluorescence
- une protéine de résistance à l'ampicilline

Les 8 souches STEC ainsi marquées ont été ensemencées en BHI + Ampicilline (150 µg ml⁻¹)

Quatre tas de fumier (2 m³) ont été inoculés avec les 8 souches STEC à un taux de 10⁶-10⁷ CFU g⁻¹. Deux tas ont été retournés (trois fois à 7 jours d'intervalle) et deux autres n'ont subi aucun retournement

Des prélèvements réguliers ont été réalisés au niveau de différents sites prédéfinis dans les tas de fumier (Fig. 1)

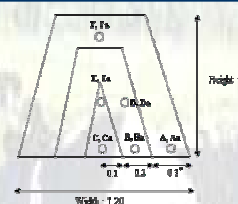
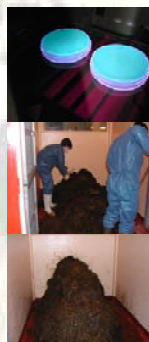


Fig. 1. Coupe d'un tas de fumier et localisation des différents sites échantillonnés : notés de A à F pour les tas non retournés et de Aa à Fa pour les tas retournés (*en mètres)

Paramètres mesurés pour l'ensemble des sites :

- **Dénombrement des STEC (sous UV)**
25 g de fumier ont été ajoutés à 225 ml d'eau peptonée puis les dilutions comptables ont été étalées sur milieu gélosé sélectif contenant de l'Ampicilline (150 µg ml⁻¹)
- **Paramètres physico-chimiques :**
 - Le pH
 - Le potentiel d'Oxydo-Reduction
 - Le taux d'humidité
 - La température

RESULTATS ET DISCUSSION

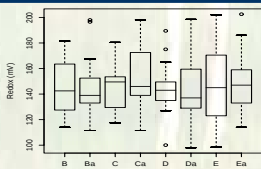


Fig. 2. Boxplots des valeurs REDOX obtenues pour les sites localisés en profondeur des tas

Aucune différence significative a été notée entre tous les sites

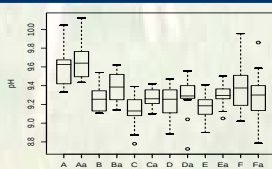


Fig. 3. Boxplots des valeurs de pH obtenues pour chaque site dans tous les tas de fumier

Le pH était significativement supérieur au pied de tous les tas de fumier

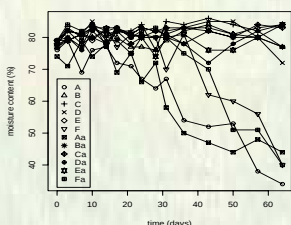


Fig. 4. Valeurs moyennes du taux d'humidité obtenues durant l'étude pour chaque site des tas de fumier retournés et non retournés

Un assèchement a été observé à la surface de l'ensemble des tas de fumier. Les autres sites ont gardés un taux d'humidité à peu près constant

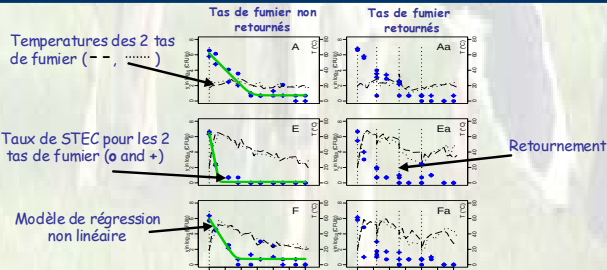


Fig. 5. Taux de STEC et profils de température obtenus pour certains sites des tas de fumier non retournés et retournés

Une diminution du taux de STEC a été observée au début de l'étude pour l'ensemble des sites testés. Celle-ci étant plus marquée pour les sites dont la température atteignait les 60-65°C (sites E ou F).

Tab. 1. Survie des STEC et température maximale enregistrée dans chacun des sites prélevés

Site	Inoculum en STEC (log ₁₀ CFU g ⁻¹)	D-value (jours)	Température maximale (°C)	Survie des STEC (jours)
Tas non retournés				
A	6,17	2,39	35	90
B	6,67	1,54	46,5	42
C	5,45	1,15	59	23
D	5,57	0,78	56	16
E	6,45	0,48	65	9
F	6,03	1,57	58	90
Tas retournés				
Aa	6,7	ND	35	42
Ba	6,81	ND	46,5	42
Ca	6,17	ND	65	20
Da	5,81	ND	58	35
Ea	6,07	ND	68	23
Fa	5,97	ND	59,5	23

Les STEC ont survécu pendant 90 jours dans les tas de fumier non retournés et seulement 42 jours dans les tas retournés.

CONCLUSIONS

Les STEC non O157:H7 sont capables de survivre jusqu'à 90 jours dans du fumier bovin non retourné. Afin de réduire au minimum le risque de contamination environnemental, le fumier devrait être stocké sur un sol cimenté pendant une période suffisante et retourné afin d'assainir le tas. Tous les jus de fumier devraient être collectés afin de réduire au minimum l'écoulement et la lixiviation des jus dans les eaux souterraines. Enfin les effluents d'élevages bovins ne devraient pas être appliqués sur les récoltes de fruits et légumes qui sont destinés à être consommés crus.

* Cette étude a été financée par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA)

ANNEXE 4 : COMMUNICATION N°5

Poster présenté au congrès :

✓ **Rhizosphere 2, Août 2007, Montpellier (France)**

Ecological interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol.

Escherichia coli O157:H7 is an emerging foodborne pathogen that can persist extensively in soil, which might be a significant factor of contamination of cattle and humans. Here, our objective was to assess whether the 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl)-producing soil bacterium *P. fluorescens* F113 could act as a natural biocontrol agent of *E. coli* O157:H7, since Phl can inhibit certain bacteria. First, growth inhibition tests of 73 *E. coli* O157:H7 isolates of diverse origins by *P. fluorescens* F113 and its Phl-negative biosynthetic mutant F113G22 were performed on solid complex medium. Inhibition of *E. coli* O157:H7 by *P. fluorescens* F113 took place but was of small magnitude, whereas F113G22 did not inhibit the growth of any of the O157:H7 isolates. Accordingly, all *E. coli* O157:H7 isolates were inhibited by synthetic Phl on plate, but the minimum inhibitory concentration was rather high ($> 128 \mu\text{g ml}^{-1}$). The 73 *E. coli* O157:H7 were then characterized by Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) and their virulence profiles by PCR on shiga toxin-encoding *stx* genes. The *E. coli* O157:H7 isolates that were resistant to high Phl concentrations were found in three main groups, which correspond to *stx1*⁺ *stx2*⁺ virulence profile, faeces isolates, and isolates belonging to one particular PFGE cluster. In addition, both *P. fluorescens* F113 and Phl-negative derivative are able to limit the growth of *E. coli* O157 in sterile soil and to a lesser extent in the wheat rhizosphere. Microscopic observations showed that *P. fluorescens* F113 was exclusively recovered on the root surface, but *E. coli* O157:H7 was also visualized within the plant tissues. In conclusion, Phl-producing *P. fluorescens* has the potential to inhibit the survival of *E. coli* O157:H7 in soil and rhizosphere but Phl is only a minor component of this inhibition effect.

Ecological interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol

B. FREMAUX¹, C. PRIGENT-COMBARET², M.L. DELIGNETTE-MULLER¹, P. PUJIC², Y. MOËNNE-LOCCOZ² and C. VERNZOY-ROZAND¹

(1) Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 69280 Marcy l'Etoile, France

(2) UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, F-69622, Villeurbanne France.

INTRODUCTION

Escherichia coli O157:H7 is an emerging foodborne human pathogen and is associated with either outbreaks or sporadic haemorrhagic colitis (HC) and haemolytic uraemic syndrome (HUS), especially in children and elderly persons. Ruminants are recognized as the principal reservoir of *E. coli* O157:H7. Shedding of *E. coli* O157:H7 in cattle faeces and application of animal waste as soil fertilizers in agriculture contribute to environmental dissemination of this pathogen, which can then persist for extended period of time in soil. In rhizospheric soils, a wide range of bacteria and fungi are able to produce antimicrobial secondary metabolites which can affect the behaviour of *E. coli* O157:H7. Production of antibiotics by rhizobacteria has been extensively documented in the case of 2,4-diacetylphloroglucinol (PH), which is synthesized by a diverse range of fluorescent *Pseudomonas* strains. This polyketide has been mainly studied for its antifungal properties against root and seedlings phytopathogens but it is also active against soil bacteria including enterobacteria such as *Pectobacterium carotovora* and against various human pathogens such as *Enterobacter aerogenes* or *Pseudomonas aeruginosa*.

Objective

- Analyze the effect of synthetic PH as well as of the PH-producing *P. fluorescens* F113 (and its PH⁻ mutant F113622) on the growth of a collection of 73 *E. coli* O157:H7 isolates.
- Assess the colonisation of wheat seedlings by *E. coli* O157:H7 in presence or absence of *P. fluorescens* F113 or its PH⁻ mutant.
- Evaluate potential relationships between PH resistance of the 73 *E. coli* O157:H7 isolates and their virulence profile, habitat of origin and PFGE profile.

MATERIAL AND METHODS

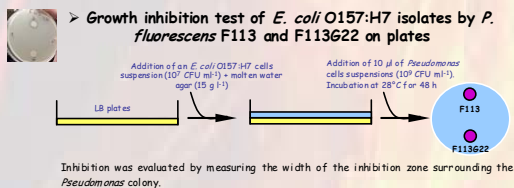
Bacterial strains

- 73 *E. coli* O157:H7 isolates of various origins, virulence and PFGE profiles
- P. fluorescens* strain F113 used as model of PH-producing *Pseudomonas*, and its PH-negative biosynthetic mutant F113622
- The plant growth-promoting rhizobacterium, *Azospirillum brasilense* Cd and the phytopathogen *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* (CFBP 2046) were used as PH-sensitive controls in inhibition experiments.

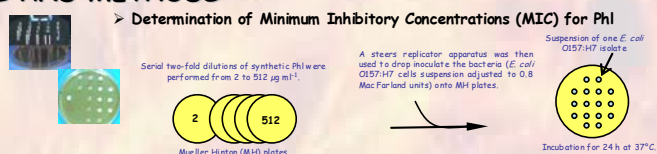
Characterization of the *E. coli* O157:H7 isolates

- By PCRs, for the two Shiga-toxins genes *stx1* and *stx2*, the intimin gene *eae* and the enterohemolysin gene *ehx*.
- By Pulse Field Gel Electrophoresis. Cluster analysis of PFGE profiles was performed using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA; with an error setting of 3%) and Dice coefficient (with a maximum position tolerance of 1%).
- Relationships between PH resistance of *E. coli* O157:H7 isolates and their habitat of origin, *stx* virulence profile and PFGE profile were analysed by a Chi-squared test.

Growth inhibition test of *E. coli* O157:H7 isolates by *P. fluorescens* F113 and F113622 on plates

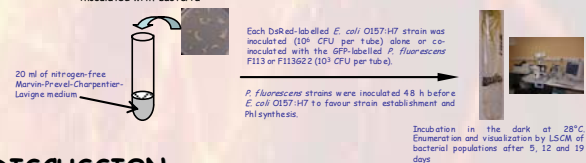


Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) for PH



Effect of *P. fluorescens* F113 and its PH⁻ mutant F113622 on the survival of *E. coli* O157:H7 on wheat seedlings

- Labelling of *P. fluorescens* and *E. coli* O157:H7 strains:
 - The broad host-range vector pMP2444 harbouring a *P_{lac}-gfp* gene fusion was introduced into *P. fluorescens* strains by pi-parental mating.
 - For *E. coli* O157:H7 isolates, a low-copy number vector coding a protein fusion with the DsRed Express protein was constructed and introduced into cells.
- Wheat seeds cv. Florina were surface-sterilized; seedlings were deposited on a plastic grid and inoculated with bacteria.



RESULTS AND DISCUSSION

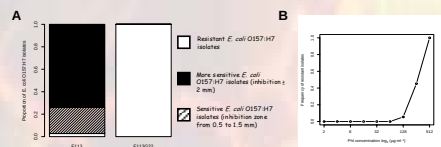


Fig. 1. Effect of PH-producing *P. fluorescens* F113 and its PH-negative biosynthetic mutant F113622 (A) as well as synthetic PH (B) on *E. coli* O157:H7 isolates ($n = 73$).
 > On solid medium, *P. fluorescens* F113 inhibited 97% of the isolates. However, growth inhibition was of small magnitude (from 0.5 to 2.5 mm versus 6 mm for the control strain *A. brasilense* Cd). In contrast, the PH⁻ mutant F113622 did not inhibit any of the *E. coli* O157:H7 isolates (Fig. 1A).
 > All isolates were inhibited by PH on plate at concentrations higher than 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$, whereas *A. brasilense* Cd and *P. carotovora* CFBP2046 displayed MIC of 128 and 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. The growth of all *E. coli* O157:H7 isolates was inhibited by PH at 512 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Fig. 1B).

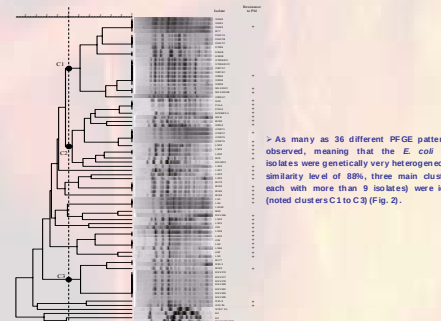


Fig. 2. Cluster analysis of 70 *E. coli* O157:H7 isolates based on UPGMA comparison of PFGE patterns.

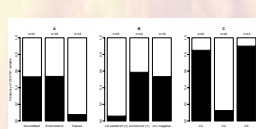


Fig. 3. Sensitivity of *E. coli* O157:H7 isolates to 256 $\mu\text{g PH ml}^{-1}$ (the white areas correspond to resistant *E. coli* O157:H7 isolates and the black areas to sensitive *E. coli* O157:H7 isolates) according to their origin (A), virulence profile (B) and main PFGE clusters (C).
 > The faeces isolates ($P < 0.05$), the *stx1*⁺ and *stx2*⁺ isolates ($P < 0.001$), and those belonging to the cluster C2 ($P < 0.001$) were more often PH (256 $\mu\text{g PH ml}^{-1}$) resistant than the others (Fig. 3).

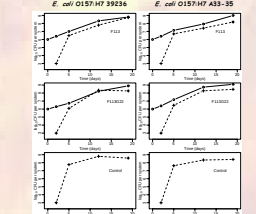


Fig. 4. Influence of *P. fluorescens* F113 and F113622 on the survival of the PH-resistant *E. coli* O157:H7 strain A33-35 and the PH-sensitive strain 39236 in wheat microcosms. Results (—: *E. coli* O157:H7; ---: *P. fluorescens*) are expressed as mean of cell counts per tube.
 > When inoculated alone, the PH-resistant *E. coli* O157:H7 strain A33-35 and the PH-sensitive strain 39236 grew similarly. Both *P. fluorescens* F113 and F113622 strains delayed colonisation of wheat seedlings by *E. coli* O157:H7 strains, but PH-production has no effect (Fig. 4).

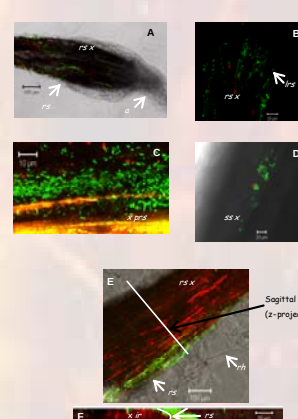


Fig. 5. Colonization of wheat seedlings by the GFP-labelled *P. fluorescens* F113 strain and the DsRed-labelled *E. coli* O157:H7 A33-35 strain, based on CLSM image analysis. 7 days (E and F) 10 days (A, B and D) and 18 days (C) post-inoculation of seedlings by *P. fluorescens* F113 or F113622 did not affect colonisation patterns of wheat seedlings by *E. coli* O157:H7 isolates.

- Fluorescent derivatives of both *P. fluorescens* and *E. coli* O157:H7 isolates were found as single cells as well as micro-colonies, all over plant roots, i.e. on root apex (Fig. 5A), in the root hair zone (Fig. 5B), or on stems (Fig. 5D). The presence of *P. fluorescens* F113 or F113622 did not affect colonisation patterns of wheat seedlings by *E. coli* O157:H7 isolates.
- Unlike *P. fluorescens*, the pathogen was also visualized at depths of up to 46 μm below the surface of plant tissues (Fig. 5E and F), suggesting migration to internal locations within roots.

CONCLUSION

This study establishes that the level of PH resistance varied from one O157:H7 isolate to the next, but that PH production by fluorescent pseudomonads was unlikely to be a significant factor determining survival and selection of the foodborne pathogen in soil ecosystems.

* This work was supported by funds from the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) and the GESSOL2 project PASTOR (Méthodes de l'Ecologie et du Développement Durables).

BIBLIOGRAPHIE

1. **Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R., et Ammar, M.S.** 1993. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2364-2368.
2. **Ackers, M.L., Mahon, B.E., Leahy, E., Goode, B., Damrow, T., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Rice, D.H., Barrett, T.J., Hutwagner, L., Griffin, P.M., et Slutsker, L.** 1998. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J Infect Dis* **177**: 1588-1593.
3. **Ackman, D., Marks, S., Mack, P., Caldwell, M., Root, T., et Birkhead, G.** 1997. Swimming-associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. *Epidemiol Infect* **119**: 1-8.
4. **Acton, D.F. et Gregorich, L.J. (eds.)** 1995. The health of our soils: toward sustainable agriculture in Canada : Agriculture and Agri-Food Canada.
5. **AFSSA.** 2003. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC).
6. **Aitken, M.D., Sobsey, M.D., Van Abel, N.A., Blauth, K.E., Singleton, D.R., Crunk, P.L., Nichols, C., Walters, G.W. et Schneider, M.** 2007. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 during thermophilic anaerobic digestion of manure from dairy cattle. *Water Res* **41**: 1659-1666.
7. **Al-Jader, L., Salmon, R.L., Walker, A.M., Williams, H.M., Willshaw, G.A. et Cheasty, T.** 1999. Outbreak of *Escherichia coli* O157 in a nursery: lessons for prevention. *Arch Dis Child* **81**: 60-63.
8. **Allaby, M.A. et Mayon-White, R.** 1995. *Escherichia coli* O 157: outbreak in a day nursery. *Commun Dis Rep CDR Rev* **5**: 4-6.
9. **Allerberger, F., Wagner, M., Schweiger, P., Rammer, H.P., Resch, A., Dierich, M.P., Friedrich, A.W. et Karch, H.** 2001. *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurised milk. *Euro Surveill* **6**: 147-151.
10. **Anderson, G.L., Kenney, S.J., Millner, P.D., Beuchat, L.R. et Williams, P.L.** 2006. Shedding of foodborne pathogens by *Caenorhabditis elegans* in compost-amended and unamended soil. *Food Microbiol* **23**: 146-153.
11. **Andrade, J.R., Da Veiga, V.F., De Santa Rosa, M.R. et Suassuna, I.** 1989. An endocytic process in HEP-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* **28**: 49-57.

12. Artz, R.R., Townend, J., Brown, K., Towers, W. et Killham, K. 2005. Soil macropores and compaction control the leaching potential of *Escherichia coli* O157:H7. *Environ Microbiol* **7**: 241-248.
13. Asakura, H., Makino, S., Shirahata, T., Tsukamoto, T., Kurazono, H., Ikeda, T. et Takeshi, K. 1998. Detection and genetical characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from wild deer. *Microbiol Immunol* **42**: 815-822.
14. Auty, M., Duffy, G., O'Beirne, D., McGovern, A., Gleeson, E. et Jordan, K. 2005. In situ localization of *Escherichia coli* O157:H7 in food by confocal scanning laser microscopy. *J Food Prot* **68**: 482-486.
15. Avery, L.M., Killham, K. et Jones, D.L. 2005. Survival of *E. coli* O157:H7 in organic wastes destined for land application. *J Appl Microbiol* **98**: 814-822.
16. Bach, S.J., McAllister, T.A., Baah, J., Yanke, L.J., Veira, D.M., Gannon, V.P. et Holley, R.A. 2002. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in barley silage: effect of a bacterial inoculant. *J Appl Microbiol* **93**: 288-294.
17. Bach, S.J., Stanford, K. et McAllister, T.A. 2005. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in feces from corn- and barley-fed steers. *FEMS Microbiol Lett* **252**: 25-33.
18. Barak, J.D., Whitehand, L.C. et Charkowski, A.O. 2002. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars and *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa sprouts. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4758-4763.
19. Barker, J., Brown, M.R., Collier, P.J., Farrell, I. et Gilbert, P. 1992. Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2420-2425.
20. Barker, J., Humphrey, T.J. et Brown, M.W. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol Lett* **173**: 291-295.
21. Barker, J., Scaife, H. et Brown, M.R. 1995. Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chem* **39**: 2684-2688.
22. Barwick, R.S., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J. et Calderon, R.L. 2000. Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1997-1998. *MMWR CDC Surveill Summ* **49**: 1-21.
23. Belongia, E.A., Osterholm, M.T., Soler, J.T., Ammend, D.A., Braun, J.E. et MacDonald, K.L. 1993. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities. *Jama* **269**: 883-888.

24. **Beltrametti, F., Kresse, A.U. et Guzman, C.A.** 1999. Transcriptional regulation of the *esp* genes of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 3409-3418.
25. **Benz, I. et Schmidt, M.A.** 1992. AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol* **6**: 1539-1546.
26. **Berry, E.D. et Miller, D.N.** 2005. Cattle Feedlot Soil Moisture and Manure Content: II. Impact on *Escherichia coli* O157. *J Environ Qual* **34**: 656-663.
27. **Bertin, Y., Boukhors, K., Pradel, N., Livrelli, V. et Martin, C.** 2001. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *J Clin Microbiol* **39**: 3060-3065.
28. **Besser, T.E., Hancock, D.D., Pritchett, L.C., McRae, E.M., Rice, D.H. et Tarr, P.I.** 1997. Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J Infect Dis* **175**: 726-729.
29. **Beutin, L.** 2006. Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **53**: 299-305.
30. **Beutin, L., Bulte, M., Weber, A., Zimmermann, S. et Gleier, K.** 2000. Investigation of human infections with verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* (VTEC) belonging to serogroup O118 with evidence for zoonotic transmission. *Epidemiol Infect* **125**: 47-54.
31. **Beutin, L., Krause, G., Zimmermann, S., Kauffuss, S. et Gleier, K.** 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J Clin Microbiol* **42**: 1099-1108.
32. **Beutin, L., Montenegro, M.A., Orskov, I., Orskov, F., Prada, J., Zimmermann et S., Stephan, R.** 1989. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **27**: 2559-2564.
33. **Beutin, L., Prada, J., Zimmermann, S., Stephan, R., Orskov, I. et Orskov, F.** 1988. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg* **267**: 576-588.
34. **Beutin, L., Steinruck, H., Krause, G., Steege, K., Haby, S., Hultsch, G., Appel, B.** 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. *J Appl Microbiol* **102**: 630-639.

35. Bitzan, M., Ludwig, K., Klemm, M., König, H., Buren, J. et Müller-Wiefel, D.E. 1993. The role of *Escherichia coli* O 157 infections in the classical (enteropathic) haemolytic uraemic syndrome: results of a Central European, multicentre study. *Epidemiol Infect* **110**: 183-196.
36. Blackburn, B.G., Craun, G.F., Yoder, J.S., Hill, V., Calderon, R.L., Chen, N., Lee, S.H., Levy, D.A. et Beach, M.J. 2004. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water--United States, 2001-2002. *MMWR Surveill Summ* **53**: 23-45.
37. Boerlin, P. 1999. Evolution of virulence factors in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci* **56**: 735-741.
38. Bolduc, D., Srouf, L.F., Sweet, L., Neatby, A., Galanis, E., Isaacs, S. et Lim, G. 2004. Severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in health care institutions in Charlottetown, Prince Edward Island, fall, 2002. *Can Commun Dis Rep* **30**: 81-88.
39. Bolton, D.J., Byrne, C.M., Sheridan, J.J., McDowell, D.A. et Blair, I.S. 1999. The survival characteristics of a non-toxigenic strain of *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol* **86**: 407-411.
40. Bopp, D.J., Sauders, B.D., Waring, A.L., Ackelsberg, J., Dumas, N., Braun-Howland, E., Dziewulski, D., Wallace, B.J., Kelly, M., Halse, T., Musser, K.A., Smith, P.F., Morse, D.L. et Limberger, R.J. 2003. Detection, isolation, and molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* associated with a large waterborne outbreak. *J Clin Microbiol* **41**: 174-180.
41. Boudailliez, B., Berquin, P., Mariani-Kurkdjian, P., Ilef, D., Cuvelier, B., Capek, I., Tribout, B., Bingen, E. et Piussan, C. 1997. Possible person-to-person transmission of *Escherichia coli* O111 associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* **11**: 36-39.
42. Brandl, M.T. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annu Rev Phytopathol* **44**: 367-392.
43. Brashears, M.M., Galyean, M.L., Loneragan, G.H., Mann, J.E. et Killinger-Mann, K. 2003. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. *J Food Prot* **66**: 748-754.
44. Brenner, D., Fanning, G., Miklos, G. et Steigerwalt, A. 1973. Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. *Int J Syst Bacteriol* **23**: 1-7.

45. Brett, K.N., Hornitzky, M.A., Bettelheim, K.A., Walker, M.J. et Djordjevic, S.P. 2003. Bovine non-O157 Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess *stx2*-EDL933 and/or *stx2vhb* subtypes. *J Clin Microbiol* **41**: 2716-2722.
46. Breuer, T., Benkel, D.H., Shapiro, R.L., Hall, W.N., Winnett, M.M., Linn, M.J., Neimann, J., Barrett, T.J., Dietrich, S., Downes, F.P., Toney, D.M., Pearson, J.L., Rolka, H., Slutsker, L. et Griffin, P.M. 2001. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerg Infect Dis* **7**: 977-982.
47. Brewster, D.H., Brown, M.I., Robertson, D., Houghton, G.L., Bimson, J. et Sharp, J.C. 1994. An outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a children's paddling pool. *Epidemiol Infect* **112**: 441-447.
48. Brunder, W., Schmidt, H. et Karch, H. 1996. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiol* **142**: 3305-3315.
49. Brunder, W., Schmidt, H. et Karch, H. 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol* **24**: 767-778.
50. Bujoczek, G., Reiners, R.S. et Olszkiewicz, J.A. 2001. Abiotic factors affecting inactivation of pathogens in sludge. *Water Sci Technol* **44**: 79-84.
51. Burland, V., Shao, Y., Perna, N.T., Plunkett, G., Sofia, H.J. et Blattner, F.R. 1998. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res* **26**: 4196-4204.
52. Conseil des appellations agroalimentaires du Québec (CAAQ) 2004. Amendements relatifs à l'importation à la ferme de fumier de provenance externe, Normes établies par le CAAQ, Montréal.
53. Calderwood, S.B., Akeson, D.W.K., Keusch, G.T., Barrett, T.J. et Griffin, P.M. 1996. Proposed New nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* **62**: 118-119.
54. Callaway, T.R., Anderson, R.C., Genovese, K.J., Poole, T.L., Anderson, T.J., Byrd, J.A., Kubena, L.F. et Nisbet, D.J. 2002. Sodium chlorate supplementation reduces *E. coli* O157:H7 populations in cattle. *J Anim Sci* **80**: 1683-1689.
55. Caprioli, A., Luzzi, I., Rosmini, F., Resti, C., Edefonti, A., Perfumo, F., Farina, C., Goglio, A., Gianviti, A. et Rizzoni, G. 1994. Community-wide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **169**: 208-211.

56. **Caprioli, A. et Tozzi, A.E.** 1998. Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections in continental Europe. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains, Ed. par Kaper JB et O'Brien A.D. Washington, DC. Am Soc for Microbiol, 38-48.
57. **Casenave, C., Desenclos, J.C., Maillot, E., Benoit, S., Deschenes, G., Nivet, H., Grimont, F., Baron, S., Mariani, P. et Grimont, P.** 1993. Ecllosion de syndrome hémolytique et urémique dans une commune rurale du Cher. Bull Epidemiol Hebdomadaire **48**: 222-224.
58. **Cassels, F.J. et Wolf, M.K.** 1995. Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. J Ind Microbiol **15**: 214-226.
59. **CDC.** 1996. Lake-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7--Illinois, 1995. MMWR Morb Mortal Wkly Rep **45**: 437-439.
60. **CDC.** 2000a. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds--Wisconsin, June 1998. MMWR Morb Mortal Wkly Rep **49**: 911-913.
61. **CDC.** 2000b. Outbreaks of VTEC O157 infection linked to consumption of unpasteurized milk. Commun Dis Rep CDR Wkly **10**: 203, 206.
62. **Cerqueira, A.M., Guth, B.E., Joaquim, R.M. et Andrade, J.R.** 1999. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. Vet Microbiol **70**: 111-121.
63. **Chalmers, R.M., Aird, H. et Bolton, F.J.** 2000. Waterborne *Escherichia coli* O157. Symp Ser Soc Appl Microbiol **88**: 124S-132S.
64. **Chalmers, R.M., Salmon, R.L., Evans, J., Chart, H., Kench, S.M., Coleman, T.J., Meadows, D., Morgan-Capner, P., Softley, P. et Sillis, M.** 1999. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) risk factors in the farming environment. Abstracts of the second international symposium of the European study group on enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Acta Clin Belg **54**: 1-37.
65. **Cheville, A.M., Arnold, K.W., Buchrieser, C., Cheng, C.M., Kaspar, C.W.,** 1996. rpoS regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. Appl Environ Microbiol **62**: 1822-1824.
66. **Choi, S.H., Baumler, D.J. et Kaspar, C.W.** 2000. Contribution of dps to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. Appl Environ Microbiol **66**: 3911-3916.

67. Chung, C.T., Niemela, S.L. et Miller, R.H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc Natl Acad Sci USA **86**: 2172-2175.
68. Cirillo, J.D., Cirillo, S.L., Yan, L., Bermudez, L.E., Falkow, S. et Tompkins, L.S. 1999. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. Infect Immun **67**: 4427-4434.
71. Cobbold, R. et Desmarchelier, P. 2000. A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. Vet Microbiol **71**: 125-137.
72. Cobbold, R. et Desmarchelier, P. 2001. Characterisation and clonal relationships of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from Australian dairy cattle. Vet Microbiol **79**: 323-335.
73. Cobbold, R. et Desmarchelier, P. 2002. Horizontal transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* within groups of dairy calves. Appl Environ Microbiol **68**: 4148-4152.
74. Coia, J.E. 1998. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. FEMS Immunol Med Microbiol **20**: 1-9.
75. Cookson, A.L., Cooley, W.A. et Woodward, M.J. 2002. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. Int J Med Microbiol **292**: 195-205.
76. Cookson, S.T. et Nataro, J.P. 1996. Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. Microb Pathol **21**: 421-434.
77. Cooley, M.B., Chao, D. et Mandrell, R.E. 2006. *Escherichia coli* O157:H7 survival and growth on lettuce is altered by the presence of epiphytic bacteria. J Food Prot **69**: 2329-2335.
78. Cooley, M.B., Miller, W.G. et Mandrell, R.E. 2003. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. Appl Environ Microbiol **69**: 4915-4926.
79. Cote, C., Masse, D.I. et Quessy, S. 2006. Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries. Bioresour Technol **97**: 686-691.
80. Couzin, J. 1998. Cattle diet linked to bacterial growth. Science **281**: 1578-1579.

81. Cowden, J.M., Ahmed, S., Donaghy, M. et Riley, A. 2001. Epidemiological investigation of the central Scotland outbreak of *Escherichia coli* O157 infection, November to December 1996. *Epidemiol Infect* **126**: 335-341.
82. Crampin, M., Willshaw, G., Hancock, R., Djuretic, T., Elstob, C., Rouse, A., Cheasty, T. et Stuart, J. 1999. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with a music festival. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**: 286-288.
83. Crane S.R., M.J.A., Grismer M.E. et Rimer J.R. 1983. Bacterial pollution from agricultural sources: a review. *Transactions of the ASAE*, 858-866.
84. Crane, S.R., Westermann, P.W. et Overcash, M.R. 1981. Die-off of fecal indicator organisms following land application of poultry manure. *J Environ Qual* **9**: 531-537.
85. Cransberg, K., van den Kerkhof, J.H., Banffer, J.R., Stijnen, C., Wernars, K., van de Kar, N.C., Nauta, J. et Wolff, E.D. 1996. Four cases of hemolytic uremic syndrome-source contaminated swimming water? *Clin Nephrol* **46**: 45-49.
86. Craun, G.F., Calderon, R.L. et Craun, M.F. 2005. Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int J Environ Health Res* **15**: 243-262.
87. Cray, W.C., Casey, T.A., Bosworth, B.T. et Rasmussen, M.A. 1998. Effect of dietary stress on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1975-1979.
88. Crump, J.A., Sulka, A.C., Langer, A.J., Schaben, C., Crielly, A.S., Gage, R., Baysinger, M., Moll, M., Withers, G., Toney, D.M., Hunter, S.B., Hoekstra, R.M., Wong, S.K., Griffin, P.M. et Van Gilder, T.J. 2002. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N Engl J Med* **347**: 555-560.
89. Das, S.C., Khan, A., Panja, P., Datta, S., Sikdar, A., Yamasaki, S., Takeda, Y., Bhattacharya, S.K., Ramamurthy, T. et Nair, G.B. 2005. Dairy farm investigation on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in Kolkata, India with emphasis on molecular characterization. *Epidemiol Infect* **133**: 617-626.
90. Davis, M.A., Cloud-Hansen, K.A., Carpenter, J. et Hovde, C.J. 2005. *Escherichia coli* O157:H7 in environments of culture-positive cattle. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6816-6822.
91. Decludt, B., Bouvet, P., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Grimont, P.A., Hubert, B. et Loirat, C. 2000. Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France. *Epidemiol Infect* **124**: 215-220.

92. **Dejonghe, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E.M. et Verstraete, W.** 2001. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environ Microbiol* **3**: 649-657.
93. **Delazari, I., Iaria, S.T., Riemann, H., Cliver, D.O. et Jothikumar, N.** 1998. Removal of *Escherichia coli* O157:H7 from surface tissues of beef carcasses inoculated with wet and dry manure. *J Food Prot* **61**: 1265-1268.
94. **DeVinney, R., Gauthier, A., Abe, A. et Finlay, B.B.** 1999. Enteropathogenic *Escherichia coli*: a pathogen that inserts its own receptor into host cells. *Cell Mol Life Sci* **55**: 961-976.
95. **Diez-Gonzalez, F., Callaway, T.R., Kizoulis, M.G. et Russell, J.B.** 1998. Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. *Science* **281**: 1666-1668.
96. **Doane, C.A., Pangloli, P., Richards, H.A., Mount, J.R., Golden, D.A. et Draughon, F.A.** 2007. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse farm environments. *J Food Prot* **70**: 6-10.
97. **Donnenberg, M.S., Tzipori, S., McKee, M.L., O'Brien, A.D., Alroy, J. et Kaper, J.B.** 1993. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J Clin Invest* **92**: 1418-1424.
98. **Doorduyn, Y., de Jager, C.M., Dan Der Zwaluw, W.K., Friesema, I.H., Heuvelink, A.E., de Boer, E., Wannet, W.J. et Van Duynhoven, Y.T.** 2006. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157 outbreak, The Netherlands, September-October 2005. *Euro Surveill* **11**: 182-185.
99. **Doughty, S., Sloan, J., Bennett-Wood, V., Robertson, M., Robins-Browne, R.M. et Hartland, E.L.** 2002. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **70**: 6761-6769.
100. **Doyle, M.P.** 1991. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int J Food Microbiol* **12**: 289-301.
101. **Duffell, E., Espie, E., Nichols, T., Adak, G.K., De Valk, H., Anderson, K. et Stuart, J.M.** 2003. Investigation of an outbreak of *E. coli* O157 infections associated with a trip to France of schoolchildren from Somerset, England. *Euro Surveill* **8**: 81-86.
102. **Duffy, G.** 2003. Verocytotoxic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *J. Appl. Microbiol.* **94**: 94S-103S.

103. **Dugleux, E. et Roux, A.L.** 2002. Impact de la production de neige de culture sur la ressource en eau. In *L'eau de montagne Gestion intégrée des Hauts bassins versants*, Megève.
104. **Dziuban, E.J., Liang, J.L., Craun, G.F., Hill, V., Yu, P.A., Painter, J., Moore, M.R., Calderon, R.L., Roy, S.L. et Beach, M.J.** 2006. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water--United States, 2003-2004. *MMWR Surveill Summ* **55**: 1-30.
105. **Eblen, B.S., Walderhaug, M.O., Edelson-Mammel, S., Chirtel, S.J., De Jesus, A., Merker, R.I., Buchanan, R.L. et Miller, A.J.** 2004. Potential for internalization, growth, and survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in oranges. *J Food Prot* **67**: 1578-1584.
106. **Elder, R., Keen, J., Wittum, T., Gallaway, R., Edrington, T.S., Anderson, R.C. et Nishet, J.** 2002. Intervention to reduce fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in naturally infected cattle using neomycin sulfate. *J Anim Sci. Assoc.* **80**: 602 (abstract).
107. **Elliott, S.J., Sperandio, V., Giron, J.A., Shin, S., Mellies, J.L., Wainwright, L., Hutcheson, S.W., McDaniel, T.K. et Kaper, J.B.** 2000. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**: 6115-6126.
108. **Entry, J.A., Hubbard, R.K., Theis, J.E. et Fuhrmann, J.J.** 2000. The influence of vegetations in riparian filterstrips on coliform bacteria: II. Survival in soils. *J Environ Qual* **29**: 1215-1224.
109. **Eriksson, E., Aspan, A., Gunnarsson, A. et Vagsholm, I.** 2005. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) 0157 in Swedish dairy herds. *Epidemiol Infect* **133**: 349-358.
110. **Erwert, R.D., Eiting, K.T., Tupper, J.C., Winn, R.K., Harlan, J.M. et Bannerman, D.D.** 2003. Shiga toxin induces decreased expression of the anti-apoptotic protein Mcl-1 concomitant with the onset of endothelial apoptosis. *Microb Pathog* **35**: 87-93.
111. **Escobar-Paramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.B., Bui, H., Le Bouguenec, C. et Denamur, E.** 2004. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* **21**: 1085-1094.

112. **Espié, E. et Vaillant, V.** 2003. Toxi-infection collective Alimentaire à *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines, gironde Juin 2002 - rapport d'investigation (Institut de Veille Sanitaire - Saint Maurice, France), 1-44.
113. **Espié, E., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Pihier, N., Vaillant, V., Francart, S., de Valk, H. et Vernozy-Rozand, C.** 2006a. Shigatoxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurised cows cheese, France 2005. In 6th International Symposium on STEC, Melbourne.
114. **Espié, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H. et Vernozy-Rozand, C.** 2006b. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiol Infect* **134**: 143-146.
115. **Etcheverria, A.I., Arroyo, G.H., Perdigon, G. et Parma, A.E.** 2006. *Escherichia coli* with anti-O157:H7 activity isolated from bovine colon. *J Appl Microbiol* **100**: 384-389.
116. **Evans, J., Chalmers, R.M., Chart, H., Salmon, R.L., Kench, S.M., Coleman, T.J., Meadows, D., Morgan-Capner, P., Softley, P., Sillis, M. et Thomas, D.R.** 2000. Evidence of persisting serum antibodies to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide and Verocytotoxin in members of rural communities in England. *Eur J Epidemiol* **16**: 885-889.
117. **Faith, N.G., Shere, J.A., Brosch, R., Arnold, K.W., Ansay, S.E., Lee, M.S., Luchansky, J.B. et Kaspar, C.W.** 1996. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* **62**: 1519-1525.
118. **Fegan, N., Higgs, G., Vanderlinde, P. et Desmarchelier, P.** 2004. Enumeration of *Escherichia coli* O157 in cattle faeces using most probable number technique and automated immunomagnetic separation. *Lett Appl Microbiol* **38**: 56-59.
119. **Feng, P., Lampel, K.A., Karch, H. et Whittam, T.S.** 1998. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis* **177**: 1750-1753.
120. **Fenlon, D.R., Ogden, I.D., Vinten, A. et Svoboda, I.** 2000. The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* **88**: 149S-156S.
121. **Fenlon, D.R. et Wilson, J.** 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.
122. **Fernandez, G.C., Lopez, M.F., Gomez, S.A., Ramos, M.V., Bentancor, L.V., Fernandez-Brando, R.J., Landoni, V.I., Dran, G.I., Meiss, R., Isturiz, M.A. et**

Palermo, M.S. 2006. Relevance of neutrophils in the murine model of haemolytic uraemic syndrome: mechanisms involved in Shiga toxin type 2-induced neutrophilia. *Clin Exp Immunol* **146**: 76-84.

- 123. Fiorito, P., Burgos, J.M., Miyakawa, M.F., Rivas, M., Chillemi, G., Berkowski, D., Zotta, E., Silberstein, C. et Ibarra, C.** 2000. Effect of Shiga-toxin 2 on water and ion transport in human colon in vitro. *Dig Dis Sci* **45**: 480-486.
- 124. Foster, G.H., Armstrong, C.S., Sakiri, R. et Tesh, V.L.** 2000. Shiga toxin-induced tumor necrosis factor alpha expression: requirement for toxin enzymatic activity and monocyte protein kinase C and protein tyrosine kinases. *Infect Immun* **68**: 5183-5189.
- 125. Franz, E., Klerks, M.M., De Vos, O.J., Termorshuizen, A.J. et Van Bruggen, A.H.** 2007. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* *stx1*, *stx2*, *eaeA*, and *rfbE* genes and survival of *E. coli* O157:H7 in manure from organic and low-input conventional dairy farms. *Appl Environ Microbiol* **73**: 2180-2190.
- 126. Franz, E., van Diepeningen, A.D., de Vos, O.J. et Van Bruggen, A.H.** 2005. Effects of cattle feeding regimen and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* in manure, manure-amended soil, and lettuce. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6165-6174.
- 127. Friedman, M.S., Roels, T., Koehler, J.E., Feldman, L., Bibb, W.F. et Blake, P.** 1999. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with an improperly chlorinated swimming pool. *Clin Infect Dis* **29**: 298-303.
- 128. Fukushima, H., Hoshina, K. et Gomyoda, M.** 1999. Long-term survival of shiga toxin producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5177-5181.
- 129. Geeraerd, A.H., Herremans, C.H. et Van Impe, J.F.** 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *Int J Food Microbiol* **59**: 185-209.
- 130. Gagliardi, J.V. et Karns, J.S.** 2000. Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices. *Appl Environ Microbiol* **66**: 877-883.
- 131. Gagliardi, J.V. et Karns, J.S.** 2002. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on plant roots. *Environ Microbiol* **4**: 89-96.
- 132. Gannon, V.P., Teerling, C., Masri, S.A. et Gyles, C.L.** 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. *J Gen Microbiol* **136**: 1125-1135.

133. Garber, L., Wells, S., Schroeder-Tucker, L. et Ferris, K. 1999. Factors Associated with Fecal Shedding of Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dairy Farms. *J Food Prot* **62**: 307-312.
134. Garber, L.P., Wells, S.J., Hancock, D.D., Doyle, M.P., Tuttle, J., Shere, J.A. et Zhao, T. 1995. Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. *J Am Vet Med Assoc* **207**: 46-49.
135. Gerba, C.P. et Bitton, G. 1984. Microbial pollutants: Their survival and transport pattern to groundwater. In *Groundwater Pollution Microbiology*, eds G. Bitton and C.P Gerba, 65-88.
136. Gerber, A., Karch, H., Allerberger, F., Verweyen, H.M. et Zimmerhackl, L.B. 2002. Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. *J Infect Dis* **186**: 493-500.
137. Ghebru, H. 1988. Contribution à l'étude du pouvoir pathogène des *Escherichia coli*. Mémoire de maîtrise et Sciences Vétérinaires en Microbiologie Immunologie, Nantes.
138. Gibbs, D.S., Anderson, G.L., Beuchat, L.R., Carta, L.K. et Williams, P.L. 2005. Potential role of *Diploscapter* sp. strain LKC25, a bacterivorous nematode from soil, as a vector of food-borne pathogenic bacteria to preharvest fruits and vegetables. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2433-2437.
139. Glass, K.A., Loeffelholz, J.M., Ford, J.P. et Doyle, M.P. 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Appl Environ Microbiol*. **58**: 2513-2516.
140. Gong, C.M., Koichi, I., Shunji, I. et Takashi, S. 2005. Survival of pathogenic bacteria in compost with special reference to *Escherichia coli*. *J Environ Sci (China)* **17**: 770-774.
141. Gough, J.M., Conlan, L.L., Denman, S.E., Krause, D.O., Smith, W.J., Williamson, M.A. et McSweeney, C.S. 2006. Screening of bacteria from the cattle gastrointestinal tract for inhibitory activity against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, O111:H-, and O26:H11. *J Food Prot* **69**: 2843-2850.
142. Greatorex, J.S. et Thorne, G.M. 1994. Humoral immune responses to Shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. *J Clin Microbiol* **32**: 1172-1178.
143. Griffin, P., Mead, P., Van Gilder, T., Hunter, S., Strockbine, N. et Tauxe, R. 2000. Shiga Toxin-producing *E. coli* infections in the United States: current status and

challenges. In: 4th International Symposium and Workshop on "Shiga-toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections (october 29-November 2, 2000), Kyoto, Japan.

- 144. Griffin, P.M.** 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and othr entrohorrhagic *Escherichia coli*. In: Infectious of the Gastrointestinal Tract/Ed. par Blaser MJ, Smith PD, Radvin JI, Greenberg HB, Guerrant RL. New York: Raven Press, 739-758.
- 145. Griffin, P.M.** 1998. Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections in the United-States. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains / Ed. par Kaper JB et O'Brien A.D. Washington, DC:. Am Soc for Microbiol, 15-22.
- 146. Griffin, P.M., Olmstead, L.C. et Petras, R.E.** 1990. *Escherichia coli* O157:H7-associated colitis. A clinical and histological study of 11 cases. *Gastroenterology* **99**: 142-149.
- 147. Griffin, P.M. et Tauxe, R.V.** 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.
- 148. Grimont, P.** 1987. Taxonomie des *Escherichia*. *Méd Mal Infect*, 6-10.
- 149. Haeghebaert, S., Vaillant, V., Bouvet, P., Grimont, F. et le réseau des néphrologues pédiatres,** 2003. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2001. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, soumis pour publication.
- 150. Hancock, D., Besser, T., Lejeune, J., Davis, M. et Rice, D.** 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *Int J Food Microbiol* **66**: 71-78.
- 151. Hancock, D.D., Besser, T.E. et Rice, D.H.** 1998a. Ecology of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle and impact of management practices. In *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin-producing *E. coli* strains ed. Kaper J.B. and O'Brien A.D. Washington: ASM Press, 85-91.
- 152. Hancock, D.D., Besser, T.E., Rice, D.H., Ebel, E.D., Herriott, D.E. et Carpenter, L.V.** 1998b. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. *Prev Vet Med* **35**: 11-19.
- 153. Hancock, D.D., Besser, T.E., Rice, D.H., Herriott, D.E. et Tarr, P.I.** 1997. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiol Infect* **118**: 193-195.

154. Hara-Kudo, Y., Kobayashi, A., Sugita-Konishi, Y. et Kondo, K., 2004. Antibacterial activity of plants used in cooking for aroma and taste. *J Food Prot* **67**: 2820-2824.
155. Harrison, S. et Kinra, S. 2004. Outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a busy bathing beach. *Commun Dis Public Health* **7**: 47-50.
156. Heinonen, H., Mohaibes, M., Karinen, P. et Koivunen, J. 2006. Methods to reduce pathogen microorganisms in manure. *Livestock Science* **102**: 248-255.
157. Heuvelink, A.E., van den Biggelaar, F.L., Zwartkruis-Nahuis, J., Herbes, R.G., Huyben, R., Nagelkerke, N., Melchers, W.J., Monnens, L.A. et De Boer, E. 1998. Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. *J Clin Microbiol* **36**: 3480-3487.
158. Hilborn, E.D., Mermin, J.H., Mshar, P.A., Hadler, J.L., Voetsch, A., Wojtkunski, C., Swartz, M., Mshar, R., Lambert-Fair, M.A., Farrar, J.A., Glynn, M.K. et Slutsker, L. 1999. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Arch Intern Med* **159**: 1758-1764.
159. Hildebrand, J.M., Maguire, H.C., Holliman, R.E. et Kangesu, E. 1996. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection linked to paddling pools. *Commun Dis Rep CDR Rev* **6**: 33-36.
160. Himathongkham, S., Bahari, S., Riemann, H. et Cliver, D. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in cow manure and cow manure slurry. *FEMS Microbiol Lett* **178**: 251-257.
161. Himathongkham, S., Riemann, H., Bahari, S., Nuanualsuwan, S., Kass, P. et Cliver, D.O. 2000. Survival of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in poultry manure and manure slurry at sublethal temperatures. *Avian Dis* **44**: 853-860.
162. Hofmann, S.L. 1993. Southwestern Internal Medicine Conference: Shiga-like toxins in hemolytic-uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Med Sci* **306**: 398-406.
163. Holme, R. 2003. Drinking water contamination in Walkerton, Ontario: positive resolutions from a tragic event. *Water Sci Technol* **47**: 1-6.
164. Hornitzky, M.A., Vanselow, B.A., Walker, K., Bettelheim, K.A., Corney, B., Gill, P., Bailey, G. et Djordjevic, S.P. 2002. Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian cattle. *Appl Environ Microbiol* **68**: 6439-6445.

165. Hovde, C.J., Austin, P.R., Cloud, K.A., Williams, C.J. et Hunt, C.W. 1999. Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157:H7 acid resistance. Appl Environ Microbiol **65**: 3233-3235.
166. Hrudehy, S.E., Payment, P., Huck, P.M., Gillham, R.W. et Hrudehy, E.J. 2003. A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. Water Sci Technol **47**: 7-14.
167. Hsu, W.Y., Simonne, A. et Jitareerat, P. 2006. Fates of seeded *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on selected fresh culinary herbs during refrigerated storage. J Food Prot **69**: 1997-2001.
168. Hurley, B.P., Jacewicz, M., Thorpe, C.M., Lincicome, L.L., King, A.J., Keusch, G.T. et Acheson, D.W. 1999. Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. Infect Immun **67**: 6670-6677.
169. Hussein, H.S. et Bollinger, L.M. 2005. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. J Food Prot **68**: 2224-2241.
170. Hussein, H.S. et Sakuma, T. 2005a. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. J Dairy Sci **88**: 450-465.
171. Hussein, H.S. et Sakuma, T. 2005b. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: pre- and postharvest control measures to ensure safety of dairy cattle products. J Food Prot **68**: 199-207.
172. Hutchison, M.L., Walters, L.D., Avery, S.M., Munro, F. et Moore, A. 2005. Analyses of livestock production, waste storage, and pathogen levels and prevalences in farm manures. Appl Environ Microbiol **71**: 1231-1236.
173. Ibekwe, A.M., Watt, P.M., Grieve, C.M., Sharma, V.K. et Lyons, S.R. 2002. Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy wastewater wetlands. Appl Environ Microbiol **68**: 4853-4862.
174. Ibekwe, A.M., Watt, P.M., Shouse, P.J. et Grieve, C.M. 2004. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in irrigation water on soils and plants as validated by culture method and real-time PCR. Can J Microbiol **50**: 1007-1014.
175. Ihekweazu, C., Barlow, M., Roberts, S., Christensen, H., Guttridge, B., Lewis, D. et Paynter, S. 2006. Outbreak of *E. coli* O157 infection in the south west of the UK: risks from streams crossing seaside beaches. Euro Surveill **11**: 128-130.
176. Islam, M., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P. et Jiang, X. 2004a. 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. J Food Prot 67: 1365-1370.

177. Islam, M., Morgan, J., Doyle, M.P. et Jiang, X. 2004b. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure compost-amended soil and on carrots and onions grown in an environmentally controlled growth chamber. J Food Prot 67: 574-578.
178. Ismaili, A., Philpott, D.J., Dytoc, M.T. et Sherman, P.M. 1995. Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Infect Immun 63: 3316-3326.
179. Isnansetyo, A., Cui, L., Hiramatsu, K. et Kamei, Y. 2003. Antibacterial activity of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga, against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents 22: 545-547.
180. Itoh, Y., Sugita-Konishi, Y., Kasuga, F., Iwaki, M., Hara-Kudo, Y., Saito, N., Noguchi, Y., Konuma, H. et Kumagai, S. 1998. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. Appl Environ Microbiol 64: 1532-1535.
181. Iyoda, S., Tamura, K., Itoh, K., Izumiya, H., Ueno, N., Nagata, K., Togo, M., Terajima, J. et Watanabe, H. 2000. Inducible *stx2* phages are lysogenized in the enteroaggregative and other phenotypic *Escherichia coli* O86:HNM isolated from patients. FEMS Microbiol Lett 191: 7-10.
182. Jablasone, J., Warriner, K. et Griffiths, M. 2005. Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. Int J Food Microbiol 99: 7-18.
183. Jackson, S.G., Goodbrand, R.B., Johnson, R.P., Odorico, V.G., Alves, D., Rahn, K., Wilson, J.B., Welch, M.K. et Khakhria, R. 1998. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. Epidemiol Infect 120: 17-20.
184. Jamieson, R.C., Gordon, R.J., Sharples, K.E., Stratton, G.W. et Madani, A. 2002. Movement and persistence of fecal bacteria in agricultural soils and subsurface drainage water: A review. Can Biosyst Engin 44: 1.1-1.9.
185. Janes, M.E., Kim, K.S. et Johnson, M.G. 2005. Transmission electron microscopy study of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple tissue. J Food Prot 68: 216-224.

186. **Jarvis, K.G. et Kaper, J.B.** 1996. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun* **64**: 4826-4829.
187. **Jenkins, C., Perry, N.T., Cheasty, T., Shaw, D.J., Frankel, G., Dougan, G., Gunn, G.J., Smith, H.R., Paton, A.W. et Paton, J.C.** 2003. Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *J Clin Microbiol* **41**: 1775-1778.
188. **Jerse, A.E., Gicquelais, K.G. et Kaper, J.B.** 1991. Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **59**: 3869-3875.
189. **Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D. et Kaper, J.B.** 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 7839-7843.
190. **Jeter, C. et Matthyse, A.G.** 2005. Characterization of the binding of diarrheagenic strains of *E. coli* to plant surfaces and the role of curli in the interaction of the bacteria with alfalfa sprouts. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 1235-1242.
191. **Jiang, X., Morgan, J. et Doyle, M.P.** 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2605-2609.
192. **Jiang, X., Morgan, J. et Doyle, M.P.** 2003a. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during composting of bovine manure in a laboratory-scale bioreactor. *J Food Prot* **66**: 25-30.
193. **Jiang, X., Morgan, J. et Doyle, M.P.** 2003b. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in cow manure compost. *J Food Prot* **66**: 1771-1777.
194. **Johannessen, G.S., Bengtsson, G.B., Heier, B.T., Bredholt, S., Wasteson, Y. et Rorvik, L.M.** 2005. Potential uptake of *Escherichia coli* O157:H7 from organic manure into crisphead lettuce. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2221-2225.
195. **Johannessen, G.S., Froseth, R.B., Solemdal, L., Jarp, J., Wasteson, Y. et Rorvik, L.** 2004. Influence of bovine manure as fertilizer on the bacteriological quality of organic Iceberg lettuce. *J Appl Microbiol* **96**: 787-794.
196. **Jonsson, M.E., Aspan, A., Eriksson, E. et Vagsholm, I.** 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. *Int J Food Microbiol* **66**: 55-61.
197. **Juteau, P.** 2006. Review of the use of aerobic thermophilic bioprocesses for the treatment of swine waste. *Livestock Science* **102**: 187-196.

198. **Kaper, J.B., Nataro, J.P. et Mobley, H.L.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology 2: 123-140.
199. **Karch, H., Russmann, H., Schmidt, H., Schwarzkopf, A. et Heesemann, J.** 1995. Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. J Clin Microbiol 33: 1602-1605.
200. **Karmali, M.A., Petric, M. et Bielaszewska, M.** 1999. Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F assay) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxins) in *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 37: 396-399.
201. **Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M. et Lim, C.** 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet 1: 619-620.
202. **Kassenborgh, H., Hedberg, C., Evans, M., Chin, G., Fiorentino, T.R., Vugia, D., Bardsley, M., Slutsker, L. et Griffin, P.M.** 1998. Case-control study of sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infections in 5 Foodnet Sites. In: 1st International Conference on Emerging Infectious Diseases, March 1998 Atlanta, Georgia-USA.
203. **Kauffmann, F.** 1947. The serology of the *E. coli* group. J Immun 57: 71-100.
204. **Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D. et Defago, G.** 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. Mol Plant-Microbe Interact 5: 4-13.
205. **Keene, W.E., McAnulty, J.M., Hoesly, F.C., Williams, L.P., Jr., Hedberg, K., Oxman, G.L., Barrett, T.J., Pfaller, M.A. et Fleming, D.W.** 1994. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. N Engl J Med 331: 579-584.
206. **Kennedy, M.H., Rabatsky-Ehr, T., Thomas, S.M., Lance-Parker, S., Molhe-Boetani, J., Smith, K., Keene, W., Sparling, P., Hardnett, F.P. et Mead, P.** 2002. Risk factors for sporadic *Escherichia coli*O157 infections in the United States: a case control study in Foodnet Sites 1999-2000. In: International Conference of Emerging Infectious Diseases, 24-27 march 2002 Atlanta, Georgia - USA.
207. **Kenney, S.J., Anderson, G.L., Williams, P.L., Millner, P.D. et Beuchat, L.R.** 2005. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella newport*, and *Salmonella poona* in the gut of a free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*, and transmission to progeny and uninfected nematodes. Int J Food Microbiol 101: 227-236.

208. **Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A. et Finlay, B.B.** 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**: 511-520.
209. **Kerr, M., Fitzgerald, M., Sheridan, J.J., McDowell, D.A. et Blair, I.S.** 1999. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in bottled natural mineral water. *J Appl Microbiol* **87**: 833-841.
210. **Kim, S.H. et Kim, Y.H.** 2004. *Escherichia coli* O157:H7 adherence to HEp-2 cells is implicated with curli expression and outer membrane integrity. *J Vet Sci* **5**: 119-124.
211. **King, C.H., Shotts, E.B., Wooley, R.E. et Porter, K.G.** 1998. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl Environ Microbiol* **54**: 3023-3033.
212. **Kobayashi, H., Shimada, J., Nakazawa, M., Morozumi, T., Pohjanvirta, T., Pelkonen, S. et Yamamoto, K.** 2001. Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl Environ Microbiol* **67**: 484-489.
213. **Kogure, K. et Ikemoto, E.** 1997. Wide occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in natural freshwater environment. *Nippon Saikingaku Zasshi* **52**: 601-607.
214. **Konowalchuk, J., Speirs, J.I. et Stavric, S.** 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **18**: 775-779.
215. **Kovacs, M.J., Roddy, J., Gregoire, S., Cameron, W., Eidus, L. et Drouin, J.** 1990. Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *Am J Med* **88**: 177-179.
216. **Kudva, I.T., Blanch, K. et Hovde, C.J.** 1998. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3166-3174.
217. **Kuhnert, P., Dubosson, C.R., Roesch, M., Homfeld, E., Doherr, M.G. et Blum, J.W.** 2005. Prevalence and risk-factor analysis of Shiga toxigenic *Escherichia coli* in faecal samples of organically and conventionally farmed dairy cattle. *Vet Microbiol* **109**: 37-45.
218. **Laaberki, M.H., Janabi, N., Oswald, E. et Repoila, F.** 2006. Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS. *Int J Med Microbiol* **296**: 197-210.
219. **Lau, M.M. et Ingham, S.C.** 2001. Survival of faecal indicator bacteria in bovine manure incorporated into soil. *Lett Appl Microbiol* **33**: 131-136.

220. **Le Minor, L., Popoff, M.Y. et Bockemuhl, J.** 1990. Supplement 1989 to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* **141**: 1173-1177.
221. **Lea, N., Lord, J.M. et 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* **145**: 999-1004.
222. **Lee, J.E., Kim, J.S., Choi, I.H., Tagawa, M., Kohsaka, T. et Jin, D.K.** 2002a. Cytokine expression in the renal tubular epithelial cells stimulated by Shiga toxin 2 of *Escherichia coli* O157:H7. *Ren Fail* **24**: 567-575.
223. **Lee, S.H., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J. et Calderon, R.L.** 2002b. Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1999-2000. *MMWR Surveill Summ* **51**: 1-47.
224. **LeJeune, J.T., Besser, T.E. et Hancock, D.D.** 2001a. Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3053-3057.
225. **LeJeune, J.T., Besser, T.E., Merrill, N.L., Rice, D.H. et Hancock, D.D.** 2001b. Livestock drinking water microbiology and the factors influencing the quality of drinking water offered to cattle. *J Dairy Sci* **84**: 1856-1862.
226. **LeJeune, J.T. et Wetzel, A.N.** 2007. Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle. *J Anim Sci* **85**: 73-80.
227. **Lema, M., Williams, L. et Rao, D.R.** 2001. Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. *Small Rumin Res* **39**: 31-39.
228. **Lerman, Y., Cohen, D., Gluck, A., Ohad, E. et Sechter, I.** 1992. A cluster of cases of *Escherichia coli* O157 infection in a day-care center in a communal settlement (Kibbutz) in Israel. *J Clin Microbiol* **30**: 520-521.
229. **Leroux, J.** 2003. Evaluation économique de l'épandage, AEAG.
230. **Leung, P.H., Peiris, J.S., Ng, W.W., Robins-Browne, R.M., Bettelheim, K.A. et Yam, W.C.** 2003. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7549-7553.
231. **Levasseur, P. et Dutréme, S.** 2007. Hygiénisation des effluents d'élevage porcin. *Techni Porc* **30**: 1-5.
232. **Levine, M.M.** 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* **155**: 377-389.

233. Levine, M.M. et Edelman, R. 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiologic Reviews* **6**: 31-51.
234. Liang, J.L., Dziuban, E.J., Craun, G.F., Hill, V., Moore, M.R., Gelting, R.J., Calderon, R.L., Beach, M.J. et Roy, S.L. 2006. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with drinking water and water not intended for drinking--United States, 2003-2004. *MMWR Surveill Summ* **55**: 31-65.
235. Lin, J., Smith, M.P., Chapin, K.C., Baik, H.S., Bennett, G.N. et Foster, J.W. 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3094-3100.
236. Lindgren, S.W., Melton, A.R. et O'Brien, A.D. 1993. Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. *Infect Immun* **61**: 3832-3842.
237. Lingwood, C.A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J.L., De Grandis, S. et Karmali, M. 1987. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem* **262**: 8834-8839.
238. Lio, J.C. et Syu, W.J. 2004. Identification of a negative regulator for the pathogenicity island of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Biomed Sci* **11**: 855-863.
239. Lisle, J.T., Broadway, S.C., Prescott, A.M., Pyle B.P., Fricker, C. et Feters, G.A. 1998. Effects of starvation on physiological activity and chlorine disinfection resistance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied Env Microbiol* **64**: 4658-4662.
240. Loirat, C., Baudouin, V., Sonsino, E., Mariani-Kurkdjian, P. et Elion, J. 1992. Syndrome Hémolytique et Urémique de l'enfant : aspects cliniques, étiologiques, éléments du pronostic et résultats thérapeutiques, In: Flammarion-Médecine-Sciences (Ed.) *Actualités Néphrologiques de l'Hopital Necker*. Paris, pp. 133-158.
241. Lopez, E.L., Diaz, M., Grinstein, S., Devoto, S., Mendilaharsu, F., Murray, B.E., Ashkenazi, S., Ruboglio, E., Woloj, M., Vasquez, M., et al. 1989. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *J Infect Dis* **160**: 469-475.
242. Louie, M., Read, S., Louie, L., Ziebell, K., Rahn, K., Borczyk, A. et Lior, H. 1999. Molecular typing methods to investigate transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from cattle to humans. *Epidemiol Infect* **123**: 17-24.

243. Louise, C.B. et Obrig, T.G. 1995. Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7 derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J Infect Dis* **172**: 1397-1401.
244. Lu, Y., Iyoda, S., Satou, H., Itoh, K., Saitoh, T. et Watanabe, H. 2006. A new immunoglobulin-binding protein, EibG, is responsible for the chain-like adhesion phenotype of locus of enterocyte effacement-negative, shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **74**: 5747-5755.
245. Ludwig, K., Petric, M., Blanchette, V. et Karmali, M. 1998. Isolated thrombocytopenic purpura associated with infection due to verocytotoxin (Shiga toxin)-producing *Escherichia coli* serotype O26:H11. *Clin Infect Dis* **27**: 660-661.
246. Lung, A.J., Lin, C.M., Kim, J.M., Marshall, M.R., Nordstedt, R., Thompson, N.P. et Wei, C.I. 2001. Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in cow manure composting. *J Food Prot* **64**: 1309-1314.
247. Mailles, A., Vernozy-Rozand, C., Mariani-Kurkdjian, P., Rappoport, M., Pihier, N., Dufraisie, M.P., Charron, M., Perret, F., Horen, B., Doireau, V., Naud, J., Grimont, F., Llanas, B., Espié, E. et Vaillant, V. 2006. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection linked to consumption of ground beef, France, 2005. In Abstract of the 6th International Symposium on Shigatoxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections, Melbourne.
248. Mannix, M., O'Connell, N., McNamara, E., Fitzgerald, A., Prendiville, T., Norris, T., Greally, T., Fitzgerald, R., Whyte, D., Barron, D., Monaghan, R., Whelan, E., Carroll, A., Curtin, A., Collins, C., Quinn, J., O'Dea, F., O'Riordan, M., Buckley, J., McCarthy, J. et Mc Keown, P. 2005. Large *E. coli* O157 outbreak in Ireland, October-November 2005. *Euro Surveill* **10**, 51222-51223.
249. Mannix, M., Whyte, D., McNamara, E., N, O.C., Fitzgerald, R., Mahony, M., Prendiville, T., Norris, T., Curtin, A., Carroll, A., Whelan, E., Buckley, J., McCarthy, J., Murphy, M. et Greally, T. 2007. Large outbreak of *E. coli* O157 in 2005, Ireland. *Euro Surveill* **12**.
250. Martin, D.R., Uhler, P.M., Okrend, A.J.G. et Chill, J.Y. 1994. Testing of bob calf fecal swabs for the presence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot* **57**: 70-72.
251. Martinez, A., Oliva, J.M., Panella, E., Hernandez-Pezzi, G. et Soler, P. 2001. Outbreak of *E.coli* O157:H7 infection in Spain. *Eurosurveillance Weekly* **5**: 1-5.

252. **Matthews, K.R., Murdough, P.A. et Bramley, A.J.** 1997. Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol* **82**: 197-203.
253. **Maule, A.** 2000. Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* **88**: 71S-78S.
254. **McCarthy, T.A., Barrett, N.L., Hadler, J.L., Salsbury, B., Howard, R.T., Dingman, D.W., Brinkman, C.D., Bibb, W.F. et Cartter, M.L.** 2001. Hemolytic-Uremic Syndrome and *Escherichia coli* O121 at a Lake in Connecticut, 1999. *Pediatrics* **108**: E59.
255. **McGee, P., Bolton, D.J., Sheridan, J.J., Earley, B., Kelly, G. et Leonard, N.** 2002. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in farm water: its role as a vector in the transmission of the organism within herds. *J Appl Microbiol* **93**: 706-713.
256. **McGee, P., Bolton, D.J., Sheridan, J.J., Earley, B. et Leonard, N.** 2001. The survival of *Escherichia coli* O157:H7 in slurry from cattle fed different diets. *Lett Appl Microbiol* **32**: 152-155.
257. **McIntyre, L., Fung, J., Paccagnella, A., Isaac-Renton, J., Rockwell, F., Emerson, B. et Preston, T.** 2002. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with the ingestion of unpasteurized goat's milk in British Columbia, 2001. *Can Commun Dis Rep* **28**: 6-8.
258. **Mellies, J.L., Elliott, S.J., Sperandio, V., Donnenberg, M.S. et Kaper, J.B.** 1999. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (*ler*). *Mol Microbiol* **33**: 296-306.
259. **Meyer, K.J., Appletoft, C.M., Schwemm, A.K., Uzoigwe, J.C. et Brown, E.J.** 2005. Determining the source of fecal contamination in recreational waters. *J Environ Health* **68**: 25-30.
260. **Meyer-Broseta, S., Bastian, S.N., Arne, P.D., Cerf, O. et Sanaa, M.** 2001. Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157:H7. *Int J Hyg Environ Health* **203**: 347-361.
261. **Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A. et Yanagawa, H.** 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol* **150**: 787-796.
262. **Milne, L.M., Plom, A., Strudley, I., Pritchard, G.C., Crooks, R., Hall, M., Duckworth, G., Seng, C., Susman, M.D., Kearney, J., Wiggins, R.J., Mouldsdales,**

- M., Cheasty, T. et Willshaw, G.A.** 1999. *Escherichia coli* O157 incident associated with a farm open to members of the public. *Commun Dis Public Health* **2**: 22-26.
- 263. Misawa, N., Sueyoshi, M., Uemura, R., Kakemizu, Y., Kawashima, K., Nagatomo, H., Kondo, F., Murakami, T. et Takahashi, Y.** 2000. Effect of bicozamycin on the eradication of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in calves. *Microbiol Immunol* **44**: 891-896.
- 264. Misra, R.V., Roy, R.N. et Hiraoka, H.** 2005. Méthodes de compostage au niveau de l'exploitation agricole, Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. Documents de travail sur les terres et les eaux **2**: 1-48.
- 265. Miyagi, K., Takegaki, Y., Nakano, T., Nakano, Y., Honda, T. et Sano, K.** 2001. Survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in marine water and frequent detection of the Shiga toxin gene in marine water samples from an estuary port. *Epidemiol Infect* **126**: 129-133.
- 266. Mora, A., Blanco, J.E., Blanco, M., Alonso, M.P., Dhabhi, G., Echeita, A., Gonzalez, E.A., Bernardez, M.I. et Blanco, J.** 2005. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Res Microbiol* **156**: 793-806.
- 267. Morabito, S., Dell'Omo, G., Agrimi, U., Schmidt, H., Karch, H., Cheasty, T. et Caprioli, A.** 2001. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Vet Microbiol* **82**: 275-283.
- 268. Morabito, S., Karch, H., Mariani-Kurkdjian, P., Schmidt, H., Minelli, F., Bingen, E. et Caprioli, A.** 1998. Enterohaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **36**: 840-842.
- 269. Moreira, C.N., Pereira, M.A., Brod, C.S., Rodrigues, D.P., Carvalhal, J.B. et Aleixo, J.A.** 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Vet Microbiol* **93**: 179-183.
- 270. Morgan, D., Newman, C.P., Hutchinson, D.N., Walker, A.M., Rowe, B. et Majid, F.** 1993. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol Infect* **111**: 181-187.
- 271. Moschcowitz, E.** 1925. An acute febrile pleochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries. *Arch Intern Med* **36**: 89.

272. Mukherjee, A., Cho, S., Scheftel, J., Jawahir, S., Smith, K. et Diez-Gonzalez, F. 2006. Soil survival of *Escherichia coli* O157:H7 acquired by a child from garden soil recently fertilized with cattle manure. *J Appl Microbiol* **101**: 429-436.
273. Muniesa, M. et Jofre, J. 1998. Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2443-2448.
274. Nagels, J.W., Davies-Colley, R.J., Donnison, A.M. et Muirhead, R.W. 2002. Faecal contamination over flood events in a pastoral agricultural stream in New Zealand. *Water Sci Technol* **45**: 45-52.
275. Nakanishi, N., Abe, H., Ogura, Y., Hayashi, T., Tashiro, K., Kuhara, S., Sugimoto, N. et Tobe, T. 2006. ppGpp with DksA controls gene expression in the locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* through activation of two virulence regulatory genes. *Mol Microbiol* **61**: 194-205.
276. Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201.
277. Naylor, S.W., Nart, P., Sales, J., Flockhart, A., Gally, D.L. et Low, J.C. 2007. Impact of the direct application of therapeutic agents to the terminal recta of experimentally colonized calves on *Escherichia coli* O157:H7 shedding. *Appl Environ Microbiol* **73**: 1493-1500.
278. Nicholls, L., Grant, T.H. et Robins-Browne, R.M. 2000. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol* **35**: 275-288.
279. Nicholson, F.A., Groves, S.J. et Chambers, B.J. 2005. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresour Technol* **96**: 135-143.
280. Nielsen, E.M., Tegtmeier, C., Andersen, H.J., Gronbaek, C. et Andersen, J.S. 2002. Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Danish dairy farms. *Vet Microbiol* **88**: 245-257.
281. Notz, R., Maurhofer, M., Schnider-Keel, U., Duffy, B., Haas, D. et Défago, G. 2001. Biotic factors affecting expression of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis gene *phlA* in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 in the rhizosphere. *Phytopathol* **91**: 873-881.

282. O'Brien, A.D., LaVeck, G.D., Thompson, M.R. et Formal, S.B. 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. J Infect Dis **146**: 763-769.
283. O'Brien, S.J., Adak, G.K. et Gilham, C. 2001a. Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. Emerg Infect Dis **7**: 1049-1051.
284. O'Brien, S.J., Murdoch, P.S., Riley, A.H., King, I., Barr, M., Murdoch, S., Greig, A., Main, R., Reilly, W.J. et Thomson-Carter, F.M. 2001b. A foodborne outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H-phage type 8 in hospital. J Hosp Infect **49**: 167-172.
285. Ogden, I.D., Hepburn, N.F., MacRae, M., Strachan, N.J., Fenlon, D.R., Rusbridge, S.M. et Pennington, T.H. 2002. Long-term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp. Lett Appl Microbiol **34**: 100-104.
286. Ogden, L.D., Fenlon, D.R., Vinten, A.J. et Lewis, D. 2001. The fate of *Escherichia coli* O157 in soil and its potential to contaminate drinking water. Int J Food Microbiol **66**: 111-117.
287. Ohya, T. et Ito, H. 1999. Experimental infection of calves with *Escherichia coli* O157:H7. J Vet Med Sci **61**: 1187-1189.
288. Ohya, T., Marubashi, T. et 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. J Vet Med Sci **62**: 1151-1155.
289. Olsen, S.J., Miller, G., Breuer, T., Kennedy, M., Higgins, C., Walford, J., McKee, G., Fox, K., Bibb, W. et Mead, P. 2002. A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. Emerg Infect Dis **8**: 370-375.
290. Omisakin, F., MacRae, M., Ogden, I.D. et Strachan, N.J. 2003. Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. Appl Environ Microbiol **69**: 2444-2447.
291. Orskov, F., Orskov, I. et Villar, J.A. 1987. Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Lancet **2**: 276.
292. Pachepsky, Y.A., Sadeghi, A.M., Bradford, S.A., Shelton, D.R., Guber, A.K. et Dao, T., 2006. Transport and fate of manure-borne pathogens: modeling perspective. Agricultural water management **86**: 81-92.

293. Pal, A., Ghosh, S., Ramamurthy, T., Yamasaki, S., Tsukamoto, T., Bhattacharya, S.K., Nair, G.B. et Takeda, Y. 1999. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* from healthy cattle in a semi-urban community in Calcutta, India. Indian J Med Res **110**: 83-85.
294. Pallen, M.J., Beatson, S.A. et Bailey, C.M. 2005. Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. BMC Microbiol **5**: 9.
295. Park, G.W. et Diez-Gonzalez, F. 2003. Utilization of carbonate and ammonia-based treatments to eliminate *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* DT104 from cattle manure. J Appl Microbiol **94**: 675-685.
296. Park, S., Worobo, R.W. et Durst, R.A. 2001. *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: a literature review. Crit Rev Biotechnol **21**: 27-48.
297. Parry, S.M. et Salmon, R.L. 1998. Sporadic STEC O157 infection: secondary household transmission in Wales. Emerg Infect Dis **4**: 657-661.
298. Paton, A.W., Ratcliff, R.M., Doyle, R.M., Seymour-Murray, J., Davos, D., Lanser, J.A. et Paton, J.C. 1996. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol **34**: 1622-1627.
299. Paton, A.W., Srimanote, P., Woodrow, M.C. et Paton, J.C. 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infect Immun **69**: 6999-7009.
300. Paton, A.W., Voss, E., Manning, P.A. et Paton, J.C. 1997. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from cases of human disease show enhanced adherence to intestinal epithelial (Henle 407) cells. Infect Immun **65**: 3799-3805.
301. Paton, A.W., Woodrow, M.C., Doyle, R.M., Lanser, J.A. et Paton, J.C. 1999. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol **37**: 3357-3361.
302. Paton, J.C. et Paton, A.W. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin Microbiol Rev **11**: 450-479.
303. Paunio, M., Pebody, R., Keskimäki, M., Kokki, M., Ruutu, P., Oinonen, S., Vuotari, V., Siitonen, A., Lahti, E. et Leinikki, P. 1999. Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. Epidemiol Infect **122**: 1-5.

304. Pavia, A.T., Nichols, C.R., Green, D.P., Tauxe, R.V., Mottice, S., Greene, K.D., Wells, J.G., Siegler, R.L., Brewer, E.D. et Hannon, D., et al. 1990. Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: clinical and epidemiologic observations. *J Pediatr* **116**: 544-551.
305. Pawar, D.M., Rossman, M.L. et Chen, J. 2005. Role of curli fimbriae in mediating the cells of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to attach to abiotic surfaces. *J Appl Microbiol* **99**: 418-425.
306. Pearce, M.C., Jenkins, C., Vali, L., Smith, A.W., Knight, H.I., Cheasty, T., Smith, H.R., Gunn, G.J., Woolhouse, M.E., Amyes, S.G. et Frankel, G. 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. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1708-1716.
307. Pebody, R.G., Furtado, C., Rojas, A., McCarthy, N., Nylen, G., Ruutu, P., Leino, T., Chalmers, R., de Jong, B., Donnelly, M., Fisher, I., Gilham, C., Graverson, L., Cheasty, T., Willshaw, G., Navarro, M., Salmon, R., Leinikki, P., Wall, P. et Bartlett, C. 1999. An international outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection amongst tourists; a challenge for the European infectious disease surveillance network. *Epidemiol Infect* **123**: 217-223.
308. Peigné, J. et Girardin, P. 2001. Compostage et environnement. *Alter Agri* **49**: 5-10.
309. Pell, A.N. 1997. Manure and microbes: public and animal health problem? *J Dairy Sci* **80**, 2673-2681.
310. Peterson, R.E., Klopfenstein, T.J., Erickson, G.E., Folmer, J., Hinkley, S., Moxley, R.A. et Smith, D.R. 2007. Effect of *Lactobacillus acidophilus* strain NP51 on *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding and finishing performance in beef feedlot cattle. *J Food Prot* **70**: 287-291.
311. Phillips, A.D. et Frankel, G. 2000. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis* **181**: 1496-1500.
312. Pohl, P., Lintermans, B., Mainil, J. et Deprez, P. 1989. Production de vérocytotoxine par les *Escherichia coli* du porc. *Annales de Médecine Vétérinaire* **133**: 31-38.
313. Pradel, N., Boukhors, K., Bertin, Y., Forestier, C., Martin, C. et Livrelli, V. 2001. Heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from

hemolytic-uremic syndrome patients, cattle, and food samples in central France. Appl Environ Microbiol **67**: 2460-2468.

314. Pradel, N., De Champs, C., Palcoux, J.B., Sirot, J., Forestier, C., Joly, B., Scheutz, F. et Livrelli, V. 2000. Verotoxin-producing *Escherichia coli* infections: study of its prevalence in children in the Auvergne region. Arch Pediatr **7 Suppl 3**: 544s-550s.
315. Price, S.B., Cheng, C.M., Kaspar, C.W., Wright, J.C., DeGraves, F.J., Penfound, T.A., Castanie-Cornet, M.P. et Foster, J.W. 2000. Role of *rpoS* in acid resistance and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. Appl Environ Microbiol **66**: 632-637.
316. Proctor, M.E., Kurzynski, T., Koschmann, C., Archer, J.R. et Davis, J.P. 2002. Four strains of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from patients during an outbreak of disease associated with ground beef: importance of evaluating multiple colonies from an outbreak-associated product. J Clin Microbiol **40**: 1530-1533.
317. Public Health Agency of Canada, 2006. *E. coli* O157:H7 outbreak in the United States associated with bagged fresh spinach. Can Commun Dis Rep **32**: 272.
318. Public Health Agency of Canada, 2005. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a children's water spray park and identified by two rounds of pulsed-field gel electrophoresis testing. Can Commun Dis Rep **31**: 133-140.
319. Quadt-Hallman, A., Hallman, J. et Kloepper, J.W. 1997. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant associated bacteria. Can J Microbiol **43**: 577-582.
320. Rahn, K., Renwick, S.A., Johnson, R.P., Wilson, J.B., Clarke, R.C., Alves, D., McEwen, S., Lior, H. et Spika, J. 1997. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. Epidemiol Infect **119**: 251-259.
321. Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M. et Sverdlow, D.L. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. Emerg Infect Dis **11**: 603-609.
322. Raynaud, S. et Heuchel, V. 2005. Surveillance et maîtrise de la prévalence du portage des *Escherichia coli* productrices de Shiga-toxines (STEC) dans les élevages bovins - Recherche des moyens de prévention de la contamination du lait cru à la production. Compte rendu 150531001, Département technique d'élevage et qualité - Service lait.
323. Rebekka, R. et Artzaa, K. 2002. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in private drinking water wells: influences of protozoan grazing and elevated copper concentrations. FEMS Microbiol Lett **216**: 117-122.

324. Reid, S.D., Herbelin, C.J., Bumbaugh, A.C., Selander, R.K. et Whittam, T.S. 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* **406**: 64-67.
325. Reida, P., Wolff, M. et Pohls, H.W. 1994. An outbreak due to *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care center characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. *Zentralbl Bakteri* **281**: 534-543.
326. Rendon, M.A., Saldana, Z., Erdem, A.L., Monteiro-Neto, V., Vazquez, A., Kaper, J.B., Puente, J.L. et Giron, J.A. 2007. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 10637-10642.
327. Renwick, S.A., Wilson, J.B., Clarke, R.C., Lior, H., Borczyk, A., Spika, J.S., Rahn, K., McFadden, K., Brouwer, A., Copps, A. et al. 1994. Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and a human--Ontario. *Can Commun Dis Rep* **20**: 73-75.
328. Rice, E.W., Johnson, C.H., 2000. Short communication: survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle drinking water. *J Dairy Sci* **83**: 2021-2023.
329. Rice, E.W., Johnson, C.H., Wild, D.K. et Reasoner, D.J. 1992. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in drinking water associated with a waterborne disease outbreak of hemorrhagic colitis. *Lett Appl Microbiol* **15**: 38-40.
330. Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A. et Cohen, M.L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **308**: 681-685.
331. Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N. et Leotta, G.A. 2006. The epidemiology of hemolytic uremic syndrome in Argentina. Diagnosis of the etiologic agent, reservoirs and routes of transmission. *Medicina (B Aires)* **66 Suppl 3**: 27-32.
332. Roberts, C.L., Mshar, P.A., Cartter, M.L., Hadler, J.L., Sosin, D.M., Hayes, P.S. et Barrett, T.J. 1995. The role of heightened surveillance in an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol and Infect* **115**: 447-454.
333. Rugbjerg, H., Nielsen, E.M. et Andersen, J.S. 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.
334. Ryu, J.H., Kim, H. et Beuchat, L.R. 2004. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. *J Food Prot* **67**: 2123-2131.

335. **Ryu, J.H. et Beuchat, L.R.** 2005. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Appl Environ Microbiol* **71**: 247-254.
336. **Savarino, S.J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., Bhan, M.K., Levine, M.M. et Fasano, A.** 1996. Enteraggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteraggregative *E. coli*. *J Infect Dis* **173**: 1019-1022.
337. **Scaife, H.R., Cowan, D., Finney, J., Kinghorn-Perry, S.F. et Crook, B.** 2006. Wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as potential carriers of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Vet Rec* **159**: 175-178.
338. **Schamberger, G.P., Phillips, R.L., Jacobs, J.L. et Diez-Gonzalez, F.** 2004. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing *E. coli* to feed. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6053-6060.
339. **Schmidt, H., Beutin, L. et Karch, H.** 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* **63**: 1055-1061.
340. **Schmidt, H. et Karch, H.** 1996. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic- uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **34**: 2364-2367.
341. **Schouten, J.M., Graat, E.A., Frankena, K., van de Giessen, A.W., van der Zwaluw, W.K. et De Jong, M.C.** 2005. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in cattle of a Dutch dairy farm and in the farm environment. *Vet Microbiol* **107**: 193-204.
342. **Schuenzel, K.M. et Harrison, M.A.** 2002. Microbial antagonists of foodborne pathogens on fresh, minimally processed vegetables. *J Food Prot* **65**: 1909-1915.
343. **Schuller, S., Frankel, G. et 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. *Cell Microbiol* **6**: 289-301.
344. **Scott, L., McGee, P., Sheridan, J.J., Earley, B. et Leonard, N.** 2006. A comparison of the survival in feces and water of *Escherichia coli* O157:H7 grown under laboratory conditions or obtained from cattle feces. *J Food Prot* **69**: 6-11.
345. **Seo, K.H. et Frank, J.F.** 1999. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. *J Food Prot* **62**: 3-9.

346. Sharp, J.C., Ritchie, L.D., Curnow, J. et Reid, T.M. 1994. High incidence of haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157 in one Scottish town: clinical and epidemiological features. *J Infect* **29**: 343-350.
347. Sheng, H., Knecht, H.J., Kudva, I.T. et Hovde, C.J. 2006. Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5359-5366.
348. Shere, J.A., Bartlett, K.J. et Kaspar, C.W. 1998. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1390-1399.
349. Shukla, R., Slack, R., George, A., Cheasty, T., Rowe, B. et Scutter, J. 1994. *Escherichia coli* O157 infection associated with a farm visitor centre. *Commun Dis Rep CDR Rev* **5**: 86-90.
350. Siegler, R.L. 1995. The hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Clin North Am* **42**: 1505-1529.
351. Sjogren, R.E. 1994. Prolonged survival of an environmental *Escherichia coli* in laboratory soil microcosms. *Water Air Soil Pollut* **75**: 389-403.
352. Smith, A., Reacher, M., Smerdon, W., Adak, G.K., Nichols, G. et Chalmers, R.M. 2006. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. *Epidemiol Infect* **134**: 1141-1149.
353. Smith, D., Blackford, M., Younts, S., Moxley, R., Gray, J., Hungerford, L., Milton, T. et Klopfenstein, T. 2001. Ecological relationships between the prevalence of cattle shedding *Escherichia coli* O157:H7 and characteristics of the cattle or conditions of the feedlot pen. *J Food Prot* **64**: 1899-1903.
354. Smith, H.R., Rowe, B., Adak, G. et Reilly, W. 1998. Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections in the United Kingdom. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains / Ed. par Kaper JB et O'Brien A.D. Washington, DC. Am Soc for Microbiol, 49-58.
355. Smith, K., Swanson, E., Wagstrom, E., Leano, F., Boxrud, D., Adams, J., Besser, J., Danila et R., Hull, H.F. 2002. Three outbreaks of *E. coli* O157 infections due to retail ground beef in Minnesota, 2000 : detection, investigation and characteristics. In: 3rd International Conference of Emerging Infectious Diseases, March 2002 Atlanta, GA USA.

356. Soderstrom, A., Lindberg, A. et Andersson, Y. 2005. EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August-September 2005. *Euro Surveill* **10**: 50922-50921.
357. Soloaga, A., Veiga, M.P., Garcia-Segura, L.M., Ostolaza, H., Brasseur, R. et Goni, F.M. 1999. Insertion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol Microbiol* **31**: 1013-1024.
358. Solomon, E.B. et Matthews, K.R. 2005. Use of fluorescent microspheres as a tool to investigate bacterial interactions with growing plants. *J Food Prot* **68**: 870-873.
359. Solomon, E.B., Potenski, C.J. et Matthews, K.R. 2002a. Effect of irrigation method on transmission to and persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. *J Food Prot* **65**: 673-676.
360. Solomon, E.B., Yaron, S. et Matthews, K.R. 2002b. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl Environ Microbiol* **68**: 397-400.
361. Sperandio, V., Kaper, J.B., Bortolini, M.R., Neves, B.C., Keller, R. et Trabulsi, L.R. 1998. Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. *FEMS Microbiol Lett* **164**: 133-139.
362. Sperandio, V., Li, C.C. et Kaper, J.B. 2002. Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. *Infect Immun* **70**: 3085-3093.
363. Sperandio, V., Torres, A.G., Giron, J.A. et Kaper, J.B. 2001. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **183**: 5187-5197.
364. Stephan, R. et Untermann, F. 1999. Virulence Factors and Phenotypical Traits of Verotoxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Asymptomatic Human Carriers. *J Clin Microbiol* **37**: 1570-1572.
365. Stevenson, J. et Hanson, S. 1996. Outbreak of *Escherichia coli* O157 phage type 2 infection associated with eating precooked meats. *Commun Dis Rep CDR Rev* **6**: 116-118.

366. Stine, S.W., Song, I., Choi, C.Y. et Gerba, C.P. 2005. Effect of relative humidity on preharvest survival of bacterial and viral pathogens on the surface of cantaloupe, lettuce, and bell peppers. *J Food Prot* **68**: 1352-1358.
367. Strachan, N.J., Dunn, G.M., Locking, M.E., Reid, T.M. et Ogden, I.D. 2006. *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *Int J Food Microbiol* **112**: 129-137.
368. Strauch, D. 1991. Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. *Rev Sci Tech* **10**: 813-846.
369. Strockbine, N.A., Jackson, M.P., Sung, L.M., Holmes, R.K. et O'Brien, A.D. 1988. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol* **170**: 1116-1122.
370. Strockbine, N.A., Marques, L.R., Newland, J.W., Smith, H.W., Holmes, R.K. et O'Brien, A.D. 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun* **53**: 135-140.
371. Su, C. et Brandt, L.J. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. *Ann Intern Med* **123**: 698-714.
372. Sugiyama, A., Iwade, Y., Akachi, S., Nakano, Y., Matsuno, Y., Yano, T., Yamauchi, A., Nakayama, O., Sakai, H., Yamamoto, K., Nagasaka, Y., Nakano, T., Ihara, T. et Kamiya, H. 2005. An outbreak of Shigatoxin-producing *Eshcherichia coli* O157:H7 in a nursery school in Mie Prefecture. *Jpn J Infect Dis* **58**: 398-400.
373. Swerdlow, D.L. et Griffin, P.M. 1997. Duration of faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 among children in day-care centres. *Lancet* **349**: 745-746.
374. Synge, B.A., Chase-Topping, M.E., Hopkins, G.F., McKendrick, I.J., Thomson-Carter, F., Gray, D., Rusbridge, S.M., Munro, F.I., Foster, G. et Gunn, G.J. 2003. Factors influencing the shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 by beef suckler cows. *Epidemiol Infect* **130**: 301-312.
375. Takeuchi, K., Hassan, A.N. et Frank, J.F. 2001. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce as influenced by modified atmosphere and temperature. *J Food Prot* **64**: 1820-1823.
376. Takeuchi, K., Matute, C.M., Hassan, A.N. et Frank, J.F. 2000. Comparison of the attachment of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Pseudomonas fluorescens* to lettuce leaves. *J Food Prot* **63**: 1433-1437.

377. **Tanji, Y., Shimada, T., Fukudomi, H., Miyanaga, K., Nakai, Y. et Unno, H.** 2005. Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. *J Biosci Bioeng* **100**: 280-287.
378. **Tarr, P.I.** 1995. *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin Infect Dis* **20**: 1-8.
379. **Tarr, P.I., Bilge, S.S., Vary, J.C., Jr., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Ward, T.R., Baylor, M.R. et Besser, T.E.** 2000. Iha : a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* **68**: 1400-1407.
380. **Tate, R.L.** 1978. Cultural and environmental factors affecting the longevity of *Escherichia coli* in histosols. *Appl Environ Microbiol* **35**: 925-929.
381. **Thorpe, C.M., Smith, W.E., Hurley, B.P. et Acheson, D.W.** 2001. Shiga toxins induce, superinduce, and stabilize a variety of C-X-C chemokine mRNAs in intestinal epithelial cells, resulting in increased chemokine expression. *Infect Immun* **69**: 6140-6147.
382. **Thran, B.H., Hussein, H.S., Hall, M.R. et Khaiboullina, S.F.** 2001. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef heifers grazing an irrigated pasture. *J Food Prot* **64**: 1613-1616.
383. **Thurston-Enriquez, J.A., Gilley, J.E. et Eghball, B.** 2005. Microbial quality of runoff following land application of cattle manure and swine slurry. *J Water Health* **3**: 157-171.
384. **Tkalcic, S., Zhao, T., Harmon, B.G., Doyle, M.P., Brown, C.A. et Zhao, P.** 2003. Fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in weaned calves following treatment with probiotic *Escherichia coli*. *J Food Prot* **66**: 1184-1189.
385. **Tomoyasu, T., Takaya, A., Handa, Y., Karata, K. et Yamamoto, T.** 2005. ClpXP controls the expression of LEE genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **253**: 59-66.
386. **Tozzi, A.E., Gorietti, S. et Caprioli, A.** 2001. Epidemiology of human infections by *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxin-producing *E. coli*. In: Duffy G, Garvey P, McDowell DA, editors. *Verocytotoxigenic Escherichia coli*. Food & Nutrition Press, Inc., Trumbull, 161-179.
387. **Trevena, W.B., Willshaw, G.A., Cheasty, T., Domingue, G. et Wray, C.** 1999. Transmission of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection from farm

animals to humans in Cornwall and west Devon. *Commun Dis Public Health* **2**: 263-268.

- 388. Trevisan, D., Vansteelant, J.Y. et Dorioz, J.M.** 2002. Survival and leaching of fecal bacteria after slurry spreading on mountain hay meadows: consequences for the management of water contamination risk. *Water Res* **36**: 275-283.
- 389. Tsai, N.P., Wu, Y.C., Chen, J.W., Wu, C.F., Tzeng, C.M. et Syu, W.J.** 2006. Multiple functions of l0036 in the regulation of the pathogenicity island of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochem J* **393**: 591-599.
- 390. Van Baale, M.J., Sargeant, J.M., Gnad, D.P., DeBey, B.M., Lechtenberg, K.F. et Nagaraja, T.G.** 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.
- 391. Van Donkersgoed, J., Berg, J., Potter, A., Hancock, D., Besser, T., Rice, D., LeJeune, J. et Klashinsky, S.** 2001. Environmental sources and transmission of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle. *Can Vet J* **42**: 714-720.
- 392. Vansteelant, J.Y.** 2004. Evaluation des risques de contamination microbiologiques liés aux épandages de matières organiques sur prairies de montagne. Thèse doc. Univ. Savoie, Chambéry.
- 393. Vernozy-Rozand, C. et Montet, M.P.** 2001. *Escherichia coli* O157:H7. Londres, Paris, New York: Tec et Doc, pp. 135.
- 394. Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., Lequerrec, F., Serillon, E., Tilly, B., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Bouvet, J., Mazuy-Cruchaudet, C. et Richard, Y.** 2002. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. *J Appl Microbiol* **93**: 473-478.
- 395. Vidovic, S. et Korber, D.R.** 2006. Prevalence of *Escherichia coli* O157 in Saskatchewan cattle: characterization of isolates by using random amplified polymorphic DNA PCR, antibiotic resistance profiles, and pathogenicity determinants. *Appl Environ Microbiol* **72**: 4347-4355.
- 396. Wachtel, M.R. et Charkowski, A.O.** 2002. Cross-contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot* **65**: 465-470.
- 397. Wachtel, M.R., Whitehand, L.C. et Mandrell, R.E.** 2002. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *J Food Prot* **65**: 18-25.

398. Wadolowski, E.A., Sung, L.M., Burris, J.A., Samuel, J.E. et O'Brien, A.D. 1990. Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II. *Infect Immun* **58**: 3959-3965.
399. Wang, C., Ramette, A., Punjasamarnwong, P., Zala, M., Natsch, A., Moënne-Loccoz, Y. et Défago, G. 2001. Cosmopolitan distribution of *phlD*-containing dicotyledonous crop-associated biocontrol pseudomonads of worldwide origin. *FEMS Microbiol Ecol* **37**: 105-116.
400. Wang, G. et Doyle, M.P. 1998. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *J Food Prot* **61**: 662-667.
401. Wang, G., Zhao, T. et Doyle, M.P. 1996. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2567-2570.
402. Warburton, D.W., Austin, J.W., Harrison, B.H. et Sanders, G. 1998. Survival and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated bottled water. *J Food Prot* **61**: 948-952.
403. Weller, D.M., Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Schroeder, K.L., De La Fuente, L., Blouin Bankhead, S., Allende Molar, R., Bonsall, R.F., Mavrodi, D.V. et Thomashow, L.S. 2007. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant Biol (Stuttg)* **9**: 4-20.
404. Wells, J.E., Berry, E.D. et Varel, V.H. 2005. Effects of common forage phenolic acids on *Escherichia coli* O157:H7 viability in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* **71**: 7974-7979.
405. Werber, D., Behnke, S.C., Fruth, A., Merle, R., Menzler, S., Glaser, S., Kreienbrock, L., Prager, R., Tschape, H., Roggentin, P., Bockemuhl, J. et Ammon, A. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Germany: different risk factors for different age groups. *Am J Epidemiol* **165**: 425-434.
406. Wetzel, A.N. et Lejeune, J.T. 2006. Clonal dissemination of *Escherichia coli* O157:H7 subtypes among dairy farms in northeast Ohio. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2621-2626.
407. Whittam, T.S., Wolfe, M.L., Wachsmuth, I.K., Orskov, F., Orskov, I. et Wilson, R.A. 1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun* **61**: 1619-1629.
408. Widiasih, D.A., Ido, N., Omoe, K., Sugii, S. et Shinagawa, K. 2004. Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from naturally infected cattle. *Epidemiol Infect* **132**: 67-75.

409. **Wieler, L.H., McDaniel, T.K., Whittam, T.S. et Kaper, J.B.** 1997. Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains. *FEMS Microbiol Lett* **156**: 49-53.
410. **Williams, A.P., Avery, L.M., Killham, K. et Jones, D.L.** 2007a. Persistence, dissipation, and activity of *Escherichia coli* O157:H7 within sand and seawater environments. *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 24-32.
411. **Williams, A.P., Avery, L.M., Killham, K. et Jones, D.L.** 2007b. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the rhizosphere of maize grown in waste-amended soil. *J Appl Microbiol* **102**: 319-326.
412. **Williams, A.P., Roberts, P., Avery, L.M., Killham, K. et Jones, D.L.** 2006. Earthworms as vectors of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and vermicomposts. *FEMS Microbiol Ecol* **58**: 54-64.
413. **Wilson, J.B., McEwen, S.A., Clarke, R.C., Leslie, K.E., Wilson, R.A., Waltner-Toews, D. et Gyles, C.L.** 1992. Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. *Epidemiol Infect* **108**: 423-439.
414. **Wilson, J.B., Renwick, S.A., Clarke, R.C., Rahn, K., Alves, D., Johnson, R.P., Ellis, A.G., McEwen, S.A., Karmali, M.A., Lior, H. et Spika, J.** 1998. Risk factors for infection with verocytotoxigenic *Escherichia coli* in cattle on Ontario dairy farms. *Prev Vet Med* **34**: 227-236.
415. **Wilson, J.B., Renwick, S.A., Clarke, R.C., Rahn, K., Alves, D., Johnson, R.P., Ellis, A.G., McEwen, S.A., Karmali, M.A., Lior, H. et Spika, J.** 2002. Risk factors for bovine infection with verocytotoxigenic *Escherichia coli* in Ontario, Canada. *Prev Vet Med* **16**: 159-170.
416. **Yaun, B.R., Sumner, S.S., Eifert, J.D. et Marcy, J.E.** 2003. Response of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 to UV energy. *J Food Prot* **66**: 1071-1073.
417. **Yoder, J.S., Blackburn, B.G., Craun, G.F., Hill, V., Levy, D.A., Chen, N., Lee, S.H., Calderon, R.L. et Beach, M.J.** 2004. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with recreational water--United States, 2001-2002. *MMWR Surveill Summ* **53**: 1-22.
418. **Younts-Dahl, S.M., Galyean, M.L., Loneragan, G.H., Elam, N.A. et Brashears, M.M.** 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. *J Food Prot* **67**: 889-893.

419. Younts-Dahl, S.M., Osborn, G.D., Galyean, M.L., Rivera, J.D., Loneragan, G.H. et Brashears, M.M. 2005. Reduction of *Escherichia coli* O157 in finishing beef cattle by various doses of *Lactobacillus acidophilus* in direct-fed microbials. J Food Prot **68**: 6-10.
420. Yuan, W.M. et Crawford, D.L. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. Appl Environ Microbiol **61**: 3119-3128.
421. Zhang, L., Chaudhuri, R.R., Constantinidou, C., Hobman, J.L., Patel, M.D., Jones, A.C., Sarti, D., Roe, A.J., Vlisidou, I., Shaw, R.K., Falciani, F., Stevens, M.P., Gally, D.L., Knutton, S., Frankel, G., Penn, C.W. et Pallen, M.J. 2004. Regulators encoded in the *Escherichia coli* type III secretion system 2 gene cluster influence expression of genes within the locus for enterocyte effacement in enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. Infect Immun **72**: 7282-7293.
422. Zhao, T., Doyle, M.P. et Besser, R.E. 1993. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. Appl Environ Microbiol **59**: 2526-2530.
423. Zhao, T., Doyle, M.P., Harmon, B.G., Brown, C.A., Mueller, P.O. et Parks, A.H. 1998. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. J Clin Microbiol **36**: 641-647.
424. Zhao, T., Doyle, M.P., Shere, J. et Garber, L. 1995. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. Appl Environ Microbiol **61**: 1290-1293.
425. Zhao, T., Zhao, P., West, J.W., Bernard, J.K., Cross, H.G. et Doyle, M.P. 2006. Inactivation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in rumen content- or feces-contaminated drinking water for cattle. Appl Environ Microbiol **72**: 3268-3273.
426. Zschock, M., Hamann, H.P., Kloppert, B. et Wolter, W. 2000. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. Lett Appl Microbiol **31**: 203-208.

RÉSUMÉ

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont considérés comme l'un des plus importants groupes de pathogènes émergents responsables de toxi-infections alimentaires. Depuis ces dix dernières années, l'environnement est de plus en plus incriminé dans les épidémies à EHEC. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la prévalence des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les exploitations laitières ainsi qu'à leur survie dans les effluents d'élevages et le sol.

Au sein des exploitations laitières, une grande diversité de souches STEC, capables de persister sur de nombreux supports (abreuvoirs, murs et sol des enclos, etc), a été observée. Dans les effluents d'élevages (fumier et lisier bovins non traités), la survie des STEC non-O157 a été évaluée à plus de 90 jours. Lorsque les tas de fumier sont retournés (pratique d'assainissement menée par les exploitants) la survie est de seulement 45 jours ; la température élevée au cœur des andains ($\geq 65^{\circ}\text{C}$) est associée au déclin important des STEC.

En ce qui concerne la survie dans les sols, nous avons montré qu'*in vitro* les souches STEC O26:H11 persistaient pendant plus d'une année dans différents types de sols mélangés à du fumier, même en présence de taux d'humidité faibles ($< 0,08 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ sol sec}$). La température ambiante (i.e. 20°C versus 4°C) est significativement associée ($P < 0,001$) à une inhibition marquée des STEC. *In situ*, la survie et le transfert des STEC dans le sol à partir de bouses naturellement contaminées ont également été évalués dans différentes stations d'un bassin versant d'altitude situé dans les Alpes du Nord. Les STEC sont capables de persister dans la matière fécale et sont détectés dans le sol rhizosphérique sous-jacent (jusqu'à 20 cm de profondeur) pendant environ 2 mois, jusqu'à la disparition complète des bouses.

Dans la rhizosphère, la survie des STEC peut être affectée par des populations microbiennes productrices de métabolites antibactériens. En prenant comme modèle de populations telluriques antagonistes, une souche de *Pseudomonas* productrice d'un antibiotique, le 2,4-diacétylphloroglucinol (Phl), aucun effet négatif de la production de cet antibiotique sur la survie d'*E. coli* O157:H7 dans la rhizosphère du blé n'a pu être cependant mis en évidence.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'environnement constituerait un réservoir important en STEC dont le contrôle passe notamment par le respect de mesures d'hygiène rigoureuses en exploitations.

Discipline : Diplôme de Doctorat d'Université

Mots clés : STEC, effluents d'élevages bovins, écologie, survie, transfert, sol.

Laboratoire de Recherche : Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle – Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon – 1, avenue Bourgelat – BP 83 – 69280 Marcy L'Etoile

ABSTRACT

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is one of the most important foodborne pathogens. During the last decade, cattle environment has frequently been implicated as the cause of EHEC outbreaks. This work aims to study the prevalence of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) cells on dairy farms, and their survival in cattle effluents and soil.

In dairy farms, a wide diversity of STEC strains, which were able to persist on various materials (water troughs, pen walls, soil, etc) was observed. In cattle effluents (untreated cattle manure and slurry), non-O157 STEC strains could be detected during more than 90 days. In turned manure heaps, the STEC survival is of only 45 days, and the high temperature recovered in the main body of the manure heaps ($\geq 65^{\circ}\text{C}$) is associated with the serious decrease of STEC cells number.

In vitro, STEC O26 strains were detected in various manure amended-soil types for at least 1 year, even in presence of low moisture levels (i.e. less than $0,08 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$ dry soil). The ambient temperature (i.e. 20°C versus 4°C) is significantly associated ($P < 0,001$) with the highest STEC count decline in all soils tested. *In situ*, the persistence of STEC and their transfer from naturally contaminated bovine feces to subsoil layers were determined in different pasture units of a high mountain watershed located in North Alps. STEC are able to persist in bovine feces, and to be transferred in subsoil layers at a depth up to 20 cm, over a period of approximately 2 months, until the fecal material had completely decayed.

In the rhizosphere, STEC survival may be affected by antibiotic-producing microbial populations. However, using a 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl)-producing *Pseudomonas* strain as a model of biocontrol rhizobacteria, any negative effect of the *Pseudomonas* production of Phl on *E. coli* O157:H7 survival in wheat rhizosphere was observed.

According to these results, cattle environment constitutes a second significant reservoir of STEC cells, and effective measures to prevent STEC cells entry into environment should be adopted.

Title: Ecology of Shigatoxins producing *Escherichia coli* (STEC) in cattle effluents and soil.

Keywords: STEC, ecology, soil, cattle effluents, transfer, survival

Research laboratory: Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle – Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon – 1, avenue Bourgelat – BP 83 – 69280 Marcy L’Etoile