



HAL
open science

Production des entérotoxines dans les fromages en fonction de la diversité phénotypique et génétique des souches de *Staphylococcus aureus*

H. Lamprell

► **To cite this version:**

H. Lamprell. Production des entérotoxines dans les fromages en fonction de la diversité phénotypique et génétique des souches de *Staphylococcus aureus*. Ingénierie des aliments. Université de Bourgogne, 2003. Français. NNT: . tel-02833611

HAL Id: tel-02833611

<https://hal.inrae.fr/tel-02833611>

Submitted on 7 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ecole Doctorale des Sciences de la vie et de la Santé



Thèse

Pour obtenir le diplôme de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Spécialité « Sciences des Aliments »

Helen LAMPRELL

**Production des entérotoxines dans les fromages
en fonction de la diversité phénotypique et génétique
des souches de *Staphylococcus aureus***

**Présentée à l'Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à
l'Alimentation**

Le 18 décembre 2003 devant le jury suivant :

M. Gautier	Professeur de Microbiologie, ENSA de Rennes	Président du Jury
M. Guéguen	Professeur de Microbiologie, Université de Caen	Rapporteur
M-C. Montel	Directeur de Recherches, INRA d'Aurillac	Rapporteur
A. Ayerbe	Directeur d'ARILAIT Recherches	Examineur
E. Beuvier	Ingénieur de Recherches, INRA de Poligny	CoDirecteur de thèse
R. Cachon	Maître de Conférences, ENSBANA de Dijon	CoDirecteur de thèse

Ce travail de thèse fait partie d'une action de recherche « Aliment – Qualité – Sécurité » déposée par ARILAIT Recherches (pour le compte du GIS Amalthée) en collaboration avec l'INRA de Poligny, l'ENV de Lyon, le CNIEL, l'ITFF de la Roche-sur-Foron, le Syndicat de la Tomme de Savoie, le Syndicat Interprofessionnel du Reblochon et le Pôle AOC Massif Central, avec une aide financière de la Direction Générale de l'ALimentation.

Remerciements

J'ai une pensée particulière pour Rémy Grappin, qui a initié ce projet et qui m'a accueillie en France, dans l'unité INRA de Poligny il y a quelques années maintenant, et qui n'est plus parmi nous pour voir l'aboutissement de ce travail.

Je tiens également à remercier M Charles Diviès, d'avoir accepté la direction de cette thèse mais qui, tristement, n'a pas pu voir l'aboutissement de ce travail.

Je voudrais également remercier Yolande Noël, Directrice de l'unité à Poligny, pour ses conseils et son soutien au cours des années.

J'exprime toute ma gratitude à Eric Beuvier, co-directeur de la thèse, pour sa disponibilité quotidienne, ses conseils, son encouragement et son aide précieuse pour toutes les rédactions en français.

Toute ma gratitude va à Rémy Cachon, d'avoir repris le flambeau de directeur de cette thèse suite au décès de Charles Diviès.

Je tiens à remercier Michel Gautier d'avoir accepté la présidence du jury de soutenance.

Toute ma reconnaissance va à Micheline Gueguen et Marie-Christine Montel d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, et à André Ayerbe d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse en qualité d'examineur.

Toute ma gratitude va à Gérard Mazerolles pour son aide et ses conseils, plus particulièrement sur la partie spectroscopie IRTF, mais également son encouragement perpétuel.

Un merci spécial à François et Gaby pour leur bonne humeur et leur humour au cours de ces années, et pour leur travail inestimable sur les fabrications fromagères.

Toute ma reconnaissance va au comité de pilotage du programme AQS-Sa, pour un travail d'équipe bien mené.

Toute ma gratitude va à Angeli Kodjo, pour son encouragement, et ses conseils dans son domaine d'expertise.

Je tiens à remercier Damien Lugand pour tout le travail effectué sur le Potentiel Redox au cours de son stage de fin d'étude réalisé dans l'unité INRA de Poligny et l'UMR Microbiologie INRA/UB de Dijon.

J'exprime toute ma reconnaissance à Franck Dufrene pour son aide et son travail précieux au laboratoire et sa bonne humeur tout au long de ce travail. Ma reconnaissance va également à Marie-Hélène Duployer pour son aide précieuse au laboratoire et à Céline Arnould pour sa collaboration en IRTF. Je remercie également Dominique Lefier pour son travail au cours des fabrications des fromages modèles.

J'exprime ma reconnaissance à Laurence Villard, Marie-Amélie Chopard, Jean-Louis Pons et Sylvie Zimmerman de l'ITFF pour leur grande aide dans l'aboutissement de ce travail.

Je remercie Didier Dupont pour son aide concernant les techniques immunologiques et Laurent Tessier pour son aide précieuse dans les traitements statistiques des fabrications fromagères.

J'adresse un grand merci à Sophie pour toute l'aide qu'elle m'a apporté pour les corrections de français. Mes remerciements à Marie-Pierre, Sabine, Gisèle, Floriane, Stéphanie.... également pour leur aide avec mon français, à Marie-Odile pour son aide dans la mise en forme de la thèse, ainsi que tout le personnel de la station qui a su m'accueillir, il y a 8 ans maintenant.

Je témoigne toute ma reconnaissance à François, mon mari, toujours là dans les bons et les mauvais moments et qui a toujours su me faire sourire.

Je tiens à remercier très sincèrement mes parents et toute ma famille, pour leurs encouragements, même dans les moments difficiles. J'ai une pensée particulière pour ceux qui ne sont plus là, pour partager ce moment avec moi.

Sommaire

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les staphylocoques à coagulase positive	3
1.1. Définitions et origines	3
1.2. La recherche des staphylocoques à coagulase positive	4
1.3. Différenciation des espèces de staphylocoques à coagulase positive	4
1.4. Caractérisation génétique des espèces de <i>Staphylococcus</i>	6
1.4.1. Electrophorèse en champ pulsé (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)	6
1.4.2. Typage génétique des staphylocoques	6
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.1. Caractéristiques générales et facteurs nutritionnels	8
2.2. Les biotypes de <i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.3. Les entérotoxines staphylococciques	10
2.3.1. Caractéristiques générales	10
2.3.2. Les différentes entérotoxines	10
2.3.3. Mode d'action	11
2.3.4. Les Toxi-Infections Alimentaire Collectives (TIAC)	12
2.3.5. Les gènes codant pour les entérotoxines	12
2.4. La recherche des entérotoxines staphylococciques	14
2.4.1. Techniques biologiques	14
2.4.2. Techniques immunochimiques	15
2.4.3. Autres techniques	18
2.4.4. Caractérisation des gènes codant les entérotoxines staphylococciques	18
2.5. Les kits de détection des entérotoxines staphylococciques	20
2.5.1. Le kit TRANSIA (Transia-Diffchamb)	21
2.5.2. Le kit SET-RPLA (Oxoid)	22
2.6. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) pour l'identification et la discrimination des micro-organismes	22
2.6.1. La spectroscopie infrarouge	22
2.6.2. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	24
2.6.3. Les micro-organismes et la spectroscopie IRTF	25
3. Facteurs influençant la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> et la production d'entérotoxines	29
3.1. Conditions de croissance	29
3.1.1. Température	30
3.1.2. pH	30
3.1.3. NaCl	30
3.1.4. Activité de l'eau (<i>A_w</i>)	31
3.1.5. Potentiel d'oxydoréduction	31
3.1.6. La compétition	32
3.1.7. Le milieu	33

4. <i>Staphylococcus aureus</i> et la production d'entérotoxines dans les produits laitiers	35
4.1. Le fromage	35
4.2. <i>Staphylococcus aureus</i> et les autres produits laitiers	38
4.2.1. Le lait	38
4.2.2. Le yaourt	39
4.2.3. Les poudres	39
4.2.4. Les tartes à la crème	39
5. Conclusion	41

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique	43
1.1. Les staphylocoques	43
1.2. Les staphylocoques à coagulase positive	43
1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	44
2. Caractérisation des isolats de <i>Staphylococcus aureus</i>	44
2.1. Biotypages des isolats de <i>S. aureus</i>	44
2.2. Les entérotoxines staphylococciques	45
2.2.1. Extraction des entérotoxines	45
2.2.2. Détection des entérotoxines	45
2.2.3. Recherche des gènes codant les entérotoxines	46
2.3. Caractérisation génétique des isolats de <i>S. aureus</i>	50
2.3.1. Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)	50
2.3.2. rep-PCR	51
2.4. Caractérisation des isolats de <i>S. aureus</i> par spectroscopie IRTF	52
2.4.1. Préparation des biofilms	52
2.4.2. Enregistrement des spectres	52
2.4.3. Traitement des spectres	53
3. Fabrications de fromages expérimentaux	53
3.1. Croissance des isolats de <i>S. aureus</i> sur lait	55
3.2. Préparation de l'inoculum de <i>S. aureus</i>	55
3.3. Fabrication du fromage modèle	55
3.4. Analyses microbiologiques	56
3.5. Préparation des échantillons de lait et de fromage	56
3.5.1. Lait	56
3.5.2. Fromage	56
3.6. Analyses physico-chimiques	58
3.7. Production d'entérotoxines dans le fromage modèle	58
3.8. Suivi des isolats de <i>S. aureus</i> par spectroscopie IRTF	60
4. Fabrications des fromages simulant trois technologies traditionnelles	60

4.1. Protocole de fabrication	60
4.2. Inoculum de <i>S. aureus</i>	61
4.3. Fromage de type Cantal	62
4.4. Fromage de type Tomme de Savoie	63
4.5. Fromage de type Reblochon	64
4.6. Analyses microbiologiques et physico-chimiques	65
4.6.1. Lait	65
4.6.2. Fromage de type Cantal	65
4.6.3. Fromages de type Tomme de Savoie et Reblochon	65
4.7. Production d'entérotoxines dans les trois technologies	66
5. Potentiel d'oxydoréduction - croissance de <i>S. aureus</i> et production d'entérotoxines <i>in vitro</i>	66
<hr/>	
5.1. Préparation des isolats de <i>S. aureus</i>	67
5.2. Test de la toxicité des molécules réductrices et oxydantes	67
5.3. Etalonnage et nettoyage des sondes pH et redox	68
5.4. Evaluation de l'effet du potentiel redox sur la croissance de <i>S. aureus</i> et la production d'entérotoxines	68
5.4.1. Sur milieu synthétique	68
5.4.2. Sur lait	69
5.4.3. Suivi du pH et du redox	69
5.5. Extraction et détection des entérotoxines	71
6. Traitements statistiques	71
<hr/>	

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION - PARTIE I

Collecte et isolement des staphylocoques à coagulase positive et caractérisation des isolats de *Staphylococcus aureus*

1. Collecte et isolement des staphylocoques à coagulase positive	74
2. Caractérisation des isolats de <i>S. aureus</i>	74
2.1. Biotypage	74
2.2. Production d'entérotoxines <i>in vitro</i>	76
3. Sélection des isolats en vue de leur caractérisation	77
4. Caractérisation génétique des isolats de <i>S. aureus</i>	79
4.1. Recherche des gènes codant les entérotoxines	79
4.1.1. Production des entérotoxines A à E et présence des gènes correspondants	79
4.1.2. Présence des « nouveaux » gènes en comparaison avec les gènes <i>sea</i> à <i>see</i>	79
4.1.3. Répartition des gènes	81
4.2. Typage génétique par électrophorèse en champ pulsé	83
4.3. Typage génétique par rep-PCR	86
5. Caractérisation de <i>S. aureus</i> par spectroscopie IRTF	88
5.1. Discrimination des staphylocoques et caractérisation de <i>S. aureus</i>	88
5.2. La spectroscopie IRTF et la production d'entérotoxines	92
5.3. Isolats producteurs de l'entérotoxine D	94
6. Synthèse des résultats	95
7. Discussion	96

RESULTATS ET DISCUSSION - PARTIE II

A – Production d'entérotoxines staphylococciques dans un fromage modèle à pâte pressée non cuite

1. Choix des isolats en vue des fabrications fromagères	103
2. Croissance des isolats sur lait	103
3. Fromage modèle	106
3.1. Qualité microbiologique du lait	106
3.2. Analyses physico-chimiques	107
3.3. Evolution du pH	109
3.4. Evolution des populations de <i>S. aureus</i>	111
3.5. Evolution des isolats de pulstotype P1 (producteurs de SED)	113
3.6. Comparaison des croissances de <i>S. aureus</i> sur lait G et dans les fromages modèles	114
3.7. Croissance du levain	114
3.7.1. Lactocoques	115
3.7.2. Streptocoques thermophiles	116
3.7.3. Lactobacilles thermophiles	117
3.8. Production d'entérotoxines dans les fromages modèles	119
3.9. Suivi des isolats par spectroscopie IRTF	120
4. Synthèse des résultats	121

B- Production d'entérotoxines staphylococciques dans des fromages expérimentaux simulant trois technologies traditionnelles

5. Choix des isolats en vue des fabrications fromagères	122
6. Fromages expérimentaux de type Cantal	123
6.1. Qualité microbiologique du lait	123
6.2. Analyses physico-chimiques	123
6.3. Evolution du pH	124
6.4. Croissance du levain lactique	125
6.5. Evolution des populations de <i>S. aureus</i>	127
7. Fromages expérimentaux de type Tomme de Savoie	128
7.1. Analyses physico-chimiques	128
7.2. Evolution du pH	130
7.3. Evolution des sucres : lactose et galactose	131

7.4. Evolution des populations de <i>S. aureus</i>	133
8. Fromages expérimentaux de type Reblochon	135
8.1. Analyses physico-chimiques	135
8.2. Evolution du pH	136
8.3. Evolution des sucres : lactose et galactose	137
8.4. Evolution des populations de <i>S. aureus</i>	139
9. Production d'entérotoxines	141
9.1. Fromage de type Cantal	141
9.2. Fromage de type Tomme de Savoie	141
9.3. Fromage de type Reblochon	141
9.4. Recherche des entérotoxines : méthode officielle de l'AFSSA	142
10. Comparaison de la croissance de <i>S. aureus</i> dans les trois technologies	144
11. Synthèse des résultats	145
C - Discussion	146

RESULTATS ET DISCUSSION - PARTIE III

Effet du potentiel d'oxydoréduction sur la croissance de *Staphylococcus aureus* et la production d'entérotoxines sur BHI et sur lait

1. Choix des isolats	153
2. Comparaison de la croissance de <i>S. aureus</i> sur BHI et sur lait	153
3. Stratégie scientifique développée pour appréhender l'effet du potentiel redox sur la croissance de <i>S. aureus</i> et la production d'entérotoxines	154
3.1. Contexte scientifique	154
3.2. Stratégie méthodologique	155
4. Résultats et discussion	156
4.1. Problèmes rencontrés	156
4.2. Evolution de <i>S. aureus</i> sur BHI	156
4.3. Evolution de <i>S. aureus</i> sur lait	158
4.4. Production d'entérotoxines	161

Conclusion générale et perspectives	163
--	------------

Valorisation de la thèse	168
---------------------------------	------------

Références bibliographiques	169
------------------------------------	------------

Annexes	181
----------------	------------

Annexe 1 : Milieux de culture	181
--------------------------------------	-----

Annexe 2 : Notice d'utilisation du kit Transia Plate – <i>Staphylococcal Enterotoxins</i> (Transia-Diffchamb)	183
--	-----

Annexe 3 : Notice d'utilisation du kit SET RPLA (Oxoid)	190
--	-----

Glossaire

Tableaux et Figures

Glossaire

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
AFNOR	Agence Française de Normalisation
AFSSA	Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments
<i>Agr</i>	Accessory gene regulator
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AOC	Appellation d'Origine Contrôlée
AP-PCR	Arbitrarily Primed PCR
Aw	Activité de l'eau
BP	Baird-Parker
BP-RPF	Baird-Parker – Rabbit Plasma Fibrinogen
CNIEL	Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière
CRP	Coagulase gene Restriction Profils / profil de restriction du gène de coagulase
DGAL	Département Générale de l'Alimentation
<i>Egc</i>	Enterotoxin gene cluster
EIA	Enzyme Immuno Assay / Assay immunoenzymatique
ELIFA	Enzyme linked immuno filtration assay
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ENV	Ecole Nationale Vétérinaire
FIL	Fédération Internationale de Laiterie
GC	Gas Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMS	Séparation immunomagnétique
IR	InfraRouge
IRTF	InfraRouge à Transformée de Fourier
ISO	Organisation National de Normalisation
ITFF	Institut Technique Français des Fromages
ITS	InTergenic spacing / espacement intergénique
MS	Mass Spectroscopy
P agar	Peptone agar
PA-RPLA	Protéine A reversed passive latex agglutination
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (Electrophorèse en Champs pulsé)
POR	Potentiel d'OxydoRéduction ou Potentiel Redox
RAPD	Rapid Polymorphic DNA
Rep-PCR	REPetitive sequence PCR
RPLA	Reversed Passive Latex Agglutination
SCP	Staphylocoques à Coagulase Positive
SDS PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEA – SEP	entérotoxines staphylococciques A à P
<i>sea – sep, tst</i>	gènes codant pour les entérotoxines staphylococciques A à P, TSST-1
SE	Entérotoxine staphylococcique
SET	Staphylococcal enterotoxin test
TCA	Acide trichloracétique
TIAC	Toxi-Infection Alimentaire collective
TSST-1	Toxic Shock Syndrome Toxin – 1
ufc	Unité formant colonie
VIDAS	Vitek ® Immuno Diagnostic Assay System

Les tableaux

Tableau I : différenciation de staphylocoques à coagulase positive selon cinq tests d'après Roberson *et al* (1992).

Tableau II : quelques caractéristiques pour distinguer les différentes espèces de staphylocoques à coagulase positive.

Tableau III : liste des tests et des réactions pour séparer les souches de *S. aureus* en biotypes, selon Hajek et Marselek (1971).

Tableau IV : kits commerciaux sur le marché pour la détection des entérotoxines staphylococciques, et leurs caractéristiques respectives.

Tableau V : fenêtres spectrales : les régions et les informations retrouvées.

Tableau VI : les différentes bandes dans les régions des amides I, II et III, et les liaisons concernées.

Tableau VII : pics d'absorption en infrarouge dus à l'ADN, d'après Le Gal *et al* (1991).

Tableau VIII : synthèse (non exhaustive) des études portant sur la caractérisation des micro-organismes par la spectroscopie IRTF.

Tableau IX : facteurs limitant de la croissance de *S. aureus* et de la production d'entérotoxines.

Tableau X : synthèse (non exhaustive) de quelques études portant sur *S. aureus* et la production d'entérotoxines dans différents fromages.

Tableau XI : synthèse (non exhaustive) de quelques études portant sur la croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxines dans trois technologies traditionnelles (à pâte pressée non cuite).

Tableau XII : liste des espèces de *Staphylococcus*

Tableau XIII : liste des amorces spécifiques utilisées pour la recherche des gènes codant les entérotoxines staphylococciques.

Tableau XIV : amorces REP, ERIC et RW3 utilisées pour la rep-PCR

Tableau XV : liste des milieux gélosés utilisés et leurs conditions d'utilisation pour le suivi de *S. aureus* et du levain au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages modèles.

Tableau XVI : déroulement des fabrications des fromages modèles de type Cantal.

Tableau XVII : déroulement des fabrications des fromages modèles de type Tomme de Savoie et de type Reblochon.

Tableau XVIII : liste des milieux gélosés utilisées pour le suivi des cultures bactériologiques des fromages de type Cantal.

Tableau XIX : protocole d'expérimentation pour le suivi du potentiel redox avec trois isolats de *S. aureus*.

Tableau XX : différenciation des espèces et des sous-espèces de staphylocoques à coagulase positive.

Tableau XXI : liste des tests et des réactions utilisés pour séparer les isolats de *S. aureus* en biotypes A humain, B aviaire, C bovin, C ovin, D lièvre et inconnu.

Tableau XXII : répartition de la production d'entérotoxines en fonction du biotype des isolats collectés.

Tableau XXIII : répartition de la production d'entérotoxines en fonction du biotype des 17 isolats ajoutés à la collection.

Tableau XXIV : type d'entérotoxines produites et origines des souches obtenues à partir d'autres collections.

Tableau XXV : répartition des isolats collectés à partir de laits et de fromages de deux régions de France et des souches obtenues à partir d'autres collections.

Tableau XXVI : répartition des isolats/souches choisis pour les analyses en champ pulsé, en IRTF et par PCR, en fonction du biotype et l'entérotoxine produite in vitro.

Tableau XXVII : répartition en fonction du biotype des isolats/souches possédant des gènes codant les entérotoxines staphylococciques.

Tableau XXVIII : répartition en fonction du biotype des isolats/souches possédant un ou plusieurs gène(s) codant une entérotoxine staphylococcique spécifique.

Tableau XXIX : répartition des pulstotypes, en fonction du biotype, des 111 isolats de *S. aureus* étudiés.

Tableau XXX : répartition des pulstotypes, en fonction de l'entérotoxine produite, des 111 isolats de *S. aureus* étudiés.

Tableau XXXI : liste des espèces et des sous-espèces de staphylocoques utilisées pour élaborer le modèle « staphylocoques », et leurs origines.

Tableau XXXII : distances de Mahalanobis au carré entre *S. aureus* et les autres espèces de staphylocoques.

Tableau XXXIII : choix des isolats pour les fabrications du fromage modèle

Tableau XXXIV : résultats de l'analyse de la variance de la croissance de *S. aureus* sur lait G en fonction de l'entérotoxine et du biotype.

Tableau XXXV : résultats des analyses physico-chimiques des fromages modèles.

Tableau XXXVI : pH à stade moulage + 3h et croissance de *S. aureus* sur fromage modèle en fonction de l'entérotoxine et du biotype (résultats de l'analyse de la variance).

Tableau XXXVII : résultats de l'analyse de la variance de la croissance de *S. aureus* sur fromage modèle en fonction de l'entérotoxine et du biotype.

Tableau XXXVIII : résultats de la production d'entérotoxines dans les 23 fromages modèles.

Tableau XXXIX : choix des trois isolats à tester dans les fromages expérimentaux simulant trois fabrications traditionnelles.

Tableau XXXX : correspondances des numéros des fromages, les niveaux d'ensemencement et les isolats ensemencés.

Tableau XXXXI : résultats des analyses physico-chimiques des fromages de type Cantal.

Tableau XXXXII : résultats des analyses physico-chimiques des fromages de type Tomme de Savoie.

Tableau XXXXIII : résultats de l'analyse de la variance de la croissance de *S. aureus* sur fromage de type Tomme de Savoie en fonction de l'entérotoxine et du biotype.

Tableau XXXXIV : résultats de l'analyse de la variance de la croissance de *S. aureus* sur fromage de type Tomme de Savoie en fonction de l'entérotoxine et du biotype par rapport au pH au stade moulage + 4h.

Tableau XXXXV : résultats de l'analyse de la variance de la croissance de *S. aureus* sur fromage de type Reblochon en fonction de l'entérotoxine et du biotype.

Tableau XXXXVI : résultats de l'analyse de la variance de la croissance de *S. aureus* sur fromage de type Reblochon en fonction de l'entérotoxine et du biotype par rapport au pH au stade J+1.

Tableau XXXXVII : résultats des analyses physico-chimiques des fromages de type Reblochon.

Tableau XXXXVIII : production d'entérotoxines dans les fromages modèles simulant trois fabrications traditionnelles.

Les figures

Figure 1 : l'anticorps d'après Roitt et al. (1985).

Figure 2 : schéma de quelques modes de vibration, exemple d'une molécule d'eau et d'une molécule de dioxyde de carbone (Banwell et McCash, 1994).

Figure 3 : schéma de l'intérieur d'un appareil infrarouge à transformée de Fourier (Banwell et McCash, 1994).

Figure 4 : schéma de fabrication du fromage modèle, calendrier des prélèvements et des analyses microbiologiques (suivi de *S. aureus* et du levain).

Figure 5 : schéma de préparation des échantillons de fromages et de l'extraction d'entérotoxines par dialyse/concentration.

Figure 6 : schéma de fabrication du fromage modèle de type Cantal et calendrier de prélèvements pour les analyses microbiologiques et physico-chimiques.

Figure 7 : schéma de fabrication du fromage modèle de type Tomme de Savoie et calendrier de prélèvements pour les analyses microbiologiques et physico-chimiques.

Figure 8 : schéma de fabrication du fromage modèle de type Reblochon et calendrier de prélèvements pour les analyses microbiologiques et physico-chimiques.

Figure 9 : prélèvement des échantillons sur les fromages de type Cantal

Figure 10 : schéma d'extraction des entérotoxines des échantillons du lait.

Figure 11 : composition de la courbe de croissance, décomposée en une pente et une courbure.

Figure 12 : quelques profils typiques obtenus par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) de certains isolats entérotoxinogènes de *S. aureus*.

Figure 13 : dendogramme des deux profils électrophorétiques des isolats producteurs de SED in vitro obtenus par rep-PCR avec les amorces ERIC et le profil d'un isolat producteur de SEC et SED in vitro.

Figure 14 : dendogramme des trois profils électrophorétiques des isolats producteurs de SED in vitro obtenus par rep-PCR avec les amorces REP.

Figure 15 : dendogramme obtenu par la combinaison des trois profils électrophorétiques des isolats producteurs de SED in vitro obtenus par rep-PCR avec les amorces ERIC, REP et RW3.

Figure 16 : région du spectre de quatre espèces de staphylocoques comprenant l'empreinte infrarouge (900-750 cm^{-1}).

Figure 17 : représentation, en fonction des trois premières variables canoniques, des résultats de la discrimination entre les groupes d'isolats producteurs (selon les entérotoxines produites) et ceux non producteurs d'entérotoxines in vitro.

Figure 18 : représentation, en fonction des trois premières variables canoniques, des résultats de la discrimination entre les isolats producteurs de SED in vitro (19 isolats et 6 spectres/isolat).

Figure 19 : courbes de suivi de la croissance sur lait G de cinq isolats de *S. aureus*.

Figure 20 : courbes d'évolution du pH au cours de la fabrication des fromages modèles.

Figure 21 : courbes d'évolution du pH au cours de la fabrication des fromages modèles.

Figure 22 : courbes de l'évolution du pH au cours de la fabrication des fromages modèles.

Figure 23 : courbes de croissance (moyennes par biotype) de *S. aureus* au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages modèles.

Figure 24 : représentation de la corrélation entre les populations de *S. aureus* aux stades J+1 et J+15 des fabrications des fromages modèles.

Figure 25 : courbes d'évolution des sept isolats de pulsotype P1 (producteurs de SED) au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages modèles.

Figure 26 : courbes d'évolution des lactocoques au cours de la fabrication et de l'affinage des

fromages modèles. Courbes moyennes par jour de fabrication.

Figure 27 : courbes d'évolution des streptocoques thermophiles au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages modèles. Courbes moyennes par jour de fabrication.

Figure 28 : courbes d'évolution des lactobacilles thermophiles au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages modèles. Courbes moyennes par jour de fabrication.

Figure 29 : suivi du pH en continu au cours de la fabrication de cinq fromages modèles de type Cantal.

Figure 30 : courbes d'évolution des lactocoques au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages de type Cantal (moyennes par jour de fabrication).

Figure 31 : courbes de croissance des trois isolats de *S. aureus* au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages de type Cantal (moyennes par isolat).

Figure 32 : évolution du pH au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages de type Tomme de Savoie (moyennes par isolat).

Figure 33 : évolution des sucres au cours de l'affinage des fromages de type Tomme de Savoie (moyennes des trois essais).

Figure 34 : évolution de la population de *S. aureus* au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages de type Tomme de Savoie (moyennes par isolat).

Figure 35 : représentation de la corrélation entre les populations de *S. aureus* aux stades J+1 et J+42 des fabrications des fromages de type Tomme de Savoie.

Figure 36 : évolution du pH au cours de la fabrication des fromages de type Reblochon (moyennes par isolat).

Figure 37 : évolution des sucres au cours de l'affinage des fromages modèles de type Reblochon (moyennes par isolat).

Figure 38 : évolution de la population de *S. aureus* au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages de type Reblochon (moyennes par isolat).

Figure 39 : évolution de la population de *S. aureus* au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages (moyennes par isolat) des trois technologies.

Figure 40 : évolution du pH au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages (moyennes par isolat) des trois technologies.

Figure 41 : courbes de croissance de l'isolat 1A, sur BHI et sur lait à 37°C, avec deux niveaux d'inoculum initiaux.

Figure 42 : évolution de la population de l'isolat 1A et le potentiel redox au cours de 24 h d'incubation à 37°C dans du BHI. Courbes moyennes des trois essais.

Figure 43 : évolution de la population de l'isolat 1A par rapport à la cinétique d'acidification au cours de 24 h d'incubation à 37°C dans du BHI. Courbes moyennes des trois essais.

Figure 44 : évolution de *S. aureus* (isolat 1A) et du potentiel redox dans du lait durant une période de 24 h à 37°C. Courbes moyennes des trois essais.

Figure 45 : évolution de *S. aureus* (isolat 1A) par rapport à la cinétique d'acidification dans du lait durant une période de 24 h à 37°C. Courbes moyennes des trois essais.

Introduction

Environ 75 000 tonnes de fromages au lait cru, plus particulièrement des fromages de type pâte pressée non cuite, sont vraiment sensibles au risque "*Staphylococcus aureus*". Ces fromages sont dits sensibles à cause de certains facteurs technologiques, tels qu'une acidification "lente", qui peuvent favoriser la production d'entérotoxines. Certains de ces fromages sont produits dans des zones difficiles (zones de montagne). Ainsi ils jouent un rôle plus large que leur seule valeur économique car ils font vivre une agriculture qui participe à l'occupation et l'entretien du territoire et à l'activité touristique. Le coût des contrôles pour *S. aureus* avoisine les 2 à 3 millions d'euros par an et avec un taux de non-conformité de 30% (population de *S. aureus* de 10^4 ufc/g ou plus), les fromages sont bloqués en attendant la recherche des entérotoxines. En outre, avec seulement 1% des lots positifs, ceci représente un coût assez difficile à estimer.

Les entérotoxines produites par les espèces du genre *Staphylococcus* sont produites par des staphylocoques à coagulase positive et plus particulièrement *S. aureus*. Les entérotoxines staphylococciques peuvent être impliquées dans des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). En France, il s'agit de la première cause de TIAC dans les produits laitiers (De Buyser *et al.*, 2001 ; Haeghebaert *et al.*, 2002). Des entérotoxines préformées dans le fromage au cours de la fabrication, provoquent les symptômes d'une gastro-entérite, quand le produit est ingéré par l'homme.

A ce jour, 19 entérotoxines staphylococciques (SE) sont connues (SEA-SEE, SEG-SEN, SEQ, SEU). Cependant, la nature et le niveau d'entérotoxines produites sont souche-dépendante et une souche peut en produire plusieurs *in vitro*. Dans la population des souches de *S. aureus* dans les fromages, la proportion de souches entérotoxinogènes trouvées varie de 4 à 80% (Larsen *et al.*, 2000 ; Holeckova *et al.*, 2002). Néanmoins, selon les différents résultats obtenus sur fromage et compte tenu des méthodes d'extraction et de détection d'entérotoxines disponibles actuellement, la production d'entérotoxines dans ce type de produit semble un phénomène rare et aléatoire.

Aujourd'hui, les causes de la production d'entérotoxines dans le fromage sont peu connues, et leur recherche dans le fromage s'avère le plus souvent infructueuse. Il apparaît donc intéressant d'étudier la production d'entérotoxines dans les fromages selon la biodiversité des souches de *S. aureus* et la technologie fromagère.

Compte tenu des connaissances actuelles, les hypothèses avant le début du travail peuvent être énoncées comme suit :

- la présence de *S. aureus* n'implique pas automatiquement la présence d'entérotoxines dans les fromages.
- la production d'entérotoxines dépend des conditions de fabrication fromagère et/ou des souches de *S. aureus*.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'aptitude à la production d'entérotoxines dans des conditions contrôlées de fabrication fromagère en fonction de la diversité phénotypique et génétique des souches de *S. aureus*.

Pour atteindre cet objectif, le travail se divise en plusieurs volets :

- la constitution d'une collection de *S. aureus* actualisée et représentative des fromages au lait cru étudiés;
- la caractérisation phénotypique et génétique des isolats de *S. aureus*, qui nous a permis d'observer leur diversité dans les laits et fromages au lait cru au cours d'une année entière ;
- l'évaluation de l'aptitude à produire des entérotoxines dans un fromage modèle, qui a permis, pour la suite de l'étude, de trouver des isolats de notre collection capables de produire des entérotoxines dans le fromage ;
- Enfin, l'évaluation de l'aptitude à produire des entérotoxines dans des fromages expérimentaux simulant trois fabrications traditionnelles.

Pour s'affranchir des interactions potentielles avec la microflore du lait cru (Montel, 2002), la fabrication des fromages expérimentaux (3^{ième} et 4^{ième} étape) a été réalisée avec un mélange de lait microfiltré et de crème pasteurisée.

Les changements du potentiel d'oxydoréduction de l'environnement ont un grand impact sur la cellule vivante. C'est pourquoi, nous avons exploré l'influence de ce paramètre environnemental sur la croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxines.

Ce travail devrait nous permettre de mieux appréhender les conditions technologiques favorisant l'expression de la production des entérotoxines staphylococciques dans le fromage.

Etude Bibliographique

L'OBJECTIF PRINCIPAL DU TRAVAIL DE THESE EST D'ÉVALUER L'APTITUDE DES SOUCHES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* A LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS DES CONDITIONS CONTRÔLÉES DE FABRICATION FROMAGÈRE EN FONCTION DE LA DIVERSITÉ PHÉNOTYPIQUE ET GÉNÉTIQUE. LE TRAVAIL DE THESE PORTE PLUS PARTICULIÈREMENT SUR LA CROISSANCE ET L'ENTEROTOXINOGENÈSE DE *S. AUREUS* DANS LES FROMAGES DE TYPE PÂTE PRESSÉE NON CUITE. CE CHAPITRE SITUE L'ÉTAT DES CONNAISSANCES CONCERNANT LES ASPECTS SCIENTIFIQUES DE CE TRAVAIL : LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE ; *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ET LES ENTEROTOXINES ; LES DIFFÉRENTS FACTEURS INFLUENÇANT LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES ; *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS LE FROMAGE.

LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE

DEFINITION ET ORIGINES

LES ESPÈCES DU GENRE *STAPHYLOCOCCUS* PEUVENT ÊTRE DIVISÉES EN 2 GROUPES – LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE ET LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NÉGATIVE. LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE SONT CARACTÉRISÉS PAR LEUR CAPACITÉ DE PRODUIRE UNE COAGULASE LIBRE, UNE PROTÉINE EXTRACELLULAIRE PRODITE PAR CERTAINES ESPÈCES DE STAPHYLOCOQUES. ACTUELLEMENT, SEPT ESPÈCES ET SOUS-ESPÈCES DU GENRE SONT DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE : *S. AUREUS*, *S. INTERMEDIUS*, *S. LUTRAE*, *S. DELPHINI*, *S. SCHLEIFERI* SSP. *COAGULANS*, *S. AUREUS* SSP. *ANAEROBIUS* ET *S. HYICUS*. NEANMOINS TOUTES LES SOUCHES DE *S. HYICUS* NE SONT PAS COAGULASE POSITIVE (KLOOS ET SCHLEIFER, 1986 ; VARALDO ET AL., 1988 ; BAIRD-PARKER, 1990 ; IGIMI ET AL., 1990 ; FOSTER ET AL., 1997 ; FRENEY ET AL., 1999).

LES ORIGINES DES DIFFÉRENTES ESPÈCES SONT VARIABLES. *S. HYICUS* EST SOUVENT TROUVÉ SUR LA PEAU DES PORCS, DE LA VOLAILLE ET PARFOIS SUR DES VACHES A VIANDE. *S. INTERMEDIUS* EST PLUS PARTICULIÈREMENT RETROUVÉ SUR DES CHIENS, EN BONNE SANTÉ OU MALADES, MAIS ÉGALEMENT SUR D'AUTRES CARNIVORES, DES CHEVAUX ET DES OISEAUX (BAIRD-PARKER, 1990 ; BECKER ET AL., 2001). PAR CONTRE, *S. AUREUS* EST UNE ESPÈCE OMNIPRESENTE, AVEC DE NOMBREUX HÔTES, TELS QUE L'HOMME OU LA VACHE. POUR LES SOUCHES DE *S. SCHLEIFERI* SSP. *COAGULANS* ÉTUDIÉES DANS LE TRAVAIL DE IGIMI ET AL. (1990), LA PLUPART ONT ÉTÉ ISOLÉES D'OTITES DE CHIENS. *S. LUTRAE* ET *S. DELPHINI*, COMME L'INDIQUENT LEURS NOMS, SONT ISSUS DE LOUTRES ET DE DAUPHINS, RESPECTIVEMENT (VARALDO ET AL., 1988 ; FOSTER ET AL., 1997).

LA RECHERCHE DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE

LA PRODUCTION DE LA COAGULASE LIBRE, CARACTÈRE PRINCIPAL UTILISÉ POUR LA RECONNAISSANCE DE LA PATHOGENICITÉ DES STAPHYLOCOQUES, NOTAMMENT DE *S. AUREUS*, A ÉTÉ À L'ORIGINE DE LA MISE AU POINT D'UN MILIEU SPÉCIFIQUE : BAIRD-PARKER AVEC PLASMA DE LAPIN ET FIBRINOGENE (BP-RPF). CE MILIEU FAVORISE LA CROISSANCE DES STAPHYLOCOQUES ET INHIBE LA CROISSANCE DES FLORES SECONDAIRES, ET LE PLASMA DE LAPIN EXPRIME UNE BONNE SPÉCIFICITÉ POUR LA COAGULASE STAPHYLOCOCCIQUE. LES COLONIES DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE SONT DE COULEUR GRISE/NOIRE AVEC UN HALO. CE HALO EST LA CONSÉQUENCE DE LA FORMATION D'UNE

STAPHYLOTHROMBINE QUI AGIT EN COUPANT LES FIBRINOPEPTIDES A ET B DU FIBRINOGENE, CE QUI ENTRAINE UN PROCESSUS DE POLYMERISATION, SE TRADUISANT PAR L'APPARITION DE FIBRINE AUTOUR DES COLONIES. LORS DES ANALYSES DE ROUTINE, SONT COMPTEES NON SEULEMENT LES SOUCHES DE *S. AUREUS* PRESENTES DANS LE PRODUIT, MAIS EGALEMENT D'AUTRES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRESENTS (STADHOUDERS *ET AL.*, 1976 ; SAWHNEY, 1986). EN FRANCE, LES NORMES POUR LES ANALYSES DE ROUTINE (ISO 5944 : 2001 / FIL 60 : 2001) POUR LA RECHERCHE DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE, ET PLUS PARTICULIEREMENT *S. AUREUS*, DANS LE LAIT ET LES PRODUITS A BASE DE LAIT UTILISENT LA METHODE DE COMPTAGE DES COLONIES, SANS VERIFICATION DE LA COAGULASE, SUR MILIEU SPECIFIQUE : BAIRD-PARKER AVEC PLASMA DE LAPIN ET FIBRINOGENE. LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE SONT UN GROUPE DE PLUSIEURS ESPECES, IL EXISTE DONC UN BESOIN DE LES DISCRIMINER ENTRE ELLES.

DIFFERENCIATION DES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE

PLUSIEURS TESTS BIOCHIMIQUES SONT NECESSAIRES POUR DISCRIMINER LES DIFFERENTES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE. ROBERSON *ET AL.* (1992) ONT TRAVAILLE SUR UNE SELECTION DE SOUCHES DE *S. AUREUS*, *S. INTERMEDIUS* ET *S. HYICUS*, D'ORIGINES DIFFERENTES, TELLES QUE LE LAIT, L'ALIMENTATION, L'HOMME, LES CHIENS, ET LES CHATS, POUR EVALUER LES METHODES DE DISCRIMINATION DE CES TROIS ESPECES DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE. LES AUTEURS ONT UTILISE CINQ TESTS POUR POUVOIR BIEN DIFFERENCIER LES TROIS ESPECES : CROISSANCE SUR MILIEU BAIRD-PARKER MODIFIE (AJOUT D'ACRIFLAVINE, DE POLYMYXINES ET DE SULPHONAMIDE), CROISSANCE SUR PEPTONE AGAR (P AGAR) AVEC ADDITION DE 7 µG D'ACRIFLAVINE PAR ML, PRODUCTION D'ACETOINE, FERMENTATION DE MANNITOL EN ANAEROBIOSE, ET LA PRESENCE DE β-GALACTOSIDASE. LE TABLEAU I PRESENTE LA DIFFERENTIATION DES TROIS ESPECES DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE SELON LES CINQ TESTS EFFECTUES SUR 80 SOUCHES DE CHAQUE ESPECE.

TABLEAU I : DIFFERENTIATION DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE SELON CINQ TESTS D'APRES ROBERSON *ET AL.* (1992).

Espèce	P agar	MBP*	β-galactosidase	Acétoine	Fermentation de mannitol en anaérobiose
<i>S. aureus</i>	100**	100	0	94	99
<i>S. hyicus</i>	0	0	0	0	0
<i>S. intermedius</i>	0	0	100	1	0

* milieu Baird-Parker modifié. ** pourcentage de souches positives.

CEPENDANT, COMME INDIQUE AU DEBUT DE CE CHAPITRE, IL EXISTE AUJOURD'HUI SEPT ESPECES DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE, QU'IL PEUT ETRE NECESSAIRE DE DIFFERENCIER. *S. SCHLEIFERI* SSP. *COAGULANS* PEUT ETRE DISTINGUE DES AUTRES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE (IGIMI *ET AL.*, 1990), SUR LA BASE DE LA PRODUCTION D'ACETOINE, DE β-HEMOLYSINE, L'ACTIVITE NEGATIVE DE HYALURONIDASE ET L'ABSENCE DE PRODUCTION D'ACIDE A PARTIR DE TREHALOSE OU DE MALTOSE. POUR LA DISCRIMINATION DE *S. DELPHINI* DES AUTRES ESPECES A COAGULASE POSITIVE, UN SEUL CRITERE PEUT SUFFIRE, CAR *S. DELPHINI* EST NEGATIF POUR LA NUCLEASE THERMIQUEMENT STABLE ALORS QUE TOUS LES AUTRES SONT POSITIFS (VARALDO *ET AL.*, 1988 ; IGIMI *ET AL.*, 1990). LA DERNIERE ESPECE DE LA FAMILLE DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE, *S. LUTRAE*, PEUT ETRE DISCRIMINEE DES AUTRES AVEC DES CRITERES TELS QUE LA

COAGULASE LIBRE, LA PRODUCTION D'ACETOINE, LES HEMOLYSES, ET LA PRODUCTION D'ACIDES A PARTIR DES SUCRES MALTOSE, GALACTOSE, D-TREHALOSE ET D-XYLOSE (FOSTER *ET AL.*, 1997).

Tableau II : quelques caractéristiques pour distinguer les différentes espèces de staphylocoques à coagulase positive (Varaldo *et al.*, 1988 ; Igimi *et al.*, 1990 ; Foster *et al.*, 1997 ; Freney *et al.*, 1999).

Espèce	Acidification de maltose	Acidification de d-trehalose	Hémolyses	Pigment	Coagulase liée
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
<i>S. intermedius</i>	f	+	d	-	d
<i>S. hyicus</i>	-	+	-	-	-
<i>S. schleiferi ssp. coagulans</i>	-	-	+	-	-
<i>S. delphini</i>	+	-	+	-	-
<i>S. lutrae</i>	+	+	+	-	-

+, plus de 90% des souches sont positives ; -, plus de 90% des souches sont négatives ; f, faible réaction ; d, 11 à 89% des souches sont positives.

LE TABLEAU II REGROUPE QUELQUES CARACTERISTIQUES QUI DIFFERENCIENT LES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE ENTRE ELLES. CES MEMES TESTS SONT EGALEMENT UTILISES POUR L'IDENTIFICATION DE *S. AUREUS*.

CARACTERISATION GENETIQUE DES ESPECES DE *STAPHYLOCOCCUS*

LA CARACTERISATION GENETIQUE DES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES, ET PLUS PARTICULIEREMENT DE *S. AUREUS*, SE FAIT, EN GENERAL, AVEC DEUX TECHNIQUES BIEN SPECIFIQUES SELON LE BESOIN D'IDENTIFICATION ET DE CARACTERISATION. CES DEUX METHODES SONT L'ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE ET LA PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION). LEUR UTILISATION DANS LE « MONDE » DES STAPHYLOCOQUES EST DECRITE CI-APRES.

Electrophorèse en champ pulsé (Pulsed-field gel electrophoresis – PFGE)

LA PFGE EST LA METHODE DE REFERENCE POUR LE TYPAGE DE SOUCHES BACTERIENNES D'ORIGINE CLINIQUE. CETTE METHODE EST BASEE SUR L'ANALYSE DE L'ADN BACTERIEN ET DONNE UNE EMPREINTE GENETIQUE, APPELEE PULSOTYPE, CARACTERISTIQUE DE CHAQUE SOUCHE.

BRIEVEMENT, L'ADN EST SOUMIS A L'ACTION D'UN ENZYME (ENDONUCLEASE DE RESTRICTION) POUR PRODUIRE UNE SERIE DE FRAGMENTS D'ADN DONT LA TAILLE ET LE NOMBRE SONT CARACTERISTIQUES DE L'ISOLAT ETUDIE (ANONYME, ; EGLY *ET AL.*, 1993). LES MOLECULES D'ADN MIGRENT DANS UN GEL D'AGAROSE SELON DES DIRECTIONS IMPOSEES PAR L'APPLICATION ALTERNEE DE DEUX CHAMPS ELECTRIQUES. LES MOLECULES D'ADN SONT SEPARÉES EN FONCTION DE LEUR TAILLE. LES FRAGMENTS AINSI SEPARÉS,

SONT REVELES PAR COLORATION DU GEL. LA PHOTOGRAPHIE DU GEL EST ENSUITE UTILISEE POUR FAIRE DES COMPARAISONS ENTRE LES ISOLATS, ET LEUR DONNER UN PULSOTYPE.

Typage génétique des staphylocoques

DANS LE « MONDE » DE *S. AUREUS*, L'ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE A ETE BEAUCOUP UTILISEE POUR DISTINGUER DIFFERENTES SOUCHES OU POUR METTRE EN EVIDENCE DES RELATIONS GENETIQUES SELON L'ORIGINE OU LE BIOTYPE. LES RELATIONS GENETIQUES ENTRE DES SOUCHES DE *S. AUREUS* D'ORIGINE BOVINE ET HUMAINE ONT ETE ETUDIEES AVEC L'ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSEE (PFGE) ET LE TYPAGE BINAIRE. AINSI, 38 SOUCHES ISOLEES DE HUIT TROUPEAUX DE VACHES LAITIERES ET 55 SOUCHES D'ORIGINE HUMAINE, TOUTES ISOLEES DE PAYS DIFFERENTS ET A DES PERIODES DIFFERENTES DE L'ANNEE, ONT ETE CARACTERISEES. LES AUTEURS ONT TROUVE UNE HETEROGENEITE GENETIQUE INTER ET INTRA TROUPEAU. LA PLUPART DES ISOLATS D'ORIGINE HUMAINE ET BOVINE PEUVENT ETRE REGROUPES PAR HOMOLOGIE GENETIQUE EN FONCTION DE LEUR HOTE D'ORIGINE (ZADOKS *ET AL.*, 2000).

L'ANALYSE DE 129 SOUCHES DE *S. AUREUS* PROVENANT DE TIAC DANS 35 QUARTIERS DE TOKYO AU JAPON, PENDANT UNE PERIODE DE 16 ANS (1980 A 1995), A DEMONTRE LE POUVOIR DISCRIMINANT DE LA PFGE. AVEC CETTE TECHNIQUE, LES SOUCHES SONT DIVISEES EN SOUS-GROUPES SELON LEURS PROFILS PFGE ET LE TYPAGE DE LA COAGULASE. LES AUTEURS ONT REMARQUE QUE LES SOUCHES D'UN MEME SOUS-GROUPE VENAIENT D'UNE TIAC RECENSEE DANS UN MEME QUARTIER (SHIMIZU *ET AL.*, 2000). HATAKKA *ET AL.* (2000), ONT ETUDIE LES GENOTYPES ET LE POUVOIR ENTEROTOXINOGENE DES SOUCHES DE *S. AUREUS* ISOLEES DES MAINS ET DES CAVITES NASALES DES EMPLOYES DE LA RESTAURATION AERIENNE. LE TYPAGE PAR PFGE A MONTRE UNE GRANDE DIVERSITE DE GENOTYPES. ILS ONT TROUVE UNE DIFFERENCE IMPORTANTE ENTRE LES SOUCHES ISOLEES DES MAINS ET CELLES ISOLEES DES CAVITES NASALES.

PLUSIEURS ETUDES ONT DEJA PORTE SUR LA COMPARAISON DE CETTE TECHNIQUE AVEC D'AUTRES TECHNIQUES DE CARACTERISATION GENETIQUE, DEMONTRANT LES CAPACITES DISCRIMINANTES DE LA PFGE. VAN DER ZEE *ET AL.* (1999), ONT COMPARE LA TECHNIQUE REP-PCR (REPETITIVE SEQUENCE-BASED – POLYMERASE CHAIN REACTION) AVEC L'AP-PCR (ABITRARILY PRIMED PCR OU PCR PAR AMORÇAGE ARBITRAIRE) ET LA PFGE, ET ONT PU DEMONSTRER QUE LA DIFFERENCIATION DE LA REP-PCR ETAIT EN CONCORDANCE AVEC CELLE DE LA PFGE. DES TRAVAUX ONT COMPARE LA PFGE A DEUX AUTRES METHODES DE TYPAGE GENETIQUE : L'AMPLIFICATION ALEATOIRE DE GENES NON CIBLES (RAPD) ET L'AMPLIFICATION DE L'ESPACE INTERGENIQUE 16-23S (ITS) POUR DES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES, EN PARTICULIER *S. CAPRAE*. LA PFGE S'EST REVELEE AVOIR LE MEILLEUR POUVOIR DE DISCRIMINATION (KODJO *ET AL.*, 1999). LA PFGE S'EST EGALEMENT MONTREE EFFICACE POUR LA DISTINCTION DE SOUCHES DE *S. AUREUS* PROVENANT DE DIFFERENTS PAYS (USA, EUROPE, JAPON) (TSEN *ET AL.*, 1997). UNE ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE, SUR DES ISOLATS DE *S. AUREUS* ISSUS DE VACHES SOUFFRANT DE MAMMITE (ZSCHÖCK *ET AL.*, 2000B), A PRESENTE UNE COMPARAISON DE DIFFERENTES TECHNIQUES : LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES, LA PCR ET LA PFGE. LA PFGE S'EST AVEREE ETRE UNE METHODE SIMPLE ET ROBUSTE POUR LE TYPAGE DE TELLES SOUCHES. DANS UNE COMPARAISON DE LA PFGE AVEC L'ANALYSE DU PROFIL DE RESTRICTION DU GENE DE COAGULASE (CRP) POUR LE TYPAGE MOLECULAIRE DE *S. AUREUS*, LA PFGE SEMBLE ETRE SUPERIEURE POUR L'IDENTIFICATION D'ISOLATS DE *S. AUREUS* ISOLEES DE TIAC (CHIOU *ET AL.*, 2000). DANS UNE AUTRE ETUDE DE COMPARAISON ENTRE LA PFGE

ET LE TYPAGE DE BACTERIOPHAGES, LES AUTEURS ONT EGALEMENT CONCLU QUE LA PFGE EST BEAUCOUP PLUS PERFORMANTE ET DISCRIMINANTE QUE LE TYPAGE DE BACTERIOPHAGES (BANNERMAN *ET AL.*, 1995).

LA PFGE EST DONC UNE TECHNIQUE PERFORMANTE, HAUTEMENT DISCRIMINANTE POUR LE TYPAGE DE BACTERIES, ELLE DONNE DE BONS RESULTATS POUR LA DISCRIMINATION DES STAPHYLOCOQUES, DE

S. AUREUS NOTAMMENT, ET MEME DES DIFFERENTS BIOTYPES DE *S. AUREUS* (HENNEKINNE ET AL., 2003B).

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

CARACTERISTIQUES GENERALES ET FACTEURS NUTRITIONNELS

S. AUREUS EST UNE BACTERIE GRAM POSITIVE DE 0,5 A 1,5 µM DE DIAMETRE, ASPORULEE, NON MOBILE, COAGULASE POSITIVE ET ELLE EST GROUPEE EN AMAS OU EN PAIRES (HERMIER ET AL., 1992 ; KOSIKOWSKI ET MISTRY, 1997A). C'EST UNE BACTERIE AERO-ANAEROBIE FACULTATIVE ET CHIMIO-ORGANOTROPHE QUI A UN METABOLISME RESPIRATOIRE ET FERMENTATIF (KLOOS ET SCHLEIFER, 1986).

LES SOUCHES DE *S. AUREUS* PRESENTENT DES EXIGENCES NUTRITIONNELLES PARTICULIERES. ELLES ONT BESOIN D'UNE SOURCE ORGANIQUE D'AZOTE (5 A 12 ACIDES AMINES) ET DE VITAMINES. DES ETUDES ONT MONTRE QUE CERTAINES SOUCHES DE *S. AUREUS* ONT BESOIN DE DIFFERENTS ACIDES AMINES, PARTICULIEREMENT LA CYSTINE, L'ASPARTATE ET LE GLUTAMATE. L'ARGININE, LA VALINE, LA LEUCINE, LA GLYCINE ET LA PROLINE, SONT EUX AUSSI, IMPORTANTS POUR LES BESOINS NUTRITIONNELS DE CERTAINES SOUCHES. NEANMOINS, LES BESOINS EN ACIDES AMINES VARIENT SELON LES SOUCHES (TAYLOR ET HOLLAND, 1989 ; KURODA ET AL., 2001).

EN AEROBIOSE, *S. AUREUS* (KLOOS ET SCHLEIFER, 1986) METABOLISE PLUSIEURS SUCRES TELS QUE FRUCTOSE, GALACTOSE, MANNOSE, RIBOSE, SACCHAROSE ET GLYCEROL. LA PLUPART DES SOUCHES DE *S. AUREUS* SONT CAPABLES D'HYDROLYSER DES PROTEINES ANIMALES COMME L'HEMOGLOBINE, LA FIBRINE, L'ALBUMINE, LES CASEINES ET LES POLYPEPTIDES. DE PLUS, CES SOUCHES PEUVENT HYDROLYSER DIVERS LIPIDES ET PHOSPHOLIPOPROTEINES. POUR SE DEVELOPPER EN CONDITIONS D'ANAEROBIOSE (KLOOS ET SCHLEIFER, 1986), IL LEUR FAUT DE L'URACILE ET UNE SOURCE DE CARBONE FERMENTESCIBLE. EN ANAEROBIOSE ET EN AEROBIOSE *S. AUREUS* METABOLISE LE GLUCOSE, LE LACTOSE, LE MALTOSE ET LE MANNITOL.

LES BIOTYPES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

SUR LA BASE DE LEUR CARACTERISATION PHENOTYPIQUE, LES SOUCHES DE *S. AUREUS* PEUVENT ETRE DISTINGUEES SELON L'HOTE AVEC LEQUEL ELLES SONT ASSOCIEES CAR CHAQUE SOUCHE EST, EN GENERAL, ASSOCIEE A UN HOTE SPECIFIQUE (DEVRIESE ET OEDING, 1976 ; HAJEK ET BALUSEK, 1988). LES SOUCHES DE *S. AUREUS* ISOLEES DE L'HOMME SONT DIFFERENTES DE CELLES ISOLEES DES ANIMAUX. HAJEK ET MARSALEK (1971) ONT PRESENTE UN SCHEMA DE DISCRIMINATION DES SOUCHES DE *S. AUREUS* D'ORIGINES DIFFERENTES. NEUF TESTS BIOCHIMIQUES ET LE CONTROLE DE LA SENSIBILITE AUX BACTERIOPHAGES PEUVENT ETRE UTILISES POUR DISCRIMINER LES BIOTYPES ET SONT PRESENTES DANS LE TABLEAU III.

TABLEAU III : LISTE DES TESTS ET DES REACTIONS POUR SEPARER LES SOUCHES DE *S. AUREUS* EN BIOTYPES, SELON HAJEK ET MARSALEK (1971).

Classification	Biotypes					
	A	B	C	D	E	F
Staphylokinase	+	-	-	-	-	-

Pigment	+	+	+	v-	-	-
Coagulation de plasma humain	+	+	+	+	v-	+
Coagulation de plasma bovin	-	-	+	-	+	+
Alpha hémolyse	+	v	v	-	-	v-
Bêta hémolyse	v-	v+	+	+	+	+
Réduction de tellurite	+	+	+	+	f	-
Coagulase liée	+	+	+	+	v+	-
Croissance sur milieu cristal violet	-	v+	v	-	+	+
Typage avec bactériophages adaptés	H	H	H/B	H	C	-

+ = > 80% positifs ; - = > 80% négatifs ; v = variable (v+ ou v- = prédominance positive ou négative respectivement) ; f = réaction faible. **Biotypes** : A = humain ; B = porc, volaille ; C = bétail, mouton ; D = lièvre ; E = chien ; F = pigeon. **Croissance sur cristal violet** : + = colonies blanches, jaunes ou oranges ; - = colonies bleues ou violettes. **Bactériophages adaptés** : H = humain ; B = bovin ; C = canin.

DEVRIESE ET OEDING (1976) ET ISIGIDI *ET AL.* (1990 ; 1992) ONT AMELIORE CES TESTS EN AJOUTANT LE TEST DE LA PRESENCE DE LA PROTEINE A, QUI DIFFERENCIE LES SOUCHES D'ORIGINE AVIAIRE ET PORCINE (LES SOUCHES DE BIOTYPE AVIAIRE SONT PROTEINE A NEGATIVE). LA CROISSANCE SUR MILIEU CRISTAL VIOLET DISCRIMINE LES SOUCHES DE BIOTYPE C D'ORIGINE BOVINE (CRISTAL VIOLET TYPE A) ET OVINE (CRISTAL VIOLET TYPE C) (WITTE *ET AL.*, 1978 ; ISIGIDI *ET AL.*, 1992). LES SOUCHES QUI NE PEUVENT PAS ETRE CLASSEES DANS UN DES BIOTYPES A A F SONT CONSIDEREES COMME ETANT DES SOUCHES SANS HOTE SPECIFIQUE.

EN CE QUI CONCERNE L'ENTEROTOXINOGENESE DES DIFFERENTS BIOTYPES DE *S. AUREUS*, QUELQUES ETUDES ONT DEJA DEMONTRE LE FORT POURCENTAGE DE SOUCHES D'ORIGINE HUMAINE QUI SONT PRODUCTRICES D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*. ISIGIDI *ET AL.* (1992) ONT TROUVE QUE 77% DES SOUCHES ENTEROTOXINOGENES SONT DE BIOTYPE A HUMAIN. DANS UNE ETUDE PLUS RECENTE, ROSEC *ET AL.* (1997) ONT ANALYSE 264 SOUCHES DE STAPHYLOCOQUES ISOLEES DE 121 ALIMENTS DIFFERENTS. TOUTES LES SOUCHES ONT ETE TESTEES POUR LEUR BIOTYPE AINSI QUE LEUR APTITUDE A PRODUIRE DES ENTEROTOXINES. LE BIOTYPE A HUMAIN REPRESENTE 77% DES SOUCHES PRODUCTRICES D'ENTEROTOXINES. COMME L'ONT EGALEMENT OBSERVE AARESTRUP ET JENSEN (1997), LE BIOTYPE C BOVIN EST LE MOINS ENTEROTOXINOGENE.

LES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES

Caractéristiques générales

LES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES (SE) SONT DES PROTEINES A CHAINES LINEAIRES DE FAIBLE MASSE MOLECULAIRE (27000 A 30000 DA) (LAPEYRE, 1997A ; LAPEYRE, 1997B ; SU ET WONG, 1997). CES TOXINES SONT DES METABOLITES DE LA CROISSANCE DE CERTAINES SOUCHES DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE, EN PARTICULIER *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ET DE CERTAINES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE (PALMER, 1998). LES ENTEROTOXINES PRODUITES PAR *S. AUREUS*

POSSEDENT DES SIMILARITES DE CONFORMATION DANS LEURS SEQUENCES DE NUCLEOTIDES ET D'ACIDES AMINES (SU ET WONG, 1997 ; BHATTI ET MICUSAN, 1999 ; PAPAGEORGIOU ET ACHARYA, 2000 ; ORWIN *ET AL.*, 2001). DE PLUS, ELLES PARTAGENT TOUTES, PLUSIEURS REGIONS BIEN CONSERVEES (BALABAN ET RASOOLY, 2000).

LES ENTEROTOXINES SONT RESISTANTES AUX PROTEASES GASTRO-INTESTINALES, TELLES QUE LA PEPSINE, AUSSI BIEN QU'A LA CHALEUR (JOHNSON *ET AL.*, 1991 ; BALABAN ET RASOOLY, 2000). LA STABILITE THERMIQUE DE CES TOXINES SEMBLE ETRE DEPENDANTE DU PH, DE LA CONCENTRATION EN NaCl, DES PROTEINES, ETC., DU MILIEU DANS LEQUEL ELLES SE TROUVENT (BALABAN ET RASOOLY, 2000). ELLES ONT TOUTES DES ACTIVITES BIOLOGIQUES SIMILAIRES (SU ET WONG, 1997).

Les différentes entérotoxines

LES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES SONT IDENTIFIEES COMME DIFFERENTES A CAUSE DE LEURS DIFFERENCES D'ANTIGENICITE (SU ET WONG, 1997). NEUF TYPES ANTIGENIQUES MAJEURS ONT ETE RAPPORTES : SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI ET SEJ (MONDAY ET BOHACH, 1999). BASES SUR L'HOMOLOGIE DES SEQUENCES, LES ENTEROTOXINES PEUVENT ETRE DIVISEES EN TROIS GROUPES : (1) SEA, SED, SEE, SEH ; (2) SEB, SEC ; (3) TSST-1 (ROSENDAHL *ET AL.*, 1997). DANS LE GROUPE (1) SEA ET SEE SONT IDENTIQUES A 84%. CES DEUX ENTEROTOXINES SONT TRES SIMILAIRES, MAIS IL EXISTE QUAND MEME DES DIFFERENCES DE FONCTION BIOLOGIQUE (CAVALLIN *ET AL.*, 2000). SEA, SED ET SEE POSSEDENT 52 A 83% D'ACIDES AMINES IDENTIQUES ET SEB ET LES SEC POSSEDENT 62 A 64% D'ACIDES AMINES IDENTIQUES (MUNSON *ET AL.*, 1998). SEG ET SEI ONT 37 A 40% D'HOMOLOGIE AVEC SEB ET SEC, 26 A 28% D'HOMOLOGIE AVEC SEA, SED ET SEE, ET 21% D'HOMOLOGIE AVEC SEH (BALABAN ET RASOOLY, 2000 ; DINGES *ET AL.*, 2000). SEI PARTAGE DES RELATIONS PHYLOGENETIQUES PROCHES DE SEA. LES ENTEROTOXINES SEA ET SEI ONT DES STRUCTURES ET DES ACTIVITES SIMILAIRES (BALABAN ET RASOOLY, 2000). SEH EST LA PLUS DISTINCTE DE TOUTES LES ENTEROTOXINES, IL N'Y A PAS DE REACTIONS CROISEES AVEC D'AUTRES ENTEROTOXINES. SEJ A BEAUCOUP DE SIMILARITE DE SEQUENCE AVEC SEA, SEE ET SED (64 A 66%) (BALABAN ET RASOOLY, 2000).

L'ENTEROTOXINE SEC CONSISTE, EN REALITE, EN TROIS ENTEROTOXINES : SEC1, SEC2 ET SEC3 ELLES-MEME HAUTEMENT CONSERVEES AVEC DES REACTIONS IMMUNOLOGIQUES CROISEES IMPORTANTES. SEC1 ET SEC3 ONT 98% D'HOMOLOGIE DE SEQUENCE. SEC3 EST DIFFERENCIEE DE SEC2 ET SEC1 PAR QUATRE ET NEUF ACIDES AMINES, RESPECTIVEMENT (BALABAN ET RASOOLY, 2000). CES TROIS ENTEROTOXINES SONT ANTIGENIQUEMENT DISTINCTES (BALABAN ET RASOOLY, 2000), ET SONT CLASSEES SUR LA BASE DE DIFFERENCES MINEURES ANTIGENIQUES ET EN FONCTION DE L'HOTE ANIMAL AUQUEL ELLES SONT ASSOCIEES (PALMER, 1998). DES SOUCHES DE *S. AUREUS* ISOLEES DE DIFFERENTES ESPECES ANIMALES PRODUISENT UNE SEC SPECIFIQUE DE L'HOTE (BALABAN ET RASOOLY, 2000).

CES DERNIERES ANNEES, SEPT NOUVELLES ENTEROTOXINES ONT ETE DECOUVERTES : SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP ET SEQ (LINDSAY *ET AL.*, 1998 ; JARRAUD *ET AL.*, 2001 ; KURODA *ET AL.*, 2001). SEK ET SEL, AVEC SEI, CONSTITUENT UNE NOUVELLE SOUS-FAMILLE D'ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES, BIEN DISTINCTE DES AUTRES FAMILLES (ORWIN *ET AL.*, 2001). LELERTE *ET AL.* (2003) ONT RECEMMENT DEMONTRE LA PRESENCE

D'UNE NOUVELLE ENTEROTOXINE, SEU. CETTE ENTEROTOXINE A UNE FORTE HOMOLOGIE AVEC SEB, SEC ET SEG.

A CE JOUR, 19 ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES ONT ETE IDENTIFIEES.

Mode d'action

LES ENTEROTOXINES SONT DES PROTEINES PRODUITES DANS DES ALIMENTS CONTAMINES PAR UN NOMBRE SUFFISANT DE STAPHYLOCOQUES ENTEROTOXINOGENES, EN GENERAL, PLUS DE 10^5 CELLULES/G. CEPENDANT, LES ENTEROTOXINES SERAIENT DETECTABLES MEME A UN NIVEAU DE *S. AUREUS* FAIBLE (10^3 CELLULES/G) (PARK *ET AL.*, 1994 ; LAPEYRE, 1997A ; MEYRAND *ET AL.*, 1998). ELLES SONT PRODUITES COMME PRECURSEURS ET SONT DISSOCIEES POUR RENDRE LES ENTEROTOXINES EXTRACELLULAIRES MATURES, ACTIVES (RASOOLY ET RASOOLY, 1998). LES ENTEROTOXINES PROVOQUENT DES NAUSEES, DES VOMISSEMENTS, DES DOULEURS ABDOMINALES ET DE LA DIARRHEE APRES UNE PERIODE DE DEUX A SIX HEURES SUIVANT L'INGESTION DE L'ALIMENT CONTAMINE (ANONYME, 1997 ; BALABAN ET RASOOLY, 2000 ; COWELL *ET AL.*, 2002). DANS DES CAS SEVERES, DES MAUX DE TETE, DES TEMPERATURES SUBNORMALES OU DE LA FIEVRE, UNE BAISSSE DE TENSION, DU SANG ET DU MUCUS DANS LES SELLES, AINSI QUE DES VOMISSEMENTS PEUVENT AVOIR LIEU. NEANMOINS, LA MALADIE EST RAREMENT FATALE (EVENSON *ET AL.*, 1988 ; ANONYME, 1997 ; COWELL *ET AL.*, 2002). SEA, SEB, SEC, SED, SEE ET SEH, LES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES LES PLUS ETUDIEES A CE JOUR, PROVOQUENT UN EFFET EMETIQUE ET DES GASTRO-ENTERITES (BALABAN ET RASOOLY, 2000).

Les Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC)

UNE TOXI-INFECTION ALIMENTAIRE COLLECTIVE (TIAC) EST DEFINIE PAR L'INCIDENCE DE DEUX CAS, OU PLUS, D'UNE MALADIE SIMILAIRE, LA PLUS SOUVENT UNE GASTRO-ENTERITE, PROVOQUEE PAR L'INGESTION D'UN MEME PRODUIT (DE BUYSER *ET AL.*, 2001). LES VECTEURS DANS LES PRODUITS ALIMENTAIRES LES PLUS COMMUNS POUR DES INTOXICATIONS PAR *S. AUREUS* COMPRENNENT LA VIANDE, LA VOLAILLE, ET LES PRODUITS LAITIERS, TELS QUE LA CREME, LE FROMAGE ET LA CREME ANGLAISE (STRACHAN *ET AL.*, 1997 ; ANONYME, 2001).

UNE DOSE DE L'ORDRE DE 100 NG D'ENTEROTOXINES POUR UNE PRISE ALIMENTAIRE SUFFIT POUR PROVOQUER LES SYMPTOMES D'INTOXICATION (LAPEYRE, 1997B ; RASOOLY *ET AL.*, 1997). SUITE A UNE TIAC AUX USA, IMPLIQUANT DU LAIT CHOCOLATE, L'ANALYSE DE LA QUANTITE DE SEA QUI A PROVOQUE LES INTOXICATIONS, A MONTRE QU'IL FALLAIT INGERER APPROXIMATIVEMENT 144 NG DE L'ENTEROTOXINE. CEUX QUI ONT ETE MALADES AVAIENT INGERE ENTRE 94 ET 194 NG DE SEA, LES PLUS JEUNES ETANT LES PLUS SENSIBLES (EVENSON *ET AL.*, 1988). SEA EST UNE ENTEROTOXINE PUISSANTE ET DES CONCENTRATIONS AUSSI BASSES QUE 0,6 NG/ML PEUVENT PROVOQUER DES SYMPTOMES D'INTOXICATION (RASOOLY ET RASOOLY, 1998). SEA EST UNE DES PREMIERES ENTEROTOXINES LIEES A DES CAS DE TIAC (TSEN *ET AL.*, 1995 ; RASOOLY *ET AL.*, 1997), ENTRE 75 ET 87% DES TIAC SONT DUES A SEA (ONOU ET MORI, 1997). DANS DES CULTURES ISOLEES APRES 1990, DES FRAGMENTS DE GENES CODANT SEA, SEG, SEH ET SEI ETAIENT LE PLUS SOUVENT DETECTES, AVEC D'AUTRES ENTEROTOXINES, DANS 23, 44, 21 ET 21%, RESPECTIVEMENT, DES TIAC IMPLIQUANT PLUSIEURS TYPES D'ALIMENTS (MCLAUCHLIN *ET AL.*, 2000).

LOCALISATION DES GENES

SELON L'ENTEROTOXINE, LES GENES CODANT CELLE-CI PEUVENT SE TROUVER SUR LE CHROMOSOME, SUR UN PLASMIDE OU SUR UN PROPHAGE. SEA ET SED SONT ASSOCIEES A DES VECTEURS DE BACTERIOPHAGES ET DES PLASMIDES, RESPECTIVEMENT (GILLIGAN *ET AL.*, 2000). SEA EST ENCODEE SUR UN BACTERIOPHAGE DE *S. AUREUS* (BETLEY *ET AL.*, 1992 ; ZHANG *ET AL.*, 1998) ET SED EST ENCODEE SUR UN PLASMIDE, ANALOGUE A UN PLASMIDE DE PENICILLINASE (BETLEY *ET AL.*, 1992). POUR LES SOUCHES PRODUCTRICES DE L'ENTEROTOXINE D, UN CADRE DE LECTURE OUVERT CODANT SEJ SE TROUVE SUR LE PLASMIDE CODANT SED (ZHANG *ET AL.*, 1998). LES RESULTATS D'AMPLIFICATION PAR PCR, SUGGERENT QUE LE CADRE DE LECTURE OUVERT CODANT SEJ SE TROUVE SUR TOUS LES PLASMIDES CODANT SED (ZHANG *ET AL.*, 1998 ; BALABAN ET RASOOLY, 2000). SEE EST SOUPÇONNEE D'ETRE LIEE A UN BACTERIOPHAGE DE TRANSFORMATION DEFECTUEUSE QUI PORTE UNE SEQUENCE DE CODAGE SIMILAIRE A CELLE DE SEA (GILLIGAN *ET AL.*, 2000). LES GENES CODANT SEB, SEC, SEG, SEH ET SEI SE TROUVENT SUR LE CHROMOSOME (GILLIGAN *ET AL.*, 2000). NEANMOINS, LE GENE *SEB* PEUT SE TROUVER SUR LE CHROMOSOME OU SUR LE PLASMIDE, SELON LA PROVENANCE DE L'ISOLAT. SELON L'ORIGINE, LE GENE *SEC* PEUT SE TROUVER SUR UN PLASMIDE OU UN ILOT DE PATHOGENICITE (BALABAN ET RASOOLY, 2000). JARRAUD *ET AL.* (2001) ONT DECOUVERT UN OPERON, *EGC* (ENTEROTOXIN GENE CLUSTER). L'*EGC* CO-TRANSCRIT CINQ GENES ET DEUX PSEUDOGENES, ET CE GROUPE EST HAUTEMENT PREPONDERANT PARMIS DES ISOLATS DE *S. AUREUS*. IL EST EGALEMENT POSSIBLE QUE CE LOCUS JOUE LE ROLE D'UN RESERVOIR POUR LES GENES D'ENTEROTOXINES. L'*EGC* CODE POUR PLUSIEURS ENTEROTOXINES, DONT *SEG*, *SEI*, *SEM*, *SEN* ET *SEO* (JARRAUD *ET AL.*, 2001 ; ORWIN *ET AL.*, 2001). *SEU* RESULTE DE LA DIVERGENCE DES SEQUENCES DE DEUX PSEUDOGENES ENCODES PAR UN OPERON *EGC* DECRITE PAR JARRAUD *ET AL.* (2001), LE RESULTAT D'UNE INSERTION DANS LE PSEUDOGENE 1 DONNANT UN CADRE DE LECTURE OUVERT. LES GENES CODANT *SEK* ET *SEL* SE TROUVENT SUR UN ILOT DE PATHOGENICITE (LINDSAY *ET AL.*, 1998 ; KURODA *ET AL.*, 2001 ; ORWIN *ET AL.*, 2001).

L'EXPRESSION DES GENES

L'EXPRESSION DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES VARIE SELON LEUR MODE DE REGULATION. SEA EST EXPRIMEE A PARTIR DU MILIEU DE LA PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE (A PARTIR DE 160 MIN), ET N'EST PAS REGULEE PAR LE SYSTEME REGULATEUR DE GENES (*AGR* - ACCESSORY GENE REGULATOR) (RASOOLY ET RASOOLY, 1998). L'*AGR* EST UN LOCUS QUI REGULE L'EXPRESSION D'UN GRAND NOMBRE D'EXOPROTEINES STAPHYLOCOCCIQUES ET REGULE CETTE PRODUCTION TEMPORELLEMENT AVEC UNE EXPRESSION MAXIMALE PENDANT LA PHASE POST-EXPONENTIELLE DE CROISSANCE (BETLEY *ET AL.*, 1992). LA SYNTHESE DE SED EST REGULEE PAR LE SYSTEME *AGR* DE *S. AUREUS*, ET L'EXPRESSION DU GENE *SED*, EST INDUIT PENDANT LA PHASE DE CROISSANCE POST-EXPONENTIELLE (ZHANG *ET AL.*, 1998). LES GENES *SEB* ET *SEC* ONT, EUX AUSSI, BESOIN D'UN *AGR* FONCTIONNEL POUR UNE EXPRESSION MAXIMALE (BETLEY *ET AL.*, 1992 ; SCHMITZ *ET AL.*, 1998). POUR LE GENE *SEJ*, ZHANG *ET AL.* (1998) ONT INTRODUIT LES PLASMIDES, CONTENANT LES GENES *SED* ET *SEJ*, DANS DES HOTES DE *S.*

AUREUS AGR + ET AGR -. LES AUTEURS N'ONT PAS MIS EN EVIDENCE UNE REGULATION DU GENE SEJ PAR AGR.

LA RECHERCHE DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES

LA DETECTION DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES PEUT SE FAIRE PAR PLUSIEURS METHODES DIFFERENTES : DES TECHNIQUES IMMUNOCHIMIQUES, DES TECHNIQUES BIOLOGIQUES, DES METHODES BIOCHIMIQUES ET LA DETECTION DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES PAR DES METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE. LES TECHNIQUES IMMUNOCHIMIQUES SONT PLUS SENSIBLES ET SPECIFIQUES (PEREIRA *ET AL.*, 1996 ; SU ET WONG, 1997).

LA RECHERCHE DES ENTEROTOXINES PEUT ETRE DIVISEE EN DEUX ETAPES : (1) LA PREPARATION DE L'ECHANTILLON ET (2) LA DETECTION DES ENTEROTOXINES. POUR LES ALIMENTS, IL EST PRECONISE DE FAIRE PRECEDER LA DETECTION DES ENTEROTOXINES PAR UNE PHASE DE DIALYSE/CONCENTRATION ADAPTEE, POUR PALLIER LE FAIBLE RENDEMENT D'EXTRACTION DES ENTEROTOXINES (LAPEYRE, 1997B). LE SEUL FACTEUR AYANT UNE INFLUENCE SUR LA PREPARATION DE L'ECHANTILLON EST LA CONCENTRATION DES EXTRAITS PAR DIALYSE (HENNEKINNE *ET AL.*, 2003A). CETTE ETAPE MENE A UNE AUGMENTATION DU NIVEAU DE DETECTION DES ENTEROTOXINES (PAZAKOVA *ET AL.*, 1997). LA CHROMATOGRAPHIE D'IMMUNO-AFFINITE ET LA CHROMATOGRAPHIE EN BATCH COUPLEE AVEC LE WESTERN BLOTT ONT AUSSI ETE UTILISES POUR L'EXTRACTION/CONCENTRATION DES ENTEROTOXINES (BALABAN ET RASOOLY, 2001 ; LAPEYRE *ET AL.*, 2001). POUR LES PRODUITS LAITIERS UNE METHODE AUTRE QUE LA DIALYSE/CONCENTRATION (METHODE OFFICIELLE) EXISTE : LA PRECIPITATION PAR TCA (ACIDE TRICHLORACETIQUE) EST BEAUCOUP PLUS RAPIDE QUE LA METHODE OFFICIELLE (MEYRAND *ET AL.*, 1999A). LES ENTEROTOXINES SEC1, SEC2 ET SEC3, SONT, EN GENERAL, ANALYSEES ENSEMBLE A CAUSE DES REACTIONS IMMUNOLOGIQUES CROISEES.

LES TYPES DE METHODES QUI ONT DEJA ETE UTILISES POUR LA DETECTION DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES SONT PRESENTES PAR LA SUITE.

Techniques biologiques

UNE TECHNIQUE BIOLOGIQUE CONSISTE A DONNER DES ECHANTILLONS SUSPECTS A DES ANIMAUX, LE PLUS SOUVENT DES JEUNES MACAQUES RHESUS. SI L'ECHANTILLON PRODUIT UN EFFET EMETIQUE EN MOINS DE 5 H APRES INGESTION, IL CONTIENT UNE OU PLUSIEURS ENTEROTOXINES. CETTE METHODE A PLUSIEURS DESAVANTAGES, PARTICULIEREMENT SON COUT ELEVE ET SON MANQUE DE PRECISION (SU ET WONG, 1997) AINSI QUE LE PROBLEME D'ETHIQUE AVEC L'UTILISATION D'ANIMAUX. UNE AUTRE TECHNIQUE BIOLOGIQUE, POUR LA DETECTION DE SEB UNIQUEMENT, UTILISE UNE TEINTURE MELANGEE AVEC L'ENTEROTOXINE. CE MELANGE EST INJECTE DANS DES COCHONS D'INDE SENSIBILISES, POUR PROVOQUER UNE REACTION SUR LA PEAU. CETTE TECHNIQUE EST RELATIVEMENT SENSIBLE, MAIS N'EST PAS PRATIQUE (SU ET WONG, 1997).

Techniques immunochimiques

PLUSIEURS TECHNIQUES IMMUNOCHIMIQUES EXISTENT POUR LA DETECTION DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES (PIMBLEY ET PATEL, 1998) TELLES QUE : L'EXTRACTION/CONCENTRATION MICROPLAQUE ; LA TECHNIQUE RADIO-IMMUNOLOGIQUE ; LA TECHNIQUE D'AGGLUTINATION PASSIVE REVERSE DE PARTICULES DE LATEX (RPLA) ; LA TECHNIQUE IMMUNOENZYMATIQUE (EIA) (LAPEYRE *ET AL.*, 1996). L'EIA EST PLUS SENSIBLE POUR LA DETECTION DES ENTEROTOXINES (< 1 NG/G), QUE LES METHODES UTILISANT LA TECHNIQUE RPLA. CEPENDANT, LES METHODES IMMUNOCHIMIQUES POUR LA DETECTION DES ENTEROTOXINES SONT TOUJOURS DEPENDANTES DU SEUIL DE DETECTION DES ENTEROTOXINES (BECKER *ET AL.*, 1998). DES ANTICORPS MONO- OU POLYCLONAUX PEUVENT ETRE UTILISES POUR CES TECHNIQUES ET CELLES UTILISANT DES ANTICORPS MONOCLONAUX FOURNISSENT LES REACTIONS LES PLUS SPECIFIQUES (PEREIRA *ET AL.*, 1996 ; SU ET WONG, 1997).

LES TECHNIQUES LES PLUS UTILISEES SONT DES TECHNIQUES ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) ET RPLA, PRESENTEES PAR LA SUITE.

TECHNIQUES D'AGGLUTINATION

PLUSIEURS TECHNIQUES D'AGGLUTINATION EXISTENT POUR LA DETECTION DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES : HEMAGGLUTINATION, COAGGLUTINATION ET AGGLUTINATION PASSIVE REVERSE DE PARTICULES DE LATEX.

IL EXISTE DEUX PROCEDURES D'HEMAGGLUTINATION, PASSIVE ET REVERSE PASSIVE. BRIEVEMENT, DES DILUTIONS DE L'ECHANTILLON A ANALYSER SONT AJOUTEES DANS LES PUIITS ET REAGISSENT AVEC L'ANTICORPS. DES ENTEROTOXINES ERYTHROCYTAIRES SONT ENSUITE AJOUTEES ET S'AGGLUTINENT AVEC LES ANTICORPS LIBRES. AGGLUTINATION SE PRODUIT ALORS SI L'ECHANTILLON NE CONTIENT PAS D'ENTEROTOXINES. LA METHODE REVERSE PASSIVE EST UTILISEE QUAND LES ANTICORPS NE S'AGGLUTINENT PAS AVEC LES GLOBULES ROUGES. L'ANTICORPS EST COUPLE AVEC DES GLOBULES ROUGES DE MOUTON ET UN DEUXIEME ANTICORPS EST AJOUTE POUR S'AGGLUTINER A L'ENTEROTOXINE. AGGLUTINATION SE PRODUIT ALORS SI DES ENTEROTOXINES SONT PRESENTEES DANS L'ECHANTILLON (ROITT *ET AL.*, 1985 ; PIMBLEY ET PATEL, 1998).

POUR LES METHODES DE CO-AGGLUTINATION, L'ANTICORPS DE L'ENTEROTOXINE VISEE, EST COUPLE AVEC LA PROTEINE A DES CELLULES NON-VIABLES DE *S. AUREUS*. CETTE PROTEINE EST UNE PROTEINE DE LA PAROI DE *S. AUREUS* ET UN RECEPTEUR NATUREL D'ANTICORPS. ELLE SE LIE A LA PARTIE FC DE L'ANTICORPS, PERMETTANT AUX SITES FAB D'ETRE EXPOSES SUR LA SURFACE DES CELLULES DE *S. AUREUS* (VOIR LA FIGURE 1). CES CELLULES SENSIBILISEES SONT MELANGEES AVEC L'ECHANTILLON. L'AGGLUTINATION SE PRODUIT EN DIX MINUTES SI L'ENTEROTOXINE EST PRESENTE (ROITT *ET AL.*, 1985 ; PIMBLEY ET PATEL, 1998).

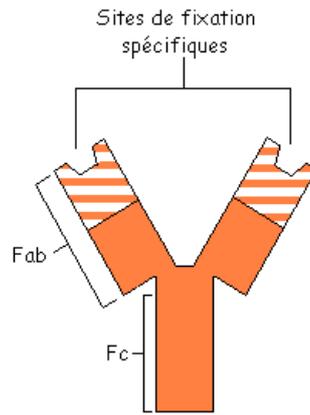


Figure 1 : l'anticorps, d'après Roitt *et al.* (1985)

LA TECHNIQUE D'AGGLUTINATION PASSIVE REVERSE DE PARTICULES DE LATEX (RPLA) PEUT ETRE UTILISEE POUR LA DETECTION DES ENTEROTOXINES DANS DES ALIMENTS OU DANS DES MILIEUX DE CULTURE. L'ANTICORPS EST ATTACHE A DES PARTICULES EN LATEX ET IL REAGIT AVEC L'ANTIGENE SOLUBLE (L'ENTEROTOXINE). L'AGGLUTINATION SE PRODUIT EN PRESENCE DE L'ENTEROTOXINE ET UNE COUCHE DIFFUSE SE FORME ; SI L'ANTIGENE N'EST PAS PRESENT LES PARTICULES FORMENT UN « BOUTON » COMPACT (PIMBLEY ET PATEL, 1998).

TECHNIQUES IMMUNO-ENZYMATIQUES

LES TECHNIQUES ELISA SONT RAPIDES ET SENSIBLES POUR LA DETECTION DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES (SU ET WONG, 1997 ; PIMBLEY ET PATEL, 1998). IL EXISTE DEUX TYPES D'ELISA QUI ONT DEJA ETE UTILISES POUR LA DETECTION DES ENTEROTOXINES : COMPETITIF ET NON COMPETITIF.

TECHNIQUE D'ELISA COMPETITIF

UNE ENTEROTOXINE, CONJUGUEE AVEC UNE ENZYME TELLE QUE LA PEROXYDASE, EST UTILISEE POUR CONCURRENCER L'ENTEROTOXINE PRESENTE DANS LES ECHANTILLONS POUR LES SITES DE FIXATION SUR LES ANTICORPS IMMOBILISES. LA FIXATION DE CES MOLECULES CONJUGUEES EST DEPENDANTE DE LA QUANTITE D'ENTEROTOXINE DANS L'ECHANTILLON. PLUS LA QUANTITE D'ENTEROTOXINE DANS L'ECHANTILLON EST IMPORTANTE, MOINS L'ENZYME CONJUGUEE SE FIXE SUR LES SITES. LA PRESENCE DE L'ENTEROTOXINE CONJUGUEE EST REVELEE PAR UN CHANGEMENT DE COULEUR. L'INTENSITE DE LA COULEUR EST INVERSEMENT PROPORTIONNELLE A LA QUANTITE D'ENTEROTOXINES PRESENTE DANS L'ECHANTILLON (ROITT *ET AL.*, 1985 ; SU ET WONG, 1997).

TECHNIQUE D'ELISA SANDWICH

DES ANTICORPS SPECIFIQUES SONT ADSORBES SUR UNE PHASE SOLIDE. LES SITES D'ADSORPTION SUR LA PHASE SOLIDE, QUI NE SONT PAS OCCUPES, SONT BLOQUES. LES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES DANS LES ECHANTILLONS SE LIENT AUX ANTICORPS ATTACHES ET SONT ENSUITE DETECTEES PAR L'ADDITION D'UN ANTICORPS, MARQUE AVEC UNE ENZYME. LA METHODE SANDWICH EST PLUS SENSIBLE QUE LA METHODE COMPETITIVE ET NECESSITE MOINS D'ENTEROTOXINE PAR ANALYSE. CEPENDANT, LA PROTEINE A,

PRODUITE PAR *S. AUREUS*, PEUT CREER DES INTERFERENCES EN SE LIANT A LA PARTIE FC (VOIR FIGURE 1) DE L'IMMUNOGLOBULINE (L'ANTICORPS) ET PEUT AINSI DONNER DES FAUX POSITIFS (SU ET WONG, 1997), PARTICULIEREMENT DANS DES SURNAGEANTS DE CULTURE AVEC DE FORTES QUANTITES DE PROTEINE A. NEANMOINS, CE PROBLEME N'AS PAS ETE RENCONTRE DANS L'EXAMEN DES EXTRAITS ALIMENTAIRES. L'UTILISATION DE CETTE METHODE PERMET LA DILUTION (10 A 50 FOIS) DU SURNAGEANT DE CULTURE TESTE, AVEC UNE SENSIBILITE SUFFISANTE POUR CLASSER LES SOUCHES COMME ENTEROTOXINOGENES (FREED *ET AL.*, 1982).

POURTANT, IL EXISTE QUELQUES DESAVANTAGES A LA DETECTION DE SEA AVEC LA METHODE ELISA. SEA NE REAGIT PAS BIEN AVEC LES ANTICORPS QUAND LES ALIMENTS TRAITES A LA CHALEUR SONT ANALYSES. L'UREE PEUT ETRE UTILISEE POUR RENATURER LA SEA TRAITEE A LA CHALEUR POUR LA RENDRE SEROLOGIQUEMENT ACTIVE (RASOOLY ET RASOOLY, 1998).

TECHNIQUE D'IMMUNODIFFUSION

CETTE TECHNIQUE EST SEMI-QUANTITATIVE ET PEUT DETECTER 500 NG/ML. LES ENTEROTOXINES AVEC LES ANTICORPS FORMENT UNE LIGNE DE PRECIPITATION (SU ET WONG, 1997 ; PIMBLEY ET PATEL, 1998). IL EXISTE PLUSIEURS VERSIONS TELLES QUE LA TECHNIQUE EN MICRO-PLAQUE QUI PEUT DETECTER 100 NG/ML.

TECHNIQUE DE FILTRATION IMMUNOENZYMATIQUE (ELIFA)

CETTE TECHNIQUE EST UNE ALTERNATIVE RAPIDE AUX AUTRES METHODES IMMUNOCHIMIQUES. LA FILTRATION DE L'ECHANTILLON (L'ANTIGENE) PAR LA MEMBRANE ACCELERE LA REACTION AVEC L'ANTICORPS (PIMBLEY ET PATEL, 1998).

TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE

CETTE TECHNIQUE PEUT ETRE UTILISEE POUR DES ESTIMATIONS QUANTITATIVES DE LA CONCENTRATION DE L'ANTICORPS. IL EST POSSIBLE D'IDENTIFIER, EN UNE SEULE FOIS, DES ANTICORPS DIRIGES CONTRE PLUSIEURS ANTIGENES DIFFERENTS (ROITT *ET AL.*, 1985 ; BRETT, 1998).

TECHNIQUE DE SEPARATION IMMUNOMAGNETIQUE

LA SEPARATION IMMUNOMAGNETIQUE (IMS) OFFRE L'AVANTAGE DE LA CAPTURE ET DE LA CONCENTRATION DE L'ANTIGENE A PARTIR D'UNE GRANDE VARIETE DE MATRICES BIOLOGIQUES COMPLEXES. LA LIMITE DE DETECTION EST DE 0,001 NG/ML ET LA LIMITE DE QUANTIFICATION EST DE 0,1 NG/ML POUR L'ENTEROTOXINE B (KIJEK *ET AL.*, 2000).

Autres techniques

WESTERN IMMUNOBLOTTING

LE WESTERN BLOTTING EST UNE TECHNIQUE D'IDENTIFICATION DE PROTEINES. LES PROTEINES SONT SEPARÉES EN FONCTION DE LEUR TAILLE PAR SDS PAGE (SODIUM DODECYL SULFATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESE). ENSUITE, LES PROTEINES

SONT TRANSFEREES SUR UNE MEMBRANE DE NITROCELLULOSE SONDEE AVEC LES ANTICORPS APPROPRIES. LE POIDS MOLECULAIRE IDENTIFIE L'ANTIGENE QUI REAGIT AVEC L'ANTICORPS (WIDMER ET BEFFA, 1997 ; RASOOLY ET RASOOLY, 1998). UNE FAIBLE CONCENTRATION DE 0,1 NG/ML PEUT ETRE DETECTEE (RASOOLY ET RASOOLY, 1998), MAIS DOIT ETRE DILUE 10 FOIS POUR REDUIRE LE BRUIT DE FOND DANS LE LAIT.

PROLIFERATION DES CELLULES T

L'ACTIVITE SUPERANTIGENIQUE PEUT ETRE DETECTEE EN MESURANT L'ACTIVATION DES CELLULES T PAR LA TECHNIQUE DE CYTOFLUOROMETRIE EN FLUX SPECIFIQUE. CETTE METHODE PERMET LA SEPARATION DES CELLULES SELON LEUR TAILLE ET L'INTENSITE DE LA FLUORESCENCE ASSOCIEE. (ROITT *ET AL.*, 1985 ; RASOOLY *ET AL.*, 1997 ; JARRAUD *ET AL.*, 1999).

METHODES BIOCHIMIQUES

DES TECHNIQUES BIOCHIMIQUES, TELLES QUE LA CHROMATOGRAPHIE ET LA SPECTROMETRIE DE MASSE, ONT ETE UTILISEES POUR IDENTIFIER ET CARACTERISER DES TOXINES BACTERIENNES. CEPENDANT, CES TECHNIQUES PRENNENT BEAUCOUP DE TEMPS (BRETT, 1998).

AUJOURD'HUI, DES KITS COMMERCIAUX SONT LE PLUS SOUVENT UTILISES POUR LA DETECTION DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES ET DONNENT DES RESULTATS RAPIDES (BRETT, 1998).

Caractérisation des gènes codant les entérotoxines staphylococciques

LA TECHNIQUE PCR EST LE PLUS SOUVENT UTILISEE POUR LA RECHERCHE DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES.

LES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES ENTEROTOXINES SEA, SEB, SEC, SED SEE, SEG, SEH, SEI ET SEJ SONT CONNUES. DES SONDAS D'ADN, SPECIFIQUES POUR CHACUN DE CES GENES, PEUVENT ETRE UTILISEES POUR UNE REPLICATION SPECIFIQUE, PAR LA TECHNIQUE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION). CEPENDANT, CETTE METHODE NE DISTINGUE PAS LES CELLULES VIABLES DE CELLES NON-VIABLES (SU ET WONG, 1997 ; PIMBLEY ET PATEL, 1998). LA DETECTION SPECIFIQUE DES FRAGMENTS DU GENE DE L'ENTEROTOXINE N'INDIQUE DONC PAS SI L'ORGANISME A LA CAPACITE DE PRODUIRE DES ENTEROTOXINES BIOLOGIQUEMENT INTACTES, NI S'IL A LA CAPACITE D'EN PRODUIRE ASSEZ POUR INDUIRE UNE INTOXICATION OU UNE INFECTION. LA PRESENCE DU GENE INDIQUE LA POSSIBILITE DE PROVOQUER UNE MALADIE, NEANMOINS LA DETECTION DE L'ENTEROTOXINE ELLE-MEME EST RECOMMANDEE (JARRAUD *ET AL.*, 1999 ; MONDAY ET BOHACH, 1999 ; MCLAUHLIN *ET AL.*, 2000 ; AKINEDEN *ET AL.*, 2001 ; CHEN *ET AL.*, 2001 ; ROSEC ET GIGAUD, 2002). DE PLUS, DES ETUDES DE COMPARAISON ENTRE LA PRESENCE DES GENES PAR PCR ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES AVEC LES TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES ONT CONFIRME QUE, POUR LES ENTEROTOXINES DETECTABLES AVEC LES KITS DISPONIBLES AUJOURD'HUI, LA PRESENCE DU GENE N'IMPLIQUE PAS FORCEMENT LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES (SHARMA *ET AL.*, 2000 ; ZSCHÖCK *ET AL.*, 2000A ; CHEN *ET AL.*, 2001).

DE BOER ET CHOW (1994), ONT PU DEMONSTRER, PAR UTILISATION DE LA TECHNIQUE PCR, QUE LES GENES CODANT TSST-1 ET SEB SONT PROCHES L'UN DE L'AUTRE. SUITE A L'ANALYSE D'UNE SELECTION DE SOUCHES PRODUCTRICES DE TSST-1 ET/OU SEB, ILS ONT REMARQUE QUE LES SOUCHES CONTENANT LES DEUX GENES CODANT TSST-1 ET SEB NE PRODUISENT QUE TSST-1. DE PLUS, LES SOUCHES ANALYSEES QUI PRODUISENT SEB, NE CONTIENT PAS LE GENE CODANT TSST-1. LA NON-PRODUCTION DE SEB PEUT DONC ETRE DUE AU FAIT QUE L'ELEMENT GENETIQUE CODANT TSST-1 S'INSERE DANS LE DETERMINANT GENETIQUE DE SEB. PAR CONSEQUENT, C'EST UNE DES RAISONS POUR LESQUELLES CERTAINES SOUCHES ONT LE GENE, MAIS NE L'EXPRIMENT PAS. DE MEME, ZHANG *ET AL.* (1998), ONT PU MONTRER QUE LES GENES *SED* ET *SEJ* SE TROUVENT SUR LE MEME ELEMENT GENETIQUE. McCLAUCHLIN *ET AL.* (2000) ONT TESTE DES ISOLATS DE *S. AUREUS*, COLLECTES A PARTIR D'ALIMENTS INCRIMINES DANS DES TIAC ET A PARTIR D'AUTRES PRODUITS ALIMENTAIRES. ILS ONT TESTE EGALEMENT DES ISOLATS HUMAINS, POUR LEUR PRODUCTION D'ENTEROTOXINES (A A E) ET POUR LA PRESENCE DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES A, B, C, D, E, G, H ET I. CERTAINS ISOLATS COLLECTES A PARTIR D'ALIMENTS IMPLIQUES DANS DES TIAC NE POSSEDENT PAS LES GENES CODANT SEA A SEE, MAIS DES GENES CODANT SEG ET SEI SONT RETROUVES.

LES ETUDES DE ROSEC *ET AL.* (1998 ; 2002) SUR LA RECHERCHE DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES (A A J), DEMONTRENT QUE BEAUCOUP DE SOUCHES DITES NON PRODUCTRICES D'ENTEROTOXINES POSSEDENT EN REALITE UN OU PLUSIEURS GENES CODANT LES ENTEROTOXINES, NON DETECTABLES AVEC LES KIT DISPONIBLES SUR LE MARCHE AUJOURD'HUI. CE QUI MONTRE LA POSSIBILITE DU DANGER EN COURU POUR LA SANTE AVEC DE NOMBREUSES SOUCHES DE *S. AUREUS*. NEANMOINS, IL NE FAUT PAS OUBLIER QUE LA PRESENCE DU GENE N'IMPLIQUE PAS AUTOMATIQUEMENT UNE PRODUCTION D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*, ET *A FORTIORI, IN VIVO*.

LA PCR PLUS PARTICULIEREMENT UTILISEE POUR LA RECHERCHE DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES, A EGALEMENT ETE UTILISEE POUR L'IDENTIFICATION DE SOUCHES DE *S. AUREUS* ET D'AUTRES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES ISOLEES DE PRODUITS LAITIERES (MÄNTYNEN *ET AL.*, 1997) D'UNE PART, ET D'AUTRES ORIGINES (MENDOZA *ET AL.*, 1998 ; BENITO *ET AL.*, 2000) D'AUTRE PART. CERTAINS AUTEURS L'ONT UTILISEE POUR LA DISCRIMINATION DES ISOLATS D'INFECTIONS MAMMAIRES DE BOVINS (BES *ET AL.*, 2000).

LES KITS DE DETECTION DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES

TOUS LES KITS ACTUELLEMENT SUR LE MARCHE UTILISENT DES TECHNIQUES IMMUNOCHIMIQUES. LE FORMAT COMMUN EST L'ELISA NON COMPETITIF, AVEC UNE PHASE SOLIDE SUR UNE PLAQUE MICRO-TITRE, ALORS QUE CERTAINS KITS UTILISENT DES TUBES OU DES BILLES EN POLYSTYRENE ENDUITS. LES RESULTATS PEUVENT ETRE LUS A L'ŒIL NU OU PAR UNE MACHINE ET SONT, SOIT POSITIFS, SOIT NEGATIFS. UN SEUIL DE DETECTION EST DETERMINE POUR LES RESULTATS POSITIFS (APRES AVOIR PRIS EN COMPTE LA DENSITE OPTIQUE DU CONTROLE NEGATIF). POUR L'ANALYSE DES PRODUITS ALIMENTAIRES, IL FAUT QUE LES METHODES PUISSENT DETECTER AU MOINS 0,4 NG/G D'ECHANTILLON (BRETT, 1998).

IL EXISTE UNE VARIETE DE KITS COMMERCIAUX (TABLEAU IV) POUR LA DETECTION RAPIDE DES ENTEROTOXINES DANS L'ALIMENTATION (LAPEYRE, 1997A ; SU ET WONG, 1997 ; BRETT, 1998 ; PIMBLEY ET PATEL, 1998).

TABLEAU IV : KITS COMMERCIAUX SUR LE MARCHÉ POUR LA DÉTECTION DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES, ET LEURS CARACTÉRISTIQUES RESPECTIVES.

Kit	Sensibilité	Entérotoxines détectées	Temps du test (h)	Différentiation
SET-EIA (Bommeli)	0,1-1,0 ng/ml	SEA-SED (SEH‡)	20	Oui
RIDASCREEN (Biopharm)	0,2-0,75 ng/ml	SEA-SEE	3	Oui
TECRA (Bioentreprises)	1,0 ng/ml	SEA-SEE	4 ou 21*	Non
TRANSIA (Transia-Diffchamb)	0,2 ng/ml	SEA-SEE	1.5	Non
SET-RPLA (Oxoid)	0,5-1,0 ng/ml	SEA-SED (SEE†)	20	Oui
VIDAS (Bio Mérieux)	1,0 ng/ml	SEA-SEE	2	Non

* le test est plus long pour les échantillons d'aliments traités à la chaleur ; † SEE détectée comme un faible titre de SEA ; ‡ SEH détectée comme SED. SET = staphylococcal enterotoxin test.

RIDASCREEN, SET-EIA, TECRA ET TRANSIA SONT DES TESTS BASES SUR LA METHODE ELISA, RPLA UTILISE LA TECHNIQUE D'AGGLUTINATION PASSIVE REVERSE DE PARTICULES DE LATEX ET LE VIDAS UTILISE LA TECHNIQUE D'IMMUNOFLOUORESCENCE ELFA (ENZYME LINKED FLUORESCENT ASSAY). LE KIT TECRA EST RECOMMANDE PAR L'AOAC (METHODE 993.06), ET LE KIT TRANSIA EST LA METHODE OFFICIELLE RECOMMANDEE PAR LE MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET PRECONISEE PAR L'AFSSA (LAPEYRE, 1997A ; SU ET WONG, 1997). LES KITS TRANSIA ET SET-RPLA (OXOID) SONT PRESENTES PAR LA SUITE).

Le kit TRANSIA (Transia-Diffchamb)

LE KIT TRANSIA UTILISE LA TECHNIQUE ELISA SANDWICH QUI EMPLOIE UN MELANGE D'ANTICORPS MONO- ET POLYCLONAUX POUR LA DÉTECTION DE SEA A SEE (LAPEYRE ET AL., 1996 ; PIMBLEY ET PATEL, 1998), MAIS N'IDENTIFIE PAS LES ENTEROTOXINES INDIVIDUELLEMENT (BRETT, 1998). LA METHODE OFFICIELLE PRECONISEE PAR L'AFSSA COMPORTE UNE PHASE DE DIALYSE/CONCENTRATION PUIS L'UTILISATION OBLIGATOIREMENT DE L'UNE DES DEUX TROUSSES (TUBE OU PLAQUE) TRANSIA (LAPEYRE, 1997B). A CE JOUR, TRANSIA EST LE TEST QUI PRESENTE LE MOINS D'INTERFERENCES AVEC LES ENZYMES ENDOGENES DE LA MATRICE LAITIERE (LAPEYRE, 1997B).

DANS UNE ETUDE INTERNATIONALE INTERLABORATOIRE, LAPEYRE ET AL. (1996), ONT SOLLICITE 13 LABORATOIRES POUR VALIDER LE KIT TRANSIA. LES SOUCHES ENTEROTOXINOGENES ONT ETE TRAITÉES AVEC DU SERUM DE LAPIN NORMAL POUR EVITER DES FAUX POSITIFS POUVANT SE PRODUIRE A CAUSE DE LA PROTEINE A PRODUIT PAR *S. AUREUS*. LA LECTURE SE FAISAIT A L'ŒIL NU OU PAR LA DENSITE OPTIQUE (DO) A 450 NM. POUR UN RESULTAT POSITIF, LE SEUIL ETAIT DE 0,2 NG/ML. DANS LA MAJORITE DES CAS, DE FAIBLES CONCENTRATIONS DE CONTAMINATION (0,2 NG/G) DONNAIENT DES VALEURS DE DENSITE OPTIQUE COMPRISES ENTRE CELLES DES CONTROLES POSITIFS ET CELLES DES CONTROLES NEGATIFS. DANS LA PLUPART DES LABORATOIRES, UNE BONNE REPETIBILITE (< 0,2 NG/G PAR RAPPORT A LA MOYENNE) A ETE OBSERVEE POUR LA MAJORITE DES CONTROLES. LES LABORATOIRES N'ONT PAS EU DE FAUX POSITIFS ET LA SPECIFICITE ETAIT BONNE. DANS LE LAIT, DES NIVEAUX DE CONTAMINATION MOYEN ET HAUT ONT ETE DETECTES. LE PROTOCOLE D'EXTRACTION DES ENTEROTOXINES DANS LE FROMAGE PERMET DE DETECTER DES ENTEROTOXINES A UN NIVEAU DE 1,5 NG/G. LE SEUIL DE DETECTION EST

DE 1NG/ML POUR LE LAIT ET DE 1,5 NG/G POUR LE FROMAGE AU LAIT CRU. QUATRE LABORATOIRES ONT ETE EXCLUS A CAUSE DE RESULTATS INCOHERENTS.

TOUTEFOIS, SUITE A CETTE ETUDE, LE KIT TRANSIA A ETE VALIDE PAR L'AFNOR POUR LA DETECTION D'ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES DANS DES ECHANTILLONS D'ALIMENTS ET DE MILIEUX DE CULTURE (LAPEYRE *ET AL.*, 1996).

Le kit SET-RPLA (Oxoid)

LE SET-RPLA (OXOID) EST UN TEST IMMUNOCHIMIQUE POUR LA DETECTION SIMULTANEE DE SEA, SEB, SEC ET SED, DANS DES EXTRAITS D'ALIMENTS ET DE FILTRATS DE CULTURE, EN APPROXIMATIVEMENT 20 H. LES QUATRE ENTEROTOXINES PEUVENT ETRE DISTINGUEES ET LE RESULTAT PEUT ETRE LU A L'ŒIL NU (SU ET WONG, 1997 ; BRETT, 1998 ; PIMBLEY ET PATEL, 1998). LA TECHNIQUE RPLA EST DECRITE PLUS PRECISEMENT DANS LA SECTION 2.4.2.1. AVEC LE SET-RPLA, DES REACTIONS NON SPECIFIQUES ET DES FAUX NEGATIFS ONT ETE OBSERVES POUR LES ANALYSES DE FROMAGE (BRETT, 1998). DANS DES ESSAIS SUR DU LAIT ECREME, EL DAIROUTY, (1998) A COMPARE L'APTITUDE DE DETECTION DU SET-RPLA (OXOID) AVEC SA PROPRE METHODE PA (PROTEINE A)-RPLA ET LA TECHNIQUE MICROPLAQUE. AVEC UN NIVEAU DE CONTAMINATION DONNE, LE TEST MICROPLAQUE N'A DETECTE AUCUNE ENTEROTOXINE TANDIS QUE LES METHODES SET-RPLA ET PA-RPLA ONT DETECTE DES ENTEROTOXINES A SENSIBILITE EGALE. SEE PEUT ETRE DETECTEE PAR CETTE TECHNIQUE MAIS ELLE EST DETECTEE COMME ETANT SEA. DE PLUS, CETTE TECHNIQUE PEUT QUELQUES FOIS PRODUIRE DES AGGLUTINATIONS NON SPECIFIQUES. NEANMOINS, CE KIT EST LE MOINS COUTEUX, LE PLUS FACILE A UTILISER ET NE NECESSITE AUCUN EQUIPEMENT SPECIFIQUE (SU ET WONG, 1997 ; BRETT, 1998 ; PIMBLEY ET PATEL, 1998).

LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER (IRTF) POUR L'IDENTIFICATION ET LA DISCRIMINATION DES MICRO-ORGANISMES

La spectroscopie Infrarouge

L'INFRAROUGE (IR) FAIT PARTIE DU SPECTRE ELECTROMAGNETIQUE ET LA SPECTROSCOPIE IR (PAVIA *ET AL.*, 1979 ; BANWELL ET McCASH, 1994) EST UTILISEE POUR ETUDIER LES INTERACTIONS DES MOLECULES AVEC LES RAYONNEMENTS IR. LE DOMAINE DE L'INFRAROUGE SE SITUE ENTRE 14300 ET 10 CM⁻¹ ET SE COMPOSE DE TROIS REGIONS : LE PROCHE INFRAROUGE (PIR) = DE 14300 A 4000 CM⁻¹ ; LE MOYEN INFRAROUGE (MIR) = DE 4000 A 200 CM⁻¹ ; L'INFRAROUGE LOINTAIN (IRL) = DE 200 A 10 CM⁻¹.

LA FORMULE GENERALE POUR L'ENERGIE DES RAYONNEMENTS ELECTROMAGNETIQUES EST DONNEE PAR L'EQUATION SUIVANTE :

$$E = h\nu$$

où E = énergie lumineuse
h = constante de Planck (6,626 x 10⁻³⁴ J.s)
ν = fréquence de l'onde concernée (s)

LES BANDES INFRAROUGES SONT LE PRODUIT D'UN ECHANGE D'ENERGIE ENTRE LES QUANTA ET LES MODES DE VIBRATION ET DE ROTATION DES LIAISONS ATOMIQUES. QUAND UN

ECHANTILLON EST IRRADIE AVEC L'IR, LES LIAISONS QUI VIBRENT VONT ABSORBER DE L'ENERGIE.

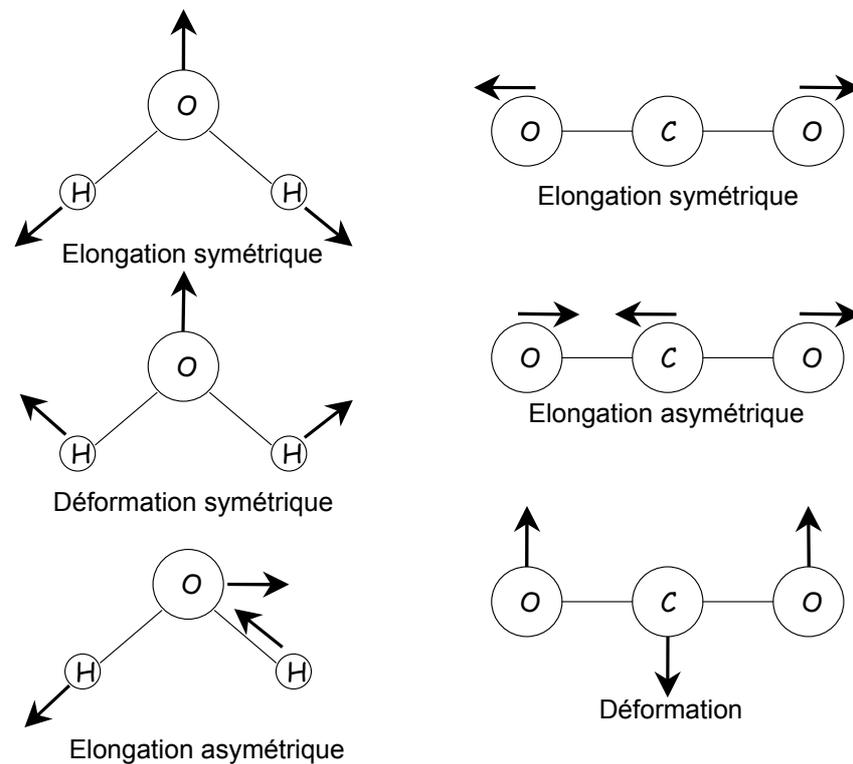


Figure 2 : schéma de quelques modes de vibration, exemple d'une molécule d'eau et d'une molécule de dioxyde de carbone (Banwell et McCash, 1994).

LES FREQUENCES ABSORBEES SONT SPECIFIQUES AUX VIBRATIONS DES LIAISONS IMPLIQUEES ET L'ENERGIE EST ABSORBEE QUAND LA FREQUENCE DU RAYONNEMENT ET LA FREQUENCE DE VIBRATION DE LA MOLECULE SONT EGALES.

LA TOTALITE DE L'ENERGIE ABSORBEE EST EGALE A L'ENERGIE NECESSAIRE POUR PASSER A L'ETAT SUPERIEUR D'EXCITATION. CEPENDANT, L'ABSORPTION SE FAIT SEULEMENT QUAND LA VIBRATION DE LA MOLECULE EST ACCOMPAGNEE D'UN CHANGEMENT DE DIPOLE. L'ENERGIE ABSORBEE EST DONNEE PAR L'EQUATION :

$$h\nu = E_j - E_i \quad \text{OU} \quad \begin{array}{l} E_j = \text{ENERGIE FONDAMENTALE} \\ E_i = \text{ENERGIE DE L'ETAT D'EXCITATION} \end{array}$$

UNE MOLECULE EST CARACTERISEE PAR DES NIVEAUX D'ENERGIE, CORRESPONDANTS A DIFFERENTS ETATS PHYSIQUES D'EXCITATION, QUI SONT L'ENERGIE ELECTRONIQUE DE L'ATOME ET L'ENERGIE DE VIBRATION ET DE ROTATION DES LIAISONS INTER ATOMIQUES.

CHAQUE ETAT A BESOIN D'UNE QUANTITE D'ENERGIE DIFFERENTE, L'ENERGIE ELECTRONIQUE ETANT LA PLUS ENERGETIQUE. DANS LE PIR, TOUS LES NIVEAUX ENERGETIQUES S'EXPRIMENT, MAIS DANS LE MIR ET LE IRL, L'ENERGIE DES RAYONNEMENTS EST PLUS FAIBLE, DONC SEULS LES NIVEAUX ENERGETIQUES DE VIBRATION ET DE ROTATION SONT EXPRIMES. LES DIFFERENTES MODES DE VIBRATION ET DE ROTATION SONT PRESENTEES DANS LA FIGURE 2.

IL EXISTE DEUX TYPES PRINCIPAUX DE SPECTROSCOPIE INFRAROUGE, DISPERSIVE ET TRANSFORMEE DE FOURIER. POUR CETTE ETUDE, NOUS NOUS SOMMES INTERESSES A LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER DANS LE DOMAINE DU MOYEN INFRAROUGE.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

LE SPECTROMETRE

LE SPECTROMETRE A TRANSFORMEE DE FOURIER (NAUMANN *ET AL.*, 1991 ; BANWELL ET MCCASH, 1994) EST CONSTITUE DE TROIS COMPOSANTS DE BASE :

- Une source
- Un interféromètre de Michelson
- Un détecteur

L'INTERFEROMETRE DE MICHELSON REPRESENTE L'ELEMENT ORIGINAL DU DISPOSITIF. IL COMPREND :

- Une séparatrice semi-réfléchissante
- Un miroir fixe
- Un miroir mobile

L'INTERIEUR D'UN APPAREIL INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER EST PRESENTE DANS LA FIGURE 3. CE SYSTEME PRESERVE LES INFORMATIONS SUR LA FREQUENCE ET L'INTENSITE, ET IL REMPLACE LE MONOCHROMATEUR CONVENTIONNEL.

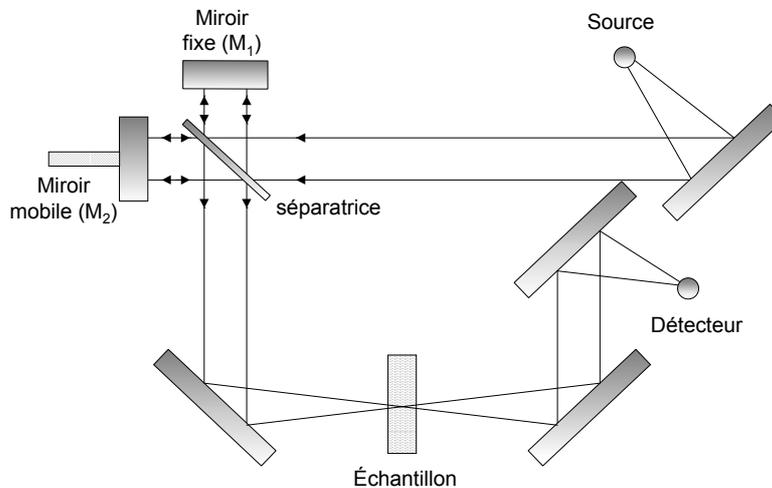


Figure 3 : schéma de l'intérieur d'un appareil infrarouge à transformée de Fourier (Banwell et McCash, 1994).

PRINCIPE DE L'APPAREIL

(1) LE RAYONNEMENT EST FOCALISE SUR L'INTERFEROMETRE (ANONYME, 1986). AU NIVEAU DE LA SEPARATRICE, PLACEE SELON UN ANGLE DE 45 DEGRES PAR RAPPORT AU FAISCEAU, LE RAYONNEMENT EST DIVISE EN DEUX : 50% DU RAYONNEMENT EST ORIENTE SUR LE MIROIR FIXE ET 50% EST ORIENTE SUR LE MIROIR MOBILE.

(2) LE RAYONNEMENT ISSU DE CHACUN DE CES DEUX MIROIRS SE RECOMBINE SUR LA SEPARATRICE. LES INTERFERENCES, SOIT CONSTRUCTIVES SOIT DESTRUCTIVES, SONT PRODUITES EN FONCTION DE LA POSITION DU MIROIR MOBILE.

(3) CE RAYONNEMENT PASSE ENSUITE A TRAVERS L'ECHANTILLON QUI ABSORBE A CERTAINES LONGUEURS D'ONDE SPECIFIQUES AVANT D'ATTEINDRE LE DETECTEUR.

TOUTES LES FREQUENCES SONT OBSERVEES SIMULTANEMENT PAR LE DETECTEUR. LE SIGNAL EST LA SOMME DE CES SIGNAUX SINUSOÏDAUX QU'IL EST POSSIBLE DE RESOUDRE EN CES COMPOSANTS SEPRES. POUR LES CAS SIMPLES, DES EQUATIONS SIMULTANEEES SONT UTILISEES ET POUR LES SIGNAUX PLUS COMPLEXES, UNE TRANSFORMATION DE FOURIER. CETTE METHODE, DEVELOPPEE PAR JEAN-BAPTISTE FOURIER, PERMET DE TRANSFORMER LA SOMME DES INTERFERENCES CREES PAR L'INTERFEROMETRE, L'INTERFEROGRAMME, EN UNE FONCTION CONTINUE DEPENDANTE DE LA FREQUENCE DU SIGNAL (BANWELL ET McCASH, 1994).

Les micro-organismes et la spectroscopie IRTF

LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE POUR L'IDENTIFICATION ET LA CLASSIFICATION DES MICRO-ORGANISMES A ETE ETUDIEE DANS LES ANNEES 50, MAIS N'A PAS ETE DEVELOPPEE A CETTE EPOQUE. AVEC L'AMELIORATION DES TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES ET LE DEVELOPPEMENT DES APPAREILS A TRANSFORMEE DE FOURIER, CETTE METHODE A ETE REPRISSE DANS LES ANNEES 80.

INFORMATION SPECTRALE

LA SPECTROSCOPIE IR EST SENSIBLE AUX CHANGEMENTS MOLECULAIRES INDUITS PAR LES VARIATIONS DE COMPOSITION CHIMIQUE. LE SPECTRE D'UNE BACTERIE EST SPECIFIQUE, CAR LA PROPORTION DES DIFFERENTS CONSTITUANTS PROTEIQUES, LIPIDIQUES, GLUCIDIQUES ET MINERAUX VARIE SELON LA NATURE DES MICRO-ORGANISMES. LE SPECTRE INFRAROUGE EST UNE IMAGE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE ET BIOCHIMIQUE TOTALE DE LA SOUCHE ETUDIEE. POURTANT, A PREMIERE VUE, LES SPECTRES DE DIFFERENTS MICRO-ORGANISMES SEMBLENT ETRE TRES SIMILAIRES. CES SIMILARITES SONT DUES AU FAIT QUE LES MICRO-ORGANISMES CONTIENNENT BEAUCOUP DE CONSTITUANTS FONCTIONNELS ET STRUCTURELS SEMBLABLES (NAUMANN *ET AL.*, 1991 ; MAQUELIN *ET AL.*, 2002). LE SPECTRE INFRAROUGE APPORTE DES RENSEIGNEMENTS SUR LES VIBRATIONS MOLECULAIRES DES DIFFERENTS COMPOSANTS DES MICRO-ORGANISMES ETUDIES TELLES QUE LES VIBRATIONS DES MOLECULES POLYMERIQUES, QUI DECRIVENT LES ACIDES NUCLEIQUES, DES PROTEINES, DES GLYCOPROTEINES ET DE LA PAROI CELLULAIRE. C'EST UNE VERITABLE EMPREINTE DU MICRO-ORGANISME.

TABLEAU V : FENETRES SPECTRALES : LES REGIONS ET LES INFORMATIONS RETROUVEES (NAUMANN *ET AL.*, 1991).

Fenêtre	Région spectrale	Information
F ₁	3000 à 2800 cm ⁻¹	Région des acides gras I, dominée par les vibrations de valence de -CH ₃ , >CH ₂ et ≡CH des groupes fonctionnels présents dans

F ₂	1800 à 1500 cm ⁻¹	Région des amides, dominée par les bandes Amide I et II des protéines et des peptides
F ₃	1500 à 1200 cm ⁻¹	Région mixte, contenant de l'information sur des protéines, des acides gras et des composés contenant des phosphates.
F ₃₁	1500 à 1400 cm ⁻¹	Région des acides gras II et sous gamme de W ₃ , dominée par les vibrations de balancement des même groupes fonctionnels
F ₄	1200 à 900 cm ⁻¹	Région dominée par les absorptions, dites «empreintes», des bandes des hydrates de carbone présents dans la paroi
F ₅	900 à 700 cm ⁻¹	L'empreinte infrarouge. Des formes spectrales remarquablement spécifiques s'expriment.

POUR L'IDENTIFICATION DE MICRO-ORGANISMES, LE SPECTRE EST GÉNÉRALEMENT DIVISÉ EN PLUSIEURS FENÊTRES SPECTRALES (LE GAL *ET AL.*, 1991 ; CURK *ET AL.*, 1994 ; ALLOUCH *ET AL.*, 1998). LES FENÊTRES (F) D'UN SPECTRE DE 3000 CM⁻¹ À 700 CM⁻¹ TROUVÉES PAR NAUMANN *ET AL.* (1991) SONT ATTRIBUÉES COMME PRÉSENTÉES DANS LE TABLEAU V.

HELM *ET AL.* (1991B) ONT MONTRÉ QUE LA ZONE SPECTRALE ENTRE 3000 ET 2800 CM⁻¹ EST LA RÉGION LA PLUS INTÉRESSANTE AU NIVEAU DE LA DISCRIMINATION DES BACTÉRIES GRAM + ET GRAM - (EN RAISON DE LA PLUS FORTE PRÉSENCE DE LIPIDES DANS LA PAROI CHEZ LES BACTÉRIES GRAM -). ENTRE 1800 ET 1500 CM⁻¹, LA RÉGION DES AMIDES I ET II, CORRESPOND ÉGALEMENT À LA ZONE D'ABSORPTIONS DES ACIDES CARBOXYLIQUES, ET DE L'ACIDE B-HYDROXYBUTYRIQUE PRODUIT PAR LA FERMENTATION D'UN HYDRATE DE CARBONE. BOREL ET LYNCH (1993) ONT, EUX, DISTINGUÉ LES BACTÉRIES GRAM + ET GRAM - EN EXPLOITANT LA RÉGION ENTRE 1500 ET 900 CM⁻¹. LA PLUPART DES PUBLICATIONS MENTIONNENT QUE LA RÉGION COMPRISE ENTRE 1800 ET 750 CM⁻¹ EST LA RÉGION SPECTRALE LA PLUS RICHE EN INFORMATION.

LES SPECTRES DES PEPTIDES ET DES PROTÉINES DANS LE MOYEN ET LE PROCHE INFRAROUGE PRÉSENTENT DES BANDES D'ABSORPTION DUES AUX LIAISONS PEPTIDIQUES, QUI ONT ÉTÉ NOMMÉES LES AMIDES A, B, I, II ET III. POUR LA DISCRIMINATION DES MICRO-ORGANISMES, LES BANDES DES AMIDES I, II ET III UNIQUEMENT SONT UTILISÉES. LE TABLEAU SUIVANT PRÉSENTE LES DIFFÉRENTES VIBRATIONS DANS LES RÉGIONS DE CHACUNE DE CES BANDES AMIDES.

TABLEAU VI : LES DIFFÉRENTES BANDES DANS LES RÉGIONS DES AMIDES I, II ET III, ET LES LIAISONS CONCERNÉES.

	Bande position	Liaison concernée	Type de vibration
Amide I	1655	C-O	Elongation
		C-N	Elongation
		C-N	Déformation
Amide II	1560	N-H	Balancement
		C-N	Elongation

		C-O	Balancement
		C-C	Elongation
		N-C α	Elongation
		N-H	Balancement
Amide III	1300	C-C	Elongation
		C-N	Elongation
		C-O	Balancement

D'après Dufour et Robert : Protéines dans La spectroscopie IR et ses applications analytiques. Editions Tec&Doc, 2000.

LES CHAINES LATÉRALES JOUENT ÉGALEMENT UN RÔLE DANS L'ABSORPTION DES PROTÉINES. DES BANDES LARGES ET SUPERPOSÉES SONT OBSERVÉES SUR TOUT LE SPECTRE.

LES RÉGIONS DANS LESQUELLES SE TROUVENT LES PICS DE CERTAINS COMPOSÉS DES ACIDES NUCLEIQUES SONT PRÉSENTÉES CI-DESSOUS.

TABLEAU VII : PICS D'ABSORPTION EN INFRAROUGE DUS À L'ADN, D'APRÈS LE GAL ET AL. (1991).

<i>Composé</i>	<i>Position des pics</i>
Cytosine	797 cm ⁻¹
Adénine	784 cm ⁻¹
Guanine	600 à 690 cm ⁻¹ (selon le type d'ADN)
Sucres	1185 à 962 cm ⁻¹
Carbonyle	1710 à 1690
phosphate	1220 à 1265 cm ⁻¹

TABLEAU VIII : SYNTHÈSE (NON EXHAUSTIVE) DES ÉTUDES PORTANT SUR LA CARACTÉRISATION DES MICROORGANISMES PAR LA SPECTROSCOPIE IRTF.

Auteurs	Objet	Micro-organismes
Horbach <i>et al.</i> , (1988)	Discrimination de bactéries (souches et sérogroupes)	<i>Legionella pneumophila</i> , <i>L. dumoffi</i> , <i>Escherichia coli</i> O13
Naumann <i>et al.</i> , (1988)	Discrimination de bactéries Gram + et Gram -	<i>Staphylococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Shigella</i> , <i>Citrobacter</i>
Helm <i>et al.</i> , (1991a)	Discrimination d'isolats cliniques	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Legionella</i>
Helm <i>et al.</i> , (1991b)	Caractérisation de certains produits de la cellule (poly- β - hydroxybutyrique)	<i>Legionella</i>
Borel et Lynch, (1993)	Discrimination de bactéries Gram + et Gram -	<i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Micrococcus</i> <i>luteus</i>
Helm et Naumann, (1995)	Caractérisation de composants cellulaires	<i>Bacillus</i>
Lefier <i>et al.</i> , (1997)	Discrimination de bactéries selon les conditions de croissance et au niveau espèce et sérotype	<i>Listeria</i>
Lin <i>et al.</i> , (1998)	Discrimination de bactéries	<i>Bacillus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>putida</i>
Kümmerle <i>et al.</i> , (1998)	Discrimination de levures d'origine alimentaire	<i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Hanseniaspora</i>
Lefier <i>et al.</i> , (2000)	Suivi du levain au cours de l'affinage d'un fromage	<i>Lactococcus</i>
Amiel <i>et al.</i> , (2001)	Classification de bactéries	<i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>

lactiques		
<i>Choo-Smith et al., (2001)</i>	Effet du temps d'incubation	<i>S. aureus, Escherichia coli, Candida albicans</i>
<i>Gué et al., (2001)</i>	Processus de différenciation - identification de composants cellulaires produits par les micro-organismes	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Kirschner et al., (2001)</i>	Classification et identification d'entérocoques	<i>Enterococcus spp.</i>

DIEM ET AL. (1999), ONT MIS AU POINT LA PRESENTATION DES DIFFERENTES MOLECULES DANS LE SPECTRE IR D'UNE BACTERIE. DES PHOSPHATES, ET DES GROUPES DE RIBOSE DE L'ADN, MANIFESTENT PLUSIEURS PICS A 1071, A 1084 ET A 1095 cm^{-1} . D'AUTRES PICS DE L'ADN SONT OBSERVES A 965 ET A 1245 cm^{-1} . UN PIC DE L'ARN SE TROUVE A 1085 cm^{-1} . SELON LE STADE DE VIE DE LA CELLULE (ACTIVE, INACTIVE, DIVISION), LES BANDES SPECTRALES DE L'ADN SONT PLUS OU MOINS PERCEPTIBLES. DE PLUS, CES PICS SONT DIFFICILES A OBSERVER EN RAISON DE LA FAIBLE PROPORTION DE CES COMPOSES A L'INTERIEUR DE LA CELLULE.

DISCRIMINATION DE MICRO-ORGANISMES PAR LA SPECTROSCOPIE IRTF

A CE JOUR, DE NOMBREUSES ETUDES ONT ETE MENEES SUR LA DISCRIMINATION ENTRE DES MICRO-ORGANISMES GRAM + ET GRAM -, SUR LA PRODUCTION DE COMPOSES ET SUR LES DIFFERENCES ENTRE LES ESPECES, EN UTILISANT DES REGIONS PARTICULIERES DU SPECTRE INFRAROUGE. QUELQUES EXEMPLES PLUS PRECIS SONT PRESENTES DANS LE TABLEAU VIII. LES ETUDES EFFECTUEES SUR LE GENRE *STAPHYLOCOCCUS* ET PLUS PARTICULIEREMENT SUR *S. AUREUS* SONT INDIQUEES EN GRAS DANS LE TABLEAU VIII. L'ÉTUDE DE HELM ET AL. (1991A) A DEMONTRE LA CAPACITE DE LA SPECTROSCOPIE IRTF A DISCRIMINER DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVES (*S. AUREUS* ET *S. HYICUS*) DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE (*S. EPIDERMIS*, *S. SAPROPHYTICUS* ET *S. XYLOSUS*).

A CE JOUR BEAUCOUP D'ETUDES ONT ETE REALISEES SUR PLUSIEURS GENRES ET ESPECES DIFFERENTES, PATHOGENES ET NON PATHOGENES. LE POTENTIEL DE LA SPECTROSCOPIE IRTF POUR L'IDENTIFICATION ET LA DISCRIMINATION DES MICRO-ORGANISMES AU NIVEAU ESPECE ET SOUS-ESPECE A ETE MONTRE DANS UN GRAND NOMBRE D'ETUDES.

FACTEURS INFLUENÇANT LA CROISSANCE DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES

CONDITIONS DE CROISSANCE

LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES PEUVENT ETRE AFFECTEES PAR PLUSIEURS FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX COMME LE PH, L'AW, LA CONCENTRATION DE NaCl ET DE NITRITE (MOSSSEL ET VAN NETTEN, 1990), LA COMPOSITION DE L'ATMOSPHERE OU DU MILIEU (ONOU ET MORI, 1997 ; SU ET WONG, 1998). UN RESUME DE CERTAINES DE CES FACTEURS EST PRESENTE DANS LE TABLEAU IX.

TABLEAU IX : FACTEURS LIMITANT DE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET DE LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES (MOSSSEL ET VAN NETTEN, 1990).

	AEROBIOSE			ANAEROBIOSE		
	T°C	AW MINI MUM	PH MINI MUM	T°C	AW MINI MUM	PH MINI MUM
CROISSA	7-46	0,83	4,0	7-46	0,90	4,6

NCE						
ENTERO TOXINES	10- 45	0,84	4,0	10- 45	0,90	5,3

Température

S. AUREUS PEUT SE DEVELOPPER ENTRE 7 ET 46°C, MAIS SA CROISSANCE OPTIMALE EST A 37°C (KOSIKOWSKI ET MISTRY, 1997A ; SESQUES ET BALLOT, 1998). LES ENTEROTOXINES PEUVENT ETRE PRODUITES ENTRE 10 ET 45°C (SESQUES, 1994 ; SESQUES ET BALLOT, 1998), L'OPTIMUM ETANT A 40°C. LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES SONT COMPLETEMENT INHIBEES A UNE TEMPERATURE INFERIEURE A 7°C (MOSSEL ET VAN NETTEN, 1990).

pH

POUR INHIBER LA CROISSANCE, IL FAUT UN PH MINIMAL DE 4,0 EN AEROBIOSE ET DE 4,6 EN ANAEROBIOSE (MOSSEL ET VAN NETTEN, 1990 ; HERMIER *ET AL.*, 1992). GENERALEMENT, LES SOUCHES PEUVENT CROITRE ENTRE PH 4,0 ET PH 9,3 (MOSSEL ET VAN NETTEN, 1990 ; FOX, 1993A ; FOX, 1993B), LEUR OPTIMUM ETANT A DES PH PROCHES DE LA NEUTRALITE (PH 7 A 7,5). LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES EST AUSSI FAVORISEE PAR UN PH PROCHE DE LA NEUTRALITE.

NaCl

LES SOUCHES DE *S. AUREUS* TOLERENT UNE CONCENTRATION DE NaCl COMPRISE ENTRE 2,5 ET 15% NaCl, MAIS LEUR CROISSANCE EST BEAUCOUP PLUS FAIBLE A 15% (GOMEZ-LUCIA *ET AL.*, 1992 ; FOX, 1993A ; FOX, 1993B ; SESQUES, 1994 ; KOSIKOWSKI ET MISTRY, 1997A). UNE FORTE AUGMENTATION DE LA CONCENTRATION EN NaCl DANS LE MILIEU ENTRAINE UNE DIMINUTION DE LA CROISSANCE BACTERIENNE, MEME SI CERTAINES SOUCHES DE *S. AUREUS* PEUVENT SURVIVRE DANS 20% DE NaCl (ECK ET GILLIS, 1997). HUANG *ET AL.* (2001) DANS UNE ETUDE SUR *S. AUREUS* ET *E. COLI*, ONT REMARQUE UNE PLUS GRANDE SENSIBILITE A UN MELANGE D'ETHANOL ET DE NaCl.

D'AUTRES FACTEURS TELS QUE LE pH, LA TEMPERATURE ET L'ACIDITE INTERFERENT AVEC L'ACTION DU NaCl (SESQUES, 1994). AVEC UN PH < 5,3, L'INHIBITION PAR DU NaCl DE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* AUGMENTE FORTEMENT (STEWART *ET AL.*, 2002).

Activité de l'eau (Aw)

EN DESSOUS D'UNE AW DE 0,90 IL Y A INHIBITION DE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* EN ANAEROBIOSE, MAIS EN AEROBIOSE, IL FAUT UNE AW PLUS FAIBLE (0,84) POUR INHIBER LA CROISSANCE (MOSSEL ET VAN NETTEN, 1990 ; SESQUES, 1994). UNE DIMINUTION DE L'AW (SESQUES, 1994) ENTRAINE UNE DIMINUTION DE LA QUANTITE D'ENTEROTOXINES PRODUITES. SELON L'HUMECTANT UTILISE, LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* EST PLUS OU MOINS AFFECTEE. DES ETUDES DE VILHELMSSON ET MILLER (2002) ET DE STEWART (2002), ONT MONTRE QUE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET SA REPONSE AU STRESS SONT PLUS OU MOINS AFFECTEES SELON LE TYPE D'HUMECTANT (PAR EXEMPLE SELS OU HYDRATES DE CARBONE).

Potentiel d'oxydoréduction

LES CHANGEMENTS DU POTENTIEL REDOX DE L'ENVIRONNEMENT ONT UN GRAND IMPACT SUR LA CELLULE VIVANTE. DES BACTERIES, TELLES QUE CERTAINES BACTERIES LACTIQUES, EN PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE CONSOMMENT DE L'OXYGENE ET REDUISENT LE MILIEU (BESPALOV *ET AL.*, 1996 ; AUBERT *ET AL.*, 2002). L'EFFET DU POTENTIEL REDOX SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES EN MILIEU SYNTHETIQUE OU SUR MILIEU LAIT, N'A PAS, A CE JOUR, ETE ETUDIE. NEANMOINS, PLUSIEURS ETUDES DEMONTRENT QUE LE REDOX INFLUENCE LA CROISSANCE CELLULAIRE ET LA PRODUCTION DE COMPOSES EXTRACELLULAIRES.

RIONDET *ET AL.* (2000) ONT DEMONTRE QUE SELON LES CONDITIONS REDOX REDUIT (-100 OU -320 mV), LES PROPORTIONS MOLAIRES DES PRODUITS ISSUS DE LA FERMENTATION DU GLUCOSE PAR *E. COLI* VARIENT. DANS UNE AUTRE ETUDE, LES MEMES AUTEURS (RIONDET *ET AL.*, 1999) ONT PU MONTRER UN CHANGEMENT DANS LA PERMEABILITE MEMBRANAIRE AUX PROTONS DE *E. COLI*, EN FONCTION DU POTENTIEL REDOX (CONDITIONS REDUITES ET OXYDEES). OUVRY *ET AL.* (2002) ONT EGALEMENT PU MONTRER L'EFFET DU POTENTIEL REDOX (CONDITIONS REDUITES ET OXYDEES) SUR LA FLUIDITE DE LA MEMBRANE CELLULAIRE. LA FORCE PROTOMOTRICE A TRAVERS LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE BACTERIENNE EST UNE SOURCE PRIMAIRE D'ENERGIE DANS LA CELLULE. LES BACTERIES SONT CAPABLES DE TROUVER LES CONDITIONS OPTIMALES POUR LA GENERATION D'ENERGIE SELON LES CHANGEMENTS DE LA FORCE PROTOMOTRICE. DANS UNE ETUDE PAR BESPALOV *ET AL.* (1996), LES AUTEURS ONT REMARQUE QUE DES CELLULES DE *E. COLI* SONT ATTIREES PAR UNE CONCENTRATION SPECIFIQUE D'OXYGENE. CEPENDANT, TOUTES LES MOLECULES REDOX N'ONT PAS EU CET EFFET SUR LES CELLULES (EFFET DE MIGRATION). QUAND CERTAINS TYPES DE MOLECULES SONT AJOUTES AU MILIEU, UNE INHIBITION DE LA RESPIRATION ET DE LA FORCE PROTOMOTRICE SE PRODUIT, PROVOQUANT UNE REPOSE REPULSIVE CONSTANTE. D'AUTRES TYPES DE MOLECULES CREENT L'EFFET INVERSE.

LE POTENTIEL REDOX NE JOUE PAS SEULEMENT SUR LA CROISSANCE DE LA BACTERIE ET SUR L'EXCRETION DE PRODUITS EXTRACELLULAIRES VARIES, MAIS EGALEMENT SUR L'EXPRESSION DES GENES. LES PROTEINES A DOIGTS DE ZINC SONT DIRECTEMENT INFLUENCEES PAR LES VARIATIONS DE POTENTIEL A CAUSE DE LEUR COMPOSITION EN RESIDUS DE CYSTEINE. ELLES SONT AUSSI UNE DES PLUS GRANDES FAMILLES DE PROTEINES QUI RECONNAISSENT ET SE LIENT A L'ADN. CHAQUE DOIGT SE LIE A UNE SEQUENCE SPECIFIQUE DE CINQ NUCLEOTIDES. LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES PEUT DONC ETRE MODIFIEE SELON LE POTENTIEL REDOX DE LA CELLULE ET CELUI DU MILIEU (WU *ET AL.*, 1996).

DIFFERENTES ETUDES SUR *S. AUREUS* ONT DEMONTRE L'IMPORTANCE DE LA STRUCTURE DE LA PAROI CELLULAIRE DANS L'EXCRETION DE MOLECULES OU DE PROTEINES, OR LE POTENTIEL REDOX JOUE LUI-MEME UN ROLE DANS LA PERMEABILITE DE LA MEMBRANE (DE *E. COLI* ET *LACTOBACILLUS PLANTARUM*). LA PAROI CELLULAIRE DE *S. AUREUS* EST EPAISSE ET SA STRUCTURE EST FORTEMENT RETICULEE. IL EST POSSIBLE QUE LES PROTEINES EXTRACELLULAIRES DE *S. AUREUS* SOIENT TRANSPORTEES ET RELACHEES DANS DES COMPARTIMENTS SPECIALISES LOCALISES DANS DES REGIONS DE LA PAROI QUI FACILITENT LE PASSAGE DES MACRO MOLECULES. LA MAINTENANCE DE CETTE STRUCTURE EST PEUT ETRE REQUISE POUR QUE LE PROCESSUS COMPLET DE TRANSPORT FONCTIONNE CORRECTEMENT, INDIQUANT LA NECESSITE D'UNE MEMBRANE ENERGIQUE POUR LA FABRICATION DU PRECURSEUR DE SEB (TWETEN ET IANDOLO, 1983). MARTIN *ET AL.*, (1999), ONT REMARQUE DES CHANGEMENTS DANS LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS DE LA

MEMBRANE DE *S. AUREUS* PENDANT LA TRANSITION ENTRE LA CROISSANCE EN AEROBIOSE ET EN ANAEROBIOSE. DES CONCENTRATIONS FORTES EN SEL SONT CONNUES POUR LEUR INFLUENCE SUR LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS DE LA MEMBRANE DE *S. AUREUS*. CES DEUX PARAMETRES PRODUISENT DONC UN CHANGEMENT DANS LA PERMEABILITE DE LA MEMBRANE.

La compétition

LES SOUCHES DE *S. AUREUS* NE SONT PAS DE BONS "COMPETITEURS" ET SONT DONC SENSIBLES A LA COMPETITION AVEC D'AUTRES MICRO-ORGANISMES (MOSSEL ET VAN NETTEN, 1990). LA PRESENCE D'AUTRES BACTERIES JOUE UN ROLE D'ANTAGONISTE SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS*, DU, PAR EXEMPLE, A DES BACTERIOCINES QUI PEUVENT ETRE PRODUITES PAR CES AUTRES BACTERIES. L'INOCULUM DE DEPART (BACTERIE LACTIQUE ET/OU *S. AUREUS*) JOUE AUSSI UN ROLE IMPORTANT (SESQUES, 1994). L'EFFET DE TROIS LEVAINS (MELANGES VARIES DE *STAPHYLOCOCCUS CARNOSUS*, DE *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS*, DE *LACTOBACILLUS SAKE*, ET DES ESPECES DE *PEDIOCOCCUS*), UTILISES DANS LA PRODUCTION DE SAUCISSES, A ETE ETUDIE PAR GONZALEZ-FANDOS *ET AL.* (1994). *S. AUREUS* EST PLUS OU MOINS INHIBE SELON LE LEVAIN UTILISE. LE LEVAIN AVEC UNE ACIDIFICATION FORTE INHIBE LE PLUS *S. AUREUS*. BOLIN *ET AL.* (1998) ONT MONTRE L'EFFET INHIBITEUR DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*, ET QU'UN MELANGE DE SOUCHES EST PLUS INHIBITEUR QU'UNE SEULE SOUCHE. LA NATURE DU LEVAIN EST UN CRITERE IMPORTANT POUR L'INHIBITION DE LA CROISSANCE DE BACTERIES PATHOGENES, TELS QUE *S. AUREUS*. LA PRODUCTION DE CERTAINES BACTERIOCINES PAR DES BACTERIES LACTIQUES ONT UN EFFET INHIBITEUR SUR LA CROISSANCE ET DONC LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DE *S. AUREUS* (OTERO *ET AL.*, 1993 ; FARIAS *ET AL.*, 1994 ; BENKERROUM *ET AL.*, 2002).

Le milieu

PLUSIEURS ETUDES ONT DEMONTRE L'EFFET INHIBITEUR DE CERTAINES CONDITIONS DE MILIEU, TELLES QUE LA FERMENTATION LACTIQUE (OTERO *ET AL.*, 1993). SU ET WONG (1998), ONT ETUDIE L'EFFET DU PH ET DE LA VITESSE D'AERATION SUR LA PRODUCTION DE SEH. ILS ONT REMARQUE QUE LA PRODUCTION MAXIMUM ETAIT A PH 7,0 AVEC UNE VITESSE D'AERATION DE 300 CC / MIN. CONCERNANT LE TRANSFERT DE LA CROISSANCE D'AEROBIOSE EN ANAEROBIOSE, ET *VICE VERSA*, BELAY ET RASOOLY (2002) ONT MONTRE UNE ADAPTATION RAPIDE AUX CONDITIONS DE CULTURE ET UNE AUGMENTATION DE LA CROISSANCE ET LA PRODUCTION DE SEA EN PASSANT DE CONDITIONS ANAEROBIES A DES CONDITIONS AEROBIES. EN PASSANT DE CONDITIONS AEROBIES A DES CONDITIONS ANAEROBIES, UNE BAISSSE MARQUEE DE LA PRODUCTION D'EXOPROTEINES EST OBSERVEE, SUPERIEURE A CELLE OBSERVEE POUR SEA. LA PRODUCTION DE SEA EST FORTEMENT LIEE A LA CROISSANCE ET N'EST PAS DIRECTEMENT AFFECTEE PAR LES CONDITIONS DE CULTURE. SEA PEUT ETRE PRODUITE TRES TOT DANS DES CONDITIONS D'AEROBIOSE OU D'ANAEROBIOSE. DANS DES ALIMENTS FORTEMENT CONTAMINES, L'ENTEROTOXINE PEUT ETRE PRODUITE EN 2 H, QUE L'OXYGENE SOIT PRESENT OU NON.

DANS UNE AUTRE ETUDE, ONOUE ET MORI (1997) ONT ETUDIE LES BESOINS EN ACIDES AMINES POUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES. L'EFFET DE LA PROLINE VARIE SELON LA SOUCHE. LES SOUCHES ETUDIEES N'ONT BESOIN NI DE LYSINE NI DES ACIDES ASPARTIQUE ET GLUTAMIQUE, NI DE LEUCINE ET DE TYROSINE POUR CROITRE. CEPENDANT, SANS CES ACIDES AMINES, LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES

EST REDUITE. POUR LA SOUCHE K858, LA PRODUCTION DE SEA EST REDUITE A 50% ET CELLE DE SEB A SEULEMENT 0,08% PAR L'ABSENCE DE THREONINE. GLOBALEMENT, LA PRODUCTION DE SEA EST BEAUCOUP MOINS AFFECTEE QUE LA PRODUCTION DE SEB OU SEC PAR LA SUPPRESSION DE N'IMPORTE QUEL ACIDE AMINE.

QUAND DES CELLULES DE *S. AUREUS* SONT ENDOMMAGEES DANS UN ENVIRONNEMENT STRESSANT, LES ENTEROTOXINES NE SONT PAS SYNTHETISEES (SMITH *ET AL.*, 1983). NEANMOINS, LES SOUCHES GARDENT LEUR CAPACITE A PRODUIRE DES ENTEROTOXINES.

TABLEAU X : SYNTHÈSE (NON-EXHAUSTIVE) DE QUELQUES ÉTUDES PORTANT SUR *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS DIFFÉRENTS FROMAGES.

Fromage	Lait	Levain	Croissance de <i>S. aureus</i> et production d'entérotoxines
Type Manchego	Brebis (cru ou pasteurisé)	Lactocoques	fromages expérimentaux : bonne croissance de <i>S. aureus</i> , meilleure avec moins de levain ; SEA et SED retrouvées, jamais SEB ou SEC (Nunez <i>et al.</i> , 1988 ; Gomez-Lucia <i>et al.</i> , 1992 ; Fox, 1993a ; Fox, 1993b).
Type Suisse	Vache (cru ou traité et filtré)	Lactocoques, Lactobacilles, Streptocoques thermophiles	fromages expérimentaux : pas de <i>S. aureus</i> , ni de SEA et de SED à la fin d'affinage. Fromages retirés du marché : <i>S. aureus</i> et SEB présents. rare pour SEB et très rare dans fromages à pâte pressée cuite. (Todd <i>et al.</i> , 1981 ; Fox, 1993a ; Fox, 1993b ; Bachmann et Spahr, 1995 ; Kosikowski et Mistry, 1997a ; Kosikowski et Mistry, 1997b)
Domiaty	Vache, brebis ou buffle (pasteurisé)	Levain lactique	<i>S. aureus</i> détecté dans fromages au lait pasteurisé, pas d'entérotoxine (Fox, 1993a ; Fox, 1993b).
Feta	Chèvre, brebis (cru ou pasteurisé)	Lactocoques, Lactobacilles thermohiles	Après salage et pendant affinage, <i>S. aureus</i> a diminué (Fox, 1993a ; Fox, 1993b ; Erkmén, 1995 ; Kosikowski et Mistry, 1997a ; Kosikowski et Mistry, 1997b).
Mozzarella	chèvre ou vache (pasteurisé)	Lactocoques Lactobacilles	Augmentation de <i>S. aureus</i> jusqu'à l'égouttage, suivie d'une diminution due au chauffage du caillé (Fox, 1993a ; Fox, 1993b ; Kosikowski et Mistry, 1997a ; Kosikowski et Mistry, 1997b ; Meyrand et Vernozy-Rozand, 1999)
Queso blanco (fromage blanc frais)	(pasteurisé)	sans bactéries lactiques ou avec lactiques mésophiles.	Avec peu de bactéries lactiques, les pathogènes résistent longtemps dans le milieu. Avec plus de bactéries lactiques, <i>S. aureus</i> diminue rapidement. (Fox, 1993a ; Fox, 1993b ; Lodi <i>et al.</i> , 1994 ; Kosikowski et Mistry, 1997a ; Kosikowski et Mistry, 1997b)
Camembert	Vache, chèvre (cru)	Lactocoques	Température basse et acidification poussée inhibent <i>S. aureus</i> . Si la population initiale de <i>S. aureus</i> dans le lait utilisé pour la des ferments lactiques est assez élevée et la durée d'incubation de 24h, il y a assez de <i>S. aureus</i> (10^6 ufc/g) pour produire des entérotoxines. Entérotoxines plutôt observées dans fromages affinés (Jean, 1989 ; Fox, 1993a ; Fox, 1993b ; Kosikowski et Mistry, 1997b ; Meyrand <i>et al.</i> , 1998 ; Vernozy-Rozand <i>et al.</i> , 1998 ; Meyrand et Vernozy-Rozand, 1999 ; Meyrand <i>et al.</i> , 1999b).
Majorero	Chèvre (pasteurisé ou cru)	Lactocoques	<i>S. aureus</i> maximum dans les premiers jours de fabrication et diminue jusqu'au 90 ^{ème} jour pour disparaître complètement. L'augmentation du taux de NaCl et celle d'acides gras et la diminution d'Aw sont certainement la cause de la disparition de <i>S. aureus</i> . (Fontecha <i>et al.</i> , 1990 ; Meyrand et Vernozy-Rozand, 1999).
Cheddar	(pasteurisé)	Lactocoques	Fromages expérimentaux : plus de sel nombre <i>S. aureus</i> plus élevé, pas d'entérotoxines avec « cheddaring ». Plus d'entérotoxines dans fromages salés, après pressage (Ibrahim <i>et al.</i> , 1981 ; Koenig et Marth, 1982 ; Kosikowski et Mistry, 1997b).

STAPHYLOCOCCUS AUREUS ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS LES PRODUITS LAITIERS

LE FROMAGE

LE FROMAGE EST UN MILIEU TRÈS COMPLEXE DONT PLUSIEURS FACTEURS, TELS QUE LES FERMENTS LACTIQUES, LA PRESURE, LES ACTIONS MÉCANIQUES ET PHYSIQUES, LA PRÉCOCITÉ ET L'INTENSITÉ DE L'ACIDIFICATION, SÉLECTIONNENT LA MICROFLORE ; LES

TEMPERATURES DE FABRICATION ET D’AFFINAGE (MEYRAND ET VERNOZY-ROZAND, 1999), PEUVENT INFLUENCER LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D’ENTEROTOXINES. A CE JOUR, DE NOMBREUSES ETUDES ONT ETE REALISEES SUR *S. AUREUS* DANS LE FROMAGE, POUR COMPRENDRE LA CROISSANCE ET LA PRODUCTION D’ENTEROTOXINES DANS LE MILIEU FROMAGER. DANS CE CHAPITRE, QUELQUES-UNES UNES DE CES ETUDES SONT PRESENTEES.

GILMOUR ET HARVEY (1990), ONT NOTE QUE L’AUGMENTATION DE LA MATIERE GRASSE REDUISAIT LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET DONC LA PRODUCTION D’ENTEROTOXINES. LE SEL A UN EFFET INHIBITEUR SUR *S. AUREUS*, NEANMOINS, LA CONCENTRATION DE NaCl EST INSUFFISANTE POUR INHIBER SA CROISSANCE. IBRAHIM *ET AL.* (1981) ONT MONTRE QUE LE NOMBRE DE *S. AUREUS* ETAIT PLUS ELEVE DANS LE FROMAGE SALE (4,95% SEL/EAU) QUE DANS LE FROMAGE NON SALE.

O’REILLY *ET AL.* (2000) ONT ETUDIE L’INACTIVATION DE MICRO-ORGANISMES PATHOGENES, DANS DU CHEDDAR, PAR TRAITEMENT A HAUTE PRESSION HYDROSTATIQUE. AVEC UN TRAITEMENT A 400 MPa PENDANT 20 MIN A 20°C, LE NIVEAU DE *S. AUREUS* EST REDUIT DE 3 LOG.

MORGAN *ET AL.* (2000) ONT EGALEMENT ETUDIE L’EFFET D’UN TRAITEMENT A HAUTE PRESSION HYDROSTATIQUE SUR LA POPULATION DE *S. AUREUS* DANS LE LAIT ET LE LACTOSERUM, MAIS EN COMBINAISON AVEC UNE BACTERIOCINE : LA LACTICINE 3147. LES AUTEURS ONT CONSTATE UNE DIMINUTION RAPIDE DE LA POPULATION SOUS LE SEUL EFFET D’UNE PRESSION SUPERIEURE A 200 MPa ; EN REVANCHE AVEC LA LACTICINE SEULE, LA REDUCTION DE LA VIABILITE DES SOUCHES DE *S. AUREUS* ETAIT FAIBLE. DANS LE CAS DE L’ACTION COMBINEE DE LA LACTICINE ET D’UNE PRESSION SUPERIEURE A 250 MPa, IL A ETE CONSTATE L’ABSENCE DE CELLULES VIVANTES.

TABLEAU XI : SYNTHÈSE (NON EXHAUSTIVE) DE QUELQUES ÉTUDES PORTANT SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS TROIS TECHNOLOGIES TRADITIONNELLES (À PÂTE PRESSEÉ NON CUITE).

FROMAGE	LAIT	LEVAIN	CROISSANCE DE <i>S. AUREUS</i> ET PRODUCTION D'ENTEROTOXINES
TOMME DE SAVOIE	VACHE (CRU OU THERMISÉ)	STREPTOCOQUES THERMOPHILES, LACTOBACILLES THERMOPHILES, LACTOCOQUES, LEUCONOSTOQUES	DANS CES TYPES DE FROMAGES À PÂTE PRESSEÉ NON CUITE, <i>S. AUREUS</i> SE DÉVELOPPE BIEN AU DÉBUT DE LA FABRICATION ET LA POPULATION DIMINUE PENDANT L'AFFINAGE (RAPPORT INTERNE ITFF)(LUQUET, 1990 ; ANONYME, 1995 ; ECK ET GILLIS, 1997).
REBLOCHON	VACHE (CRU)	FERMENTS LACTIQUES OU SANS POUR LA FABRICATION FERMIERE	UNE AUGMENTATION RAPIDE (2 LOG ₁₀) DE LA POPULATION DE <i>S. AUREUS</i> SE PRODUIT PENDANT LES PREMIERS STADES DE FABRICATION. À PARTIR DU SAUMURAGE JUSQU'À J10, LA POPULATION DE <i>S. AUREUS</i> RESTAIT RELATIVEMENT STABLE. PUIS AU COURS DE L'AFFINAGE, <i>S. AUREUS</i> AVAIT PRESQUE COMPLÈTEMENT DISPARU (LUQUET, 1990 ; BÄRTSCHI ET AL., 1994 ; MEYRAND ET VERNOZY-ROZAND, 1999).
ST. NECTAIRE	VACHE (CRU OU PASTEURISÉ)	FERMENT LACTIQUE MÉSOPHILE.	LA POPULATION MAXIMALE DE <i>S. AUREUS</i> DANS LE ST. NECTAIRE A ÉTÉ OBSERVÉE APRÈS 1 À 3 JOURS. UNE DIMINUTION DE <i>S. AUREUS</i> S'EST EFFECTUÉE AU COURS DE L'AFFINAGE. LES BACTÉRIES LACTIQUES UTILISÉES DANS LA FABRICATION ONT POUR ACTION PRINCIPALE L'ABAISSEMENT DU PH DU CAILLE. CECI EST IMPORTANT POUR L'INHIBITION DE <i>S. AUREUS</i> . PAR CONSÉQUENT, POUR CE FROMAGE, PLUS L'ACIDIFICATION EST RAPIDE MOINS LES SOUCHES DE <i>S. AUREUS</i> PEUVENT SE DÉVELOPPER. LE MAINTIEN DU LAIT À TEMPÉRATURE AMBIANTE PENDANT 24H, OU L'ACIDIFICATION FAIBLE ET LENTE SONT DES POINTS FAVORABLES POUR LA CROISSANCE BACTÉRIENNE, PARTICULIÈREMENT <i>S. AUREUS</i> . (LUQUET, 1990 ; SESQUES, 1994)

LAPORTE *ET AL.* (1992) ONT MIS EN EVIDENCE UNE INHIBITION DE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS*, PAR *PENICILLIUM ROQUEFORTI* DANS LES FROMAGES TELS QUE LE ROQUEFORT. QUELQUES ETUDES PORTANT SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS DIFFERENTS FROMAGES SONT PRESENTEES DANS LE TABLEAU X.

UNE RESISTANCE A L'OSMOLARITE, PERMET AUX SOUCHES DE *S. AUREUS* DE SURVIVRE DANS DES PRODUITS GARDES A UNE OSMOLARITE PLUS FORTE QUE D'AUTRES BACTERIES PATHOGENES. NEANMOINS, *S. AUREUS* N'EST PAS UN BON "COMPETITEUR" (MOSSSEL ET VAN NETTEN, 1990).

DOS SANTOS ET GENIGEORGIS (1981) ONT ETUDIE LA PRESENCE *S. AUREUS* DANS LE LAIT UTILISE POUR LA FABRICATION DE FROMAGE MINAS (TECNOLOGIE QUESO BLANCO). ENTRE LA COLLECTE DU LAIT ET LE LIEU DE FABRICATION, LE LAIT EST RAREMENT REFRIGERE, CE QUI PEUT EXPLIQUER LA PRESENCE DE *S. AUREUS* EN FORTES POPULATIONS. LES AUTEURS ONT MONTRE QU'A 37°C (LA TEMPERATURE DE FABRICATION), LA POPULATION DE *S. AUREUS* AVAIT AUGMENTE ET CELLE DU LEVAIN AVAIT DIMINUE, CECI APRES 2 H D'INCUBATION. LES BACTERIES PRESENTEES DANS LE LAIT PASTEURISE SURVIVAIENT AUX PREMIERES ETAPES DE LA FABRICATION DU MINAS.

SELON LE TRAITEMENT (PASTEURISE OU CRU), ET L'AJOUT OU NON DE LACTOCOQUES, OLARTE *ET AL.*, (1999) ONT ETUDIE LA QUALITE ORGANOLEPTIQUE AINSI QUE LES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET MICROBIOLOGIQUES DU FROMAGE AFFINE DE TYPE CAMEROS. *S. AUREUS* A ETE DETECTE UNIQUEMENT DANS LES FROMAGES AU LAIT CRU, ET LA POPULATION ETAIT PLUS IMPORTANTE DANS CELUI QUI N'A PAS ETE ENSEMENCE EN LACTOCOQUES. AUCUNE ENTEROTOXINE N'A ETE RETROUVEE DANS LE FROMAGE AFFINE. CES ELEMENTS INDIQUENT L'EFFET INHIBITEUR DE LA FLORE LACTOCOQUE DANS LES FROMAGES AU LAIT CRU.

EN CONCLUSION, *S. AUREUS* EST CAPABLE DE SE DEVELOPPER ET DE PRODUIRE DES ENTEROTOXINES DANS CHACUNE DES GRANDES FAMILLES DE FROMAGES Y COMPRIS DANS LES FROMAGES A PATE PRESSEE CUITE, MEME SI CECI EST TRES RARE ET ETONNANT DU FAIT DU CHAUFFAGE DU CAILLE. EN GENERAL, LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* SE PRODUIT PENDANT LES PREMIERES 48 H DE FABRICATION. NEANMOINS, S'IL Y A PRODUCTION D'ENTEROTOXINES, CELLES-CI PEUVENT SE MAINTENIR DANS LE FROMAGE JUSQU'AU PRODUIT FINAL.

CERTAINS TYPES DE FROMAGES SONT CEPENDANT PLUS SENSIBLES QUE D'AUTRES AU PROBLEME DE *S. AUREUS*, EN PARTICULIER LES FROMAGES A PATE MOLLE ET A PATE PRESSEE NON CUITE. TROIS TECNOLOGIES TRADITIONNELLES DE TYPE PATE PRESSEE NON CUITE, ETUDIEES LORS DE CE TRAVAIL DE THESE, SONT PRESENTEES DANS LE TABLEAU XI.

DANS LA TOMME DE SAVOIE, LE REBLOCHON ET LE ST. NECTAIRE, LES PREMIERES HEURES DE FABRICATION SONT, EN GENERAL, IMPORTANTES POUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS*, CAR LES CONDITIONS DU MILIEU SONT OPTIMALES (MEYRAND ET VERNOZY-ROZAND, 1999). AU COURS DE L'AFFINAGE, LA POPULATION DIMINUE, A CAUSE DE CERTAINS FACTEURS D'INHIBITION TELS QUE LE DEVELOPPEMENT DES FERMENTS LACTIQUES, DE LA TEMPERATURE D'AFFINAGE ET DU PH.

LES ENTEROTOXINES TROUVEES DANS DES FROMAGES IMPLIQUES DANS DES TIAC SONT LES PLUS SOUVENT SEA OU SED OU LES DEUX, MAIS RAREMENT SEB OU SEC. LA PLUPART DES ETUDES PORTANT SUR DES FROMAGES EXPERIMENTAUX MONTRENT CES MEMES

TENDANCES. *SEA* A MEME ETE DETECTEE DANS LE FROMAGE A PARTIR D'UN INOCULUM INITIAL DE 10^3 UFC/ML (MEYRAND *ET AL.*, 1998). NEANMOINS, IL EST IMPORTANT DE NOTER QUE LA SOUCHE ETUDIEE ETAIT TRES FORTEMENT PRODUCTRICE DE L'ENTEROTOXINE A *IN VITRO*. DES ETUDES ONT MONTRE QU'AVEC DES POPULATIONS DE *S. AUREUS* ATTEIGNANT JUSQU'A 10^7 UFC/G DANS LE FROMAGE, SOIT AUCUNE ENTEROTOXINE N'A ETE DETECTEE, SOIT SEULEMENT *SEA* OU *SED* MAIS JAMAIS *SEC* (GOMEZ-LUCIA *ET AL.*, 1992 ; OTERO *ET AL.*, 1993 ; MEYRAND *ET AL.*, 1998). CEPENDANT, QUELQUES ETUDES MONTRENT DES DIVERGENCES SUR CE POINT. HAMAMA *ET AL.* (2002), ONT TROUVE DE L'ENTEROTOXINE C DANS DES FROMAGES FRAIS JBEN (FROMAGE FRAIS MAROCAIN). LES SOUCHES DE *S. AUREUS* ONT ETE ENSEMENCEES DANS LE LAIT, AVEC DES LACTOCOQUES, ET LAISSEES 20 H A TEMPERATURE AMBIANTE (18 A 22°C). CECI PEUT EXPLIQUER LA PRESENCE DE L'ENTEROTOXINE DANS LE PRODUIT FINAL. PAR LA SUITE, LA POPULATION DE *S. AUREUS* A ATTEINT 10^7 UFC/G PENDANT LA FABRICATION.

EN RESUME, CERTAINS FROMAGES SONT PLUS FAVORABLES A LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* QUE D'AUTRES, IL EN EST DE MEME POUR LA PRODUCTION DE CERTAINES ENTEROTOXINES.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS ET LES AUTRES PRODUITS LAITIERS

Le lait

S. AUREUS SE DEVELOPPE BIEN DANS LE LAIT MAINTENU PLUSIEURS HEURES A 15°C. SUITE A L'ANALYSE DU GENOME ENTIER DE DEUX SOUCHES DE *S. AUREUS* (KURODA *ET AL.*, 2001), LES AUTEURS ONT REMARQUE LA PRESENCE DE SYSTEMES PHOSPHOTRANSFERASIQUES DE LACTOSE, QUI PERMETTENT A *S. AUREUS* DE CROITRE DANS LE LAIT.

DOS SANTOS *ET AL.* (1981) ONT ETUDIE DU LAIT PASTEURISE ET DU LAIT CRU DESTINE A LA FABRICATION DU FROMAGE MINAS. LE LAIT N'ETAIT PAS REFRIGERE PENDANT LE TRANSPORT A LA FROMAGERIE. DANS LES 78 ECHANTILLONS, LE LAIT CRU AVAIT UNE FLORE TOTALE, EN MOYENNE, DE 5×10^4 UFC/ML. SUR LA POPULATION TOTALE DE MICRO-ORGANISMES MESOPHILES AEROBIES, 45,2% ETAIENT DES *S. AUREUS*. POUR LE LAIT PASTEURISE, SEULEMENT TROIS ECHANTILLONS CONTENAIENT *S. AUREUS*, ET VENAIENT TOUS DE LA MEME COLLECTE. DANS LE LAIT FERMIER, TAKEUCHI *ET AL.* (1998), ONT TROUVE DES SOUCHES DE *S. AUREUS* PRODUCTRICES D'ENTEROTOXINES ET DE TSST-1. *S. AUREUS* PEUT ETRE PRESENT DANS DES FROMAGES FABRIQUES A PARTIR DU LAIT CRU. CEPENDANT, EN CAS DE CONTAMINATION, LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES SERONT FAVORISEES DANS LE LAIT PASTEURISE CONTRAIREMENT AU LAIT CRU (TODD *ET AL.*, 1981 ; GOMEZ-LUCIA *ET AL.*, 1992).

Le yaourt

PAZAKOVA *ET AL.* (1997) ONT ETUDIE L'EFFET DE LA CULTURE DU YAOURT SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* AJOUTE EN CONCENTRATIONS VARIEES. LE NOMBRE DE *S. AUREUS* A DIMINUE PENDANT LA FERMENTATION DU YAOURT ET EGALEMENT PENDANT LE STOCKAGE A FROID, A CAUSE DE LA PRESENCE DE CERTAINES SUBSTANCES INHIBITRICES, PAR EXEMPLE DES COMPOSES ANTI-BACTERIENS PRODUITS PAR *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*, OU DES COMPOSES TELS QUE LE BULGARICAN (UN ANTI-BACTERIEN) ET L'EAU OXYGENEE PRODUITS PAR *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* SSP. *BULGARICUS*.

CEPENDANT, SI LA CONCENTRATION DE *S. AUREUS* EST TROP ELEVEE, L'EFFET ANTI-BACTERIEN DE CES SUBSTANCES EST ALORS INSUFFISANT. BADAWI ET EL-SONBATY (1997) ONT TROUVE DES *S. AUREUS* DANS LE YAOURT « ZABADY ». LE YAOURT EST TRES SENSIBLE AUX CHANGEMENTS DE TEMPERATURE ET PEUT ETRE FACILEMENT CONTAMINE PENDANT LA FABRICATION.

Les poudres

IL EST POSSIBLE QUE LES CONDITIONS DE SECHAGE (WALSTRA ET AL., 1999) INTERVIENNENT CONSIDERABLEMENT SUR LA VITALITE DE *S. AUREUS*. LES ENTEROTOXINES PEUVENT ETRE PRODUITES A DES CONCENTRATIONS DE *S. AUREUS* DE 10^7 A 10^8 UFC/ML EN QUANTITES POUVANT POSER PROBLEME POUR LA SANTE. MEME SI *S. AUREUS* N'EST PAS RESISTANT AU CHAUFFAGE, LES CONDITIONS DE SECHAGE SONT TELLES QUE LES SOUCHES NE SONT PAS COMPLETEMENT DETRUITES. PLUS LA POPULATION EST IMPORTANTE AVANT SECHAGE ET PLUS IL EXISTE DE RISQUE D'EN TROUVER APRES. AU JAPON EN 2000, SEA A ETE TROUVEE DANS DE LA POUDRE DE LAIT ECREME (ANONYME, 2000). EN OUTRE, CETTE MEME ENTEROTOXINE A ETE SUSPECTEE DANS UNE TIAC CONCERNANT DEUX TYPES DE YAOURT ET DU LAIT FABRIQUES A PARTIR DE CES POUDRES CONTAMINEES.

Les tartes à la crème

LES TARTES A LA CREME SONT DES PRODUITS FRAGILES ET PARFAITS POUR LA PROLIFERATION RAPIDE DE MICRO-ORGANISMES, A CAUSE DE LEUR FORTE VALEUR NUTRITIONNELLE. AU BRESIL, CES PRODUITS SONT SOUVENT CONSERVES A TEMPERATURE AMBIANTE, DONC MEME UNE CONTAMINATION TRES FAIBLE PEUT PROVOQUER DES PROBLEMES LIES AUX ENTEROTOXINES. HIROOKA ET AL. (1987) ONT ETUDIE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINE A DANS LES TARTES A LA CREME. ILS ONT NOTE UNE AUGMENTATION DE LA POPULATION DE *S. AUREUS* DE 10 A 10^4 UFC/G APRES 18 H A 30°C ET DE 10 A 10^5 UFC/G APRES 18 H A 37°C . DES ENTEROTOXINES ETAIENT DETECTABLES DANS CES ECHANTILLONS. POUR LES ECHANTILLONS A 20°C ET A 25°C , UNE AUGMENTATION DE LA POPULATION A ETE CONSTATEE DE 10 A 10^3 UFC/G ET DE 10 A 10^4 UFC/G RESPECTIVEMENT, APRES 18 H. MAIS, DES ENTEROTOXINES ONT ETE DETECTEES SEULEMENT APRES 35 H DANS L'ECHANTILLON A 25°C . LA FORTE QUANTITE DE SACCHAROSE DANS LES TARTES A LA CREME FAVORISE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET PAR CONSEQUENT LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES.

CONCLUSION

CERTAINS FROMAGES TRADITIONNELS AU LAIT CRU SONT TRES SENSIBLES AU RISQUE DE *S. AUREUS*. LES ANALYSES DE ROUTINE POUR LA RECHERCHE DE *S. AUREUS* DANS LE LAIT ET LE FROMAGE SONT BASEES SUR UNE METHODE DE COMPTAGE DE COLONIES DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE, DONT IL EXISTE PLUSIEURS ESPECES AUJOURD'HUI. LES SOUCHES DE *S. AUREUS* PEUVENT ETRE DISTINGUEES EN FONCTION DE LEUR BIOTYPE, SOUVENT ASSOCIE A UN HOTE SPECIFIQUE. AU NIVEAU DE L'ENTEROTOXINOGENESE, LES SOUCHES DE BIOTYPE HUMAIN SONT LE PLUS SOUVENT PRODUCTRICES ALORS QUE CELLES DE BIOTYPE BOVIN LE SONT RAREMENT, LE BIOTYPE BOVIN ETANT SOUVENT RENCONTRE DANS LE LAIT DE VACHE CRU. QUAND UN FROMAGE CONTAMINE PAR DES ENTEROTOXINES DE *S. AUREUS* EST INGERE PAR L'HOMME, LES ENTEROTOXINES PEUVENT PROVOQUER DES SYMPTOMES DE GASTRO-ENTERITES. LE FROMAGE EST UN MILIEU TRES COMPLEXE DONT PLUSIEURS FACTEURS PEUVENT INFLUENCER LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES. *S. AUREUS* CROIT BIEN DANS PLUSIEURS VARIETES DE FROMAGES, EN PARTICULIER LES FROMAGES A TYPE PATE PRESSEE NON CUITE, NEANMOINS LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES Y EST RARE. DE PLUS, EN CAS DE PRODUCTION, SEA ET SED SONT LES PLUS SOUVENT RENCONTREES. BEAUCOUP D'ETUDES ONT DEJA ETE EFFECTUEES SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS PLUSIEURS TYPES DE FROMAGES, MAIS PEU SE SONT INTERESSEES A UN GRAND NOMBRE D'ISOLATS D'UNE GRANDE DIVERSITE PHENOTYPIQUE ET GENETIQUE, COLLECTES A PARTIR DU LAIT ET DU FROMAGE.

LE POTENTIEL REDOX OFFRE UNE NOUVELLE APPROCHE POUR COMPRENDRE POURQUOI CERTAINES SOUCHES PRODUISENT DES ENTEROTOXINES DANS CERTAINS FROMAGES ET PAS DANS D'AUTRES. DE MEME, LA SPECTROSCOPIE IRTF EST UNE NOUVELLE TECHNIQUE POUR L'IDENTIFICATION ET LE CONTROLE DES SOUCHES ENTEROTOXINOGENES. LA DEMANDE DES PROFESSIONNELS EN PLUS DE TOUS CES ELEMENTS JUSTIFIENT CE TRAVAIL QUI COMPORTERA LES PHASES SUIVANTES :

- Collecte et isolement de staphylocoques à coagulase positive et caractérisation phénotypique et génétique des isolats de *S. aureus*, de fromages de Rhône-Alpes et du Massif Central,
- Evaluation de l'aptitude à produire des entérotoxines dans un fromage modèle,
- Evaluation de l'aptitude à produire des entérotoxines dans des fromages expérimentaux simulant trois fabrications traditionnelles,
- Evaluation de l'effet du potentiel d'oxydoréduction sur la croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxines.

L'OBJECTIF PRINCIPAL ETANT D'EVALUER L'APTITUDE DES SOUCHES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* A LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS DES CONDITIONS CONTROLEES DE FABRICATION FROMAGERE EN FONCTION DE LA DIVERSITE PHENOTYPIQUE ET GENETIQUE.

Matériel et Méthodes

TABLEAU XII : LISTE DES ESPECES DE *STAPHYLOCOCCUS*

Souche	Origine *	Souche	Origine *
<i>S. arlettae</i> ^T	DSMZ 20672	<i>S. gallinarum</i>	CIP 105918
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	LMG 8224	<i>S. gallinarum</i>	LMG 19119
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	LMG 9826	<i>S. gallinarum</i> ^T	DSMZ 20610
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	LMG 10147	<i>S. haemolyticus</i> ^T	DSMZ 20263
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	LMG 14265	<i>S. hominis ssp. hominis</i>	DSMZ 20329
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	LMG 15154	<i>S. hominis ssp. hominis</i>	DSMZ 20330
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	LMG 16805	<i>S. hominis ssp. hominis</i> ^T	LMG 13348
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	LMG 16820	<i>S. hyicus</i> ^T	DSMZ 20459
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	CIP 53.156	<i>S. intermedius</i>	CIP 81.77
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	CIP 4.83	<i>S. intermedius</i>	LMG 9079
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	CIP 67.7	<i>S. intermedius</i> ^T	LMG 13351
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	CIP 67.8	<i>S. kloosii</i> ^T	DSMZ 20676
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	CIP 100922	<i>S. lentus</i>	DSMZ 6672
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	CIP 106152	<i>S. lentus</i>	LMG 19110
<i>S. aureus ssp. aureus</i> ^T	DSMZ 20231	<i>S. lentus</i> ^T	DSMZ 20352
<i>S. auricularis</i> ^T	DSMZ 20609	<i>S. lugdunensis</i> ^T	DSMZ 4804
<i>S. capitis ssp. capitis</i>	DSMZ 6180	<i>S. lutrae</i> ^T	DSMZ 10244
<i>S. capitis ssp. capitis</i>	DSMZ 20325	<i>S. muscea</i> ^T	DSMZ 7068
<i>S. capitis ssp. capitis</i> ^T	LMG 13353	<i>S. pasteurii</i> ^T	DSMZ 10656
<i>S. capitis ssp. ureolyticus</i> ^T	DSMZ 6717	<i>S. piscifermentans</i> ^T	DSMZ 7373
<i>S. caprae</i>	CIP 104519	<i>S. pulvereri</i> ^T	DSMZ 9930
<i>S. caprae</i>	LMG 19123	<i>S. saprophyticus ssp. saprophyticus</i>	CIP 104064
<i>S. caprae</i> ^T	DSMZ 20608	<i>S. saprophyticus ssp. saprophyticus</i>	CIP 103545
<i>S. carnosus ssp. utilis</i>	DSMZ 11676	<i>S. saprophyticus ssp. saprophyticus</i> ^T	DSMZ 20229
<i>S. carnosus</i> ^T	DSMZ 20501	<i>S. schleiferi ssp. coagulans</i> ^T	DSMZ 6628
<i>S. caseolyticus</i> ^T	DSMZ 20597	<i>S. schleiferi ssp. schleiferi</i> ^T	DSMZ 4807
<i>S. chromogenes</i> ^T	DSMZ 20454	<i>S. sciuri ssp. sciuri</i>	DSMZ 6671
<i>S. cohnii ssp. cohnii</i>	DSMZ 6669	<i>S. sciuri ssp. sciuri</i>	CIP 105824
<i>S. cohnii ssp. cohnii</i>	DSMZ 20261	<i>S. sciuri ssp. sciuri</i> ^T	DSMZ 20345
<i>S. cohnii</i> ^T	DSMZ 20260	<i>S. simulans</i>	DSMZ 20323
<i>S. cohnii ssp. urealyticum</i> ^T	DSMZ 6718	<i>S. simulans</i>	DSMZ 20723
<i>S. condimenti</i> ^T	DSMZ 11674	<i>S. simulans</i> ^T	DSMZ 20322
<i>S. delphini</i> ^T	DSMZ 20771	<i>S. vitulinus</i>	CIP 104850
<i>S. epidermis</i>	LMG 10273	<i>S. vitulinus</i>	CIP 104987
<i>S. epidermis</i>	LMG 13655	<i>S. warneri</i>	DSM 20036
<i>S. epidermis</i> ^T	DSMZ 20044	<i>S. warneri</i>	CIP 103960
<i>S. equorum</i>	LMG 19116	<i>S. warneri</i> ^T	LMG 13354
<i>S. equorum</i>	LMG 19118	<i>S. xylosus</i>	DSMZ 6179
<i>S. equorum</i> ^T	DSMZ 20674	<i>S. xylosus</i>	DSMZ 20029
<i>S. felis</i> ^T	DSMZ 7377	<i>S. xylosus</i> ^T	DSMZ 20266
<i>S. fleurettii</i> ^T	DSMZ 13212		

* DSMZ = collection allemande de micro-organismes et de cultures cellulaires ; LMG = collection belge de micro-organismes ; CIP = centre de ressources biologiques de l'Institut Pasteur

1. MATERIEL BIOLOGIQUE

LES STAPHYLOCOQUES

DES SOUCHES DE DIFFERENTES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES ONT ETE OBTENUES DE TROIS COLLECTIONS INTERNATIONALES DE MICRO-ORGANISMES : LA COLLECTION ALLEMANDE DE MICRO-ORGANISMES ET CULTURES CELLULAIRES (DSMZ) ; LA COLLECTION BELGE DE MICRO-ORGANISMES (LMG/BCCM) ; LE CENTRE DE RESSOURCES BIOLOGIQUES DE L'INSTITUT PASTEUR, FRANCE (CIP). LES DIFFERENTES ESPECES ET LEURS ORIGINES SONT PRESENTEES DANS LE TABLEAU XII. QUELQUES SOUCHES DE *S. AUREUS* ONT EGALEMENT ETE REÇUES DE J-P ROSEC, POUR LA VERIFICATION DE LA PRESENCE DE CERTAINS GENES PAR PCR (ROSEC, 1999). LES SOUCHES ONT ETE ENSEMENCEES SUR MILIEU PCA (PLATE COUNT AGAR, DIFCO, DETROIT, USA) ET INCUBEES 48 H A 37°C AVANT D'ETRE REPIQUEES DANS 5 ML DE BOUILLON BHI (BRAIN HEART INFUSION – BOUILLON CŒUR CERVELLE, BIOKAR DIAGNOSTICS, FRANCE) ET INCUBEES 20 H A 37°C. LES SOUCHES ONT ETE ENSUITE CONGELEES A -30°C ET -80°C DANS DES TUBES CONTENANT 0,4 ML DE L'INOCULUM, 0,4 ML DE BOUILLON BHI ET 0,4 ML DE GLYCEROL 50% (V/V).

LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE

PENDANT DES ANALYSES DE ROUTINE DE FROMAGES FRANÇAIS DE TYPE PATE PRESSEE NON CUITE, DES COLONIES DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE (SCP) ONT ETE COLLECTEES A PARTIR DES BOITES DE BAIRD-PARKER RABBIT PLASMA FIBRINOGENE (MILIEU BP-RPF, BIOKAR DIAGNOSTICS, FRANCE) ENTRE OCTOBRE 2000 ET AVRIL 2002. LES BOITES PROVENAIENT DE L'INSTITUT TECHNIQUE FRANÇAIS DES FROMAGES (ITFF) DE LA ROCHE-SUR-FORON (FROMAGES DE SAVOIE ET DE HAUTE SAVOIE) ET DU LABORATOIRE INTERPROFESSIONNEL D'ANALYSES LAITIÈRES (LIAL) DU MASSIF CENTRAL (FROMAGES AOC DU MASSIF CENTRAL). AINSI, LES COLONIES SUPPOSEES ETRE DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE DE PAR LEUR MORPHOLOGIE SUR BP-RPF (COLONIES ENTOUREES D'UN HALO DENSE) ONT ETE ISOLEES A PARTIR DE CES BOITES, DANS L'UNITE DE MICROBIOLOGIE A L'ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE (ENV) DE LYON. TOUS LES ISOLATS DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE RETENUS, ONT ETE REPIQUES SUR GELOSE AU SANG DE MOUTON POUR UNE REVIVIFICATION (INCUBATION A 35°C PENDANT 24 H). LA COAGULASE EN PLASMA DE LAPIN A ETE RECHERCHEE POUR CONFIRMER L'IDENTITE DES ISOLATS A COAGULASE POSITIVE COLLECTES A PARTIR DES BOITES DE BP-RPF. CES ISOLATS SERONT DORENAVANT APPELES LES ISOLATS DU PROGRAMME AQS-SA.

LES ISOLATS IDENTIFIES COMME ETANT DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE SELON LEUR ASPECT SUR LE MILIEU BP-RPF ONT ETE CENTRALISES, DUPLIQUES ET CONSERVES SOUS AZOTE GAZEUX A L'INSTITUT TECHNIQUE FRANÇAIS DES FROMAGES A LA ROCHE-SUR-FORON.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

L'IDENTIFICATION DES ISOLATS DE *S. AUREUS* S'EST DEROULEE DANS L'UNITE DE MICROBIOLOGIE A L'ENV DE LYON. CES ISOLATS ONT SUBI DES TESTS D'IDENTIFICATION DE L'ESPECE *S. AUREUS*. LA DISTINCTION ENTRE LES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE A ETE REALISEE SELON LES CRITERES DE BACTERIOLOGIE CLINIQUE (FRENEY *ET AL.*, 2000) : CULTURE AEROBIE ; DIAMETRE DES COLONIES ; PIGMENT ; HEMOLYSE β ; COAGULASE LIEE ; ACIDIFICATION DU MALTOSE ET DU TREHALOSE.

UNE SÉLECTION DE SOUCHES DE *S. AUREUS* ENTEROTOXINOGENES A ÉGALEMENT ÉTÉ OBTENUE DE DIFFÉRENTS LABORATOIRES A TRAVERS LA FRANCE : L'AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS (AFSSA) A MAISONS-ALFORT, L'ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE, L'UNIVERSITÉ DE CAEN, ET L'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) DE RENNES.

TOUS LES ISOLATS SONT STOCKÉS DANS DU GLYCÉROL AU CONGÉLATEUR A -30°C ET A -80°C.

CARACTÉRISATION DES ISOLATS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

LES DIFFÉRENTS ISOLATS DE *S. AUREUS*, COLLECTÉS LORS DES ANALYSES DE ROUTINE ENTRE OCTOBRE 2000 ET AVRIL 2002, ONT ÉTÉ CARACTÉRISÉS SELON PLUSIEURS MÉTHODES DE FAÇON À METTRE EN ÉVIDENCE LA DIVERSITÉ PHÉNOTYPIQUE ET GÉNÉTIQUE DE LA COLLECTION. LES ISOLATS ONT ÉTÉ BIOTYPES, ET ANALYSÉS POUR LEUR CAPACITÉ À PRODUIRE DES ENTEROTOXINES *IN VITRO*. UNE PARTIE DES ISOLATS A ÉTÉ CARACTÉRISÉE PAR DES MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE, AVEC ÉGALEMENT UNE RECHERCHE DES GÈNES CODANT LES ENTEROTOXINES. UNE NOUVELLE APPROCHE D'IDENTIFICATION ET DE CONTRÔLE DES SOUCHES DE *S. AUREUS* ENTEROTOXINOGENES, LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE À TRANSFORMÉE DE FOURIER (IRTF), A ÉTÉ EXPLORÉE.

BIOTYPAGE DES ISOLATS DE *S. AUREUS*

LE BIOTYPAGE DES ISOLATS DE *S. AUREUS* S'EST DÉROULÉ DANS L'UNITÉ DE MICROBIOLOGIE À L'ENV DE LYON. LES ISOLATS IDENTIFIÉS COMME ÉTANT *S. AUREUS* ONT ÉTÉ SUJET À UNE DÉTERMINATION DE LEUR BIOTYPE. LE SCHEMA DE HAJEK ET MARSALEK (1971) MODIFIÉ PAR DEVRIESE ET OEDING (1976) ET ISIGIDI *ET AL*, (1992) A ÉTÉ UTILISÉ POUR LA DÉTERMINATION DES BIOTYPES. LES ISOLATS ONT ÉTÉ TESTÉS POUR : LA STAPHYLOKINASE, LA PIGMENTATION, LA PRODUCTION DE BÉTA HÉMOLYSE, L'ACTIVITÉ DE COAGULASE SUR PLASMA BOVIN ET FINALEMENT, LA CROISSANCE SUR MILIEU CRISTAL VIOLET.

LES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES

TOUS LES ISOLATS IDENTIFIÉS EN TANT QUE *S. AUREUS*, ONT ÉTÉ ANALYSÉS POUR LEUR PRODUCTION D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*. IL ÉTAIT NÉCESSAIRE D'EXTRAIRE LES ENTEROTOXINES, PUIS DE DÉTECTER LEUR PRÉSENCE AVEC UNE MÉTHODE ELISA. LE TYPAGE A ÉTÉ ENSUITE RÉALISÉ AVEC UNE MÉTHODE D'AGGLUTINATION REVERSE DE PARTICULES DE LATEX.

Extraction des entérotoxines

DEUX KITS ONT ÉTÉ UTILISÉS POUR LA DÉTECTION D'ENTEROTOXINES PRODUIES *IN VITRO*. LE KIT TRANSIA (DIFFCHAMB, FRANCE) A ÉTÉ UTILISÉ POUR DÉTECTER SEA À SEE DANS LEUR ENSEMBLE ET LE KIT OXOID SET-RPLA (OXOID, ANGLETERRE) POUR DISTINGUER LE TYPE D'ENTEROTOXINE PRODUIE (SEA À SED). CES DEUX KITS N'AYANT PAS LA MÊME SENSIBILITÉ (UN SEUIL DE 0,2 NG/ML POUR LE KIT TRANSIA ET DE 0,5 À 1,0 NG/ML POUR LE KIT OXOID), DEUX VARIANTES DE LA MÉTHODE D'EXTRACTION ONT ÉTÉ UTILISÉES.

LE KIT TRANSIA : LES ISOLATS DE *S. AUREUS* ONT ETE INCUBES DANS 5 ML DE BOUILLON BHI PENDANT 24 H A 37°C. APRES INCUBATION, LES CULTURES ONT ETE CENTRIFUGEES A 10000 G PENDANT 10 MIN A 4°C (CENTRIFUGEUSE BECKMAN, MODELE J2-21M/E, CALIFORNIE, USA). LE SURNAGEANT DE CULTURE A ETE RECUPERE ET DILUE AU 1/10^{EME} DANS DU PBS TWEEN (PREPARE SELON LES INSTRUCTIONS DU KIT TRANSIA). LES SURNAGEANTS DE CULTURES DILUES ONT ETE STERILISES PAR FILTRATION (FILTRES MILLIPORE, POROSITE 0,22 µM) ET ENSUITE ALIQUOTES EN TUBES EPENDORF 1,5 ML STERILES A RAISON DE 100 µL PAR TUBE, ET CONGELES EN ATTENDANT LA REALISATION DES ANALYSES.

LE KIT OXOID : LES ISOLATS DE *S. AUREUS* ONT ETE INCUBES DANS 5 ML DE BOUILLON BHI PENDANT 24H A 37°C. APRES INCUBATION, LES CULTURES ONT ETE CENTRIFUGEES A 10000 G PENDANT 10 MIN A 4°C (CENTRIFUGEUSE BECKMAN, MODELE J2-21M/E, CALIFORNIE, USA). LE SURNAGEANT DE CULTURE A ETE RECUPERE, STERILISE PAR FILTRATION ET ALIQUOTE EN TUBES EPENDORF 1,5 ML STERILES A RAISON DE 200 µL PAR TUBE, ET CONGELES EN ATTENDANT LA REALISATION DES ANALYSES.

Détection des entérotoxines

LA DETECTION DES ENTEROTOXINES A ETE REALISEE, AVEC LE KIT TRANSIA ET LE KIT OXOID, SELON LES INSTRUCTIONS DES FABRICANTS.

AINSI, 100 µL DU SURNAGEANT DILUE ETAIENT NECESSAIRES POUR UNE ANALYSE AVEC LE KIT TRANSIA. AUPARAVANT, UNE PREPARATION DE L'ECHANTILLON A DU ETRE REALISEE POUR ELIMINER DES INTERFERENCES DUES A LA PRESENCE DE LA PROTEINE A PRODUITE PAR *S. AUREUS*. LE SCHEMA SUIVANT A ETE UTILISE :

- 900 µl de BHI ont été ajoutés à 100 µl de surnageant décongelé,
- 900 µl du mélange ont été ajoutés dans 100 µl de sérum de lapin non immun décomplémenté (Diffchamb, France) et incubés 30 min à température ambiante,
- 100 µl du mélange final ont été utilisés pour réaliser le test.

LA LECTURE DE LA PLAQUE A ETE REALISEE A 450 NM AVEC UN LECTEUR DE PLAQUES PR2100 (SANOFI DIAGNOSTICS, FRANCE) ET UN LOGICIEL DE LECTURE ENDPOINT VERSION 2,0 (SANOFI DIAGNOSTICS, FRANCE).

LE KIT TRANSIA A ETE CHOISI, EN PREVISION DE LA SUITE DE L'ETUDE, CAR C'EST LA METHODE OFFICIELLE PRECONISEE PAR L'AFSSA POUR LA DETECTION D'ENTEROTOXINES DANS DES PRODUITS ALIMENTAIRES ET IL PRESENTE LE MOINS D'INTERFERENCES AVEC LA MATRICE LAITIERE.

LE TYPAGE DES ENTEROTOXINES AVEC LE KIT OXOID NECESSITE 25 µL D'ECHANTILLON PAR ENTEROTOXINE (SEA A SED) ET PAR TEMOIN (TOTAL = 125 µL), SANS DILUTION DU SURNAGEANT ET SANS AJOUT DE SERUM DE LAPIN POUR LA PROTEINE A. LES RESULTATS DU KIT OXOID SE LISENT A L'ŒIL NU, APRES 24 H D'INCUBATION A TEMPERATURE AMBIANTE.

Recherche des gènes codant les entérotoxines

LA PCR A ETE CHOISIE POUR LA RECHERCHE DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES A, B, C, D, E, G, H, I, J ET TSST-1. CETTE RECHERCHE A ETE EFFECTUEE CAR SEULES SEA A SEE SONT DETECTEES AVEC LES KITS TRANSIA ET OXOID. LA PRESENCE DU GENE PEUT CONFIRMER LES RESULTATS DE PRODUCTION *IN VITRO*, MAIS EGALEMENT MONTRER UNE CAPACITE A PRODUIRE D'AUTRES ENTEROTOXINES DU FAIT QU'IL EN EXISTE 19 AUJOURD'HUI.

EXTRACTION DE L'ADN

L'EXTRACTION DE L'ADN DES ISOLATS DE *S. AUREUS* A ETE REALISEE AVEC LA METHODE DE THIOCYANATE-GUANIDINE. LES ISOLATS ONT ETE INCUBES DANS DU BOUILLON BHI UNE NUIT A 37°C. APRES CENTRIFUGATION (10 MIN, 4°C, 3700 G), LE CULOT A ETE DISPERSE DANS 500 µL DE TAMPON STE (TRIZMA-BASE 50 MM, EDTA 20 MM, SACCHAROSE 6,7% (P/V) PH 8, SIGMA, FRANCE) ET RECENTRIFUGE (10 MIN, 4°C, 3700 G). LES CULOTS RECUPERES ONT ETE CONSERVES A -30°C EN ATTENDANT L'EXTRACTION.

TABLEAU XIII : LISTE DES AMORCES SPECIFIQUES UTILISEES POUR LA RECHERCHE DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES.

Amorce	Séquence	Programme PCR	Taille du fragment	Référence
<i>sea</i>				Sharma <i>et al.</i>
SA-U	5' TGTATGTATGGAGGTGTAAC 3'	1	270 bp	(2000)
<i>seb</i>				Sharma <i>et al.</i>
SA-U	5' TGTATGTATGGAGGTGTAAC 3'	1	165 bp	(Sharma <i>et al.</i> ,
<i>sec</i>				Sharma <i>et al.</i>
SA-U	5' TGTATGTATGGAGGTGTAAC 3'	1	102 bp	(2000)
<i>sed</i>				Sharma <i>et al.</i>
SA-U	5' TGTATGTATGGAGGTGTAAC 3'	1	306 bp	(2000)
<i>see</i>				Sharma <i>et al.</i>
SA-U	5' TGTATGTATGGAGGTGTAAC 3'	1	213 bp	(2000)
<i>seg</i>				Jarraud <i>et al.</i>
SEG-1	5' AATATGTGAATGCTCAACCCGATC 3'	2	642 bp	(1999)
<i>seh</i>				Jarraud <i>et al.</i>
SEH-1	5' CAATCACATCATATGCGAAAGCAG 3'	2	375 bp	(1999)

<i>sei</i>				Jarraud <i>et al.</i>
SEI-1	5' CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG 3'	2	576 bp	(1999)
<i>sej</i>				Monday et
SEJ-1	5' CATCAGAACTGTTGTTCCGCTAG 3'	3	142 bp	Bohach (1999)
<i>tst</i>				Jarraud <i>et al.</i>
TSST-1	5' ATGGCAGCATCAGCTTGATA 3'	2	350 bp	(1999)

- **Lyse des cellules** : Les culots bactériens ont été décongelés à température ambiante et 230 µl du mélange Guanidine thiocyanate (Sigma) 4M, pH 7,5 + N-lauroylsarcosine (Sigma) 10% ont été ajoutés. Les tubes ont été vortexés pour homogénéiser le mélange et chauffés au four à micro-ondes (433W) 45 s, mis dans de la glace 1 min et réchauffés au four à micro-ondes (433W) 45 s. Ensuite, 250 µl de N-lauroylsarcosine 5% ont été ajoutés et les tubes ont été vortexés et centrifugés quelques secondes pour ramener le liquide au fond.
- **Précipitation des acides nucléiques et des protéines** : 1 ml du mélange (20/1 v/v) d'éthanol 100% et d'acétate de sodium 3M (acétate de sodium anhydre, Sigma, et acide acétique glacial 100%, VWR) a été ajouté et chaque tube retourné pour faire précipiter l'ADN. Après 10 min de repos à température ambiante, les tubes ont été centrifugés (10 min, 4°C, 14000 g) et le culot repris avec 250 µl du mélange acétate de potassium 0,5M + TE 1X (EDTA, Sigma et Trisbase, Sigma, pH 8, HCl 5 N). Les tubes ont été agités, incubés 1 h 30 dans de la glace et centrifugés (30 min, 4°C, 14000 g). Le surnageant a été récupéré dans des tubes ependorf, 525 µl du mélange éthanol 100%/acétate de sodium 3M ont été ajoutés et les tubes retournés. Les tubes ont été ensuite mis à -20°C pendant au moins 20 min.
- **Centrifugation, lavage et séchage des acides nucléiques** : Après centrifugation (10 min, 4°C, 11700 g), le culot a été repris dans 500 µl d'éthanol 70%, puis centrifugé (10 min, 4°C, 11700 g). Le culot a été séché avec un appareil speed vacuum (Univapo 100H, UniEquip, Allemagne), pendant 20 min.
- **Reprise du culot d'acides nucléiques et traitement à la RNase** : le culot a été repris dans 40 µl de TE 1X + Rnase (10 mg/ml : Rnase 25 mg, Sigma + tampon Tris-HCl 100mM + NaCl 5M + eau UHQ) 100/1 v/v. Les acides nucléiques ont été ensuite conservés à -20°C.

LES AMORCES SPECIFIQUES

LES AMORCES CODANT LES ENTEROTOXINES A, B, C, D, E, G, H, I, J ET TSST-1 (SIGMA-GENOSYS) ONT ETE UTILISEES POUR LA RECHERCHE DES GENES. LES AMORCES, LES SEQUENCES ET LA TAILLE DES FRAGMENTS OBTENUS SONT PRESENTEES DANS LE TABLEAU XIII CI-CONTRE.

LA REACTION PCR

LE MELANGE REACTIONNEL UTILISE A ETE CONSTITUE DE LA FAÇON SUIVANTE :

▪ Solution MgCl ₂ (25 mM, Sigma)	0,4 µl
▪ Tampon 10X + MgCl ₂ (Qbiogène)	1,0 µl
▪ dXTP (2,5 mM, Roche Diagnostic)	0,8 µl
▪ Amorces 1	1,0 µl
▪ Amorces 2	1,0 µl
▪ Taq polymérase (5 U / µl, Qbiogène)	0,1 µl
▪ Eau UHQ stérile	4,7 µl

9 µl DE CE MELANGE ONT ETE DISTRIBUES DANS UN TUBE PCR AVEC 1µl D'ADN.

L'AMPLIFICATION A ETE REALISEE DANS UN THERMOCYCLEUR (GENEAMP PCR SYSTEM 9600, PERKIN ELMER, NORWALK, USA). LES PROGRAMMES D'AMPLIFICATION SUIVANTS ONT ETE UTILISES SELON LES AMORCES SPECIFIQUES (VOIR TABLEAU XIII) :

- Programme 1 : dénaturation initiale de l'ADN à 94°C pendant 5 min ; 25 cycles (dénaturation à 94°C pendant 30 sec, hybridation à 50°C pendant 30 sec, et élongation à 72°C pendant 30 sec) ; élongation finale à 72°C pendant 2 min ; conservation des produits à 4°C.
- Programme 2 : dénaturation initiale de l'ADN à 94°C pendant 5 min ; 30 cycles (dénaturation à 94°C pendant 2 min, hybridation à 50°C pendant 2 min, et élongation à 72°C pendant 1 min) ; élongation finale à 72°C pendant 2 min ; conservation des produits à 4°C.
- Programme 3 : dénaturation initiale de l'ADN à 94°C pendant 5 min ; 30 cycles (dénaturation à 94°C pendant 1 min, hybridation à 62°C pendant 1 min, et élongation à 72°C pendant 1 min) ; élongation finale à 72°C pendant 2 min ; conservation des produits à 4°C

AUX PRODUITS FINAUX ONT ETE AJOUTES 2,5 µl DE BLEU DE BROMOPHENOL (APPLIGENE, FICOLL 400 A 30% ET SODIUM LAURYL SULPHATE A 20%, GIBCO BRL) DILUE DANS DU TAMPON TE 5X (EDTA, TRIS-BASE ET HCL 5N). LES PLAQUES PCR ONT ETE ENSUITE CONGELEES EN ATTENDANT LA REALISATION DE LA MIGRATION SUR GEL D'AGAROSE 1% (SEAKEM GTG, TEBU FMC BIOPRODUCTS, USA).

UN MARQUEUR MOLECULAIRE DE TAILLE 123 PAIRES DE BASES (INVITROGEN, FRANCE) A ETE UTILISE A RAISON DE 12,5 µl PAR Puits ET UN Puits PAR LIGNE. LA MIGRATION A ETE REALISEE DANS UN VOLUME CONSTANT DE TAMPON TBE 0,5X SOUS UNE TENSION CONSTANTE DE 100 V JUSQU'A CE QUE LE BLEU DE BROMOPHENOL AIT ATTEINT UNE DISTANCE D'APPROXIMATIVEMENT 5 CM.

LA COLORATION DU GEL A ETE REALISEE AVEC DU BROMURE D'ETHIDIUM (BIORAD, 40 µl A 10 MG/ML DANS 200 ML D'EAU OSMOSEE) EN AGITANT PENDANT 15 MIN. LE GEL A ETE ENSUITE RINCE A L'EAU OSMOSEE (400 ML) PENDANT 10 MIN. LE GEL COLORE A ETE

VISUALISE SOUS UNE LAMPE UV A 312 NM ET PHOTOGRAPHIE (SYSTEME POLAROID MP4+, POLAROID LTD., SAINT ALBANS, ANGLETERRE).

LA PRESENCE DU GENE ETAIT INDIQUEE PAR UNE BANDE QUI APPARAISSAIT SELON LE POIDS MOLECULAIRE, EN PAIRES DE BASES (BP), DU FRAGMENT RECHERCHE. LES TAILLES DES FRAGMENTS SONT INDIQUEES DANS LE TABLEAU XIII.

CARACTERISATION GENETIQUE DES ISOLATS DE *S. AUREUS*

DIFFERENTES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ONT ETE EMPLOYEES POUR ETUDIER LA DIVERSITE GENETIQUE D'UNE PARTIE DE LA COLLECTION AQS-SA.

Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)

L'ANALYSE DES ISOLATS PAR ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE A ETE REALISEE DANS L'UNITE DE MICROBIOLOGIE A L'ENV DE LYON. CETTE TECHNIQUE, METHODE DE REFERENCE UTILISEE EN BACTERIOLOGIE CLINIQUE, A ETE UTILISEE POUR LA CARACTERISATION GENETIQUE D'UNE SELECTION D'ISOLATS DE *S. AUREUS*.

L'ADN GENOMIQUE A ETE PREPARE SELON LA METHODE DECRITE PAR LINDHART *ET AL.* (1992). LES ADN OBTENUS ONT ETE ENSUITE DIGERES UNE NUIT A 25°C AVEC 10U D'ENDONUCLEASE *SmaI* (ROCHE APPLIED SCIENCE, MEYLAN, FRANCE). LES FRAGMENTS D'ADN ONT ETE SEPARES PAR PFGE A L'AIDE D'UN APPAREIL CHEF DRIII (BIO-RAD, RICHMOND, CALIFORNIA, USA). LES ECHANTILLONS ONT ETE INCLUS DANS UN GEL D'AGAROSE 1% (FASTLANE, BIOPRODUCTS) PREPARE EN TAMPON TBE 0,5X. LES PARAMETRES DE MIGRATION UTILISES ETAIENT : TAMPON TBE 0,5X, 4,5 V/CM, 12°C, TEMPS DE PULSE EVOLUANT DE 5 A 25 SECONDES PENDANT 22 H.

L'ANALYSE DES RESULTATS CONSISTAIT EN UNE COMPARAISON VISUELLE, ET UNE ANALYSE A L'AIDE DU PROGRAMME TAXOTRON (INSTITUT PASTEUR), DES PROFILS PFGE OBTENUS PAR RAPPORT A UN TEMOIN DE POIDS MOLECULAIRE PULSE MARKER 50 - 1000 KB (SIGMA-ALDRICH, SAINT QUENTIN FALLAVIER, FRANCE). LE GROUPEMENT DES ISOLATS BACTERIENS EN PULSOTYPE S'EFFECTUAIT SELON LES CRITERES ACTUELLEMENT ADMIS, PROPOSES PAR TENOVER *ET AL.* (1995) ET RECEMMENT CONFIRMES PAR LES TRAVAUX DE BLANC *ET AL.* (2001). SELON CES CRITERES, DEUX ISOLATS ETAIENT CONSIDERES COMME IDENTIQUES S'ILS PRESENTAIENT LE MEME PROFIL ELECTROPHORETIQUE OU ETROITEMENT LIES GENETIQUEMENT S'ILS PRESENTAIENT UNE DIFFERENCE DE PROFIL INFERIEURE OU EGALE A TROIS FRAGMENTS. ILS ETAIENT CONSIDERES COMME AYANT UNE RELATION CLONALE SI LEURS PROFILS DIFFERAIENT DE PLUS DE TROIS MAIS MOINS DE SIX FRAGMENTS. ET ENFIN, DEUX ISOLATS ETAIENT CONSIDERES COMME GENETIQUEMENT DIFFERENTS ET APPARTENANT DONC A DEUX PULSOTYPES DIFFERENTS SI LEURS PROFILS PRESENTAIENT PLUS DE SIX BANDES DE DIFFERENCE. DE PLUS, LA REPRODUCTIBILITE DE LA TECHNIQUE A ETE VERIFIEE EN INCLUANT, DANS CHACUN DES GELS D'ELECTROPHORESE, UN ISOLAT DONT LE PROFIL ELECTROPHORETIQUE A ETE PREALABLEMENT DETERMINE.

rep-PCR

LA REP-PCR A ETE CHOISIE COMME METHODE COMPLEMENTAIRE POUR LA CARACTERISATION GENETIQUE D'UNE PARTIE DES ISOLATS DE *S. AUREUS* DE LA COLLECTION

AQS-SA. L'ADN A ETE PREPARE AVEC LA METHODE D'EXTRACTION THIOCYANATE-GUANIDINE, DECRIT DANS LA SECTION 2.2.3.1. LES AMORCES REP SUIVANTES ONT ETE UTILISEES.

TABLEAU XIV : AMORCES REP, ERIC ET RW3 UTILISEES POUR LA REP-PCR

Amorce	Séquence
REP1	5'IIINCGNCGNCATCNGGC3'
REP2	5'NCGNCTTATCNGGCCTAC3'
ERIC1	5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3'
ERIC2	5'AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG3'
RW3	5'TCGCTCAAAACAACGACACC3'

LE MELANGE REACTIONNEL UTILISE ETAIT CONSTITUE DE LA FAÇON SUIVANTE (POUR 100 µL) :

- Solution MgCl₂ (25mM) 4 µl
- Tampon 10X + MgCl₂ 10 µl
- dXTP (2,5 mM) 8 µl
- Amorce 1 (10 µM) 2,5 µl
- Amorce 2 (10 µM) 2,5 µl
- Taq polymérase (5 U / µl) 1 µl
- Eau UHQ stérile 47 µl

15 µL DE CE MELANGE ONT ETE DISTRIBUES DANS UN TUBE PCR AVEC 5 µL D'ADN ET LES PROGRAMMES PCR SUIVANTS ONT ETE UTILISES.

PROGRAMME PCR (REP ET ERIC) : DENATURATION INITIALE DE L'ADN A 94°C PENDANT 5 MIN ; 30 CYCLES (DENATURATION A 94°C PENDANT 1 MIN, HYBRIDATION A 40°C PENDANT 1 MIN, RAMPE JUSQU'À 72°C PENDANT 6 MIN ET ELONGATION A 72°C PENDANT 1 MIN) ; CONSERVATION DES PRODUITS A 4°C (BERTHIER *ET AL.*, 2001).

PROGRAMME PCR (RW3) : DENATURATION INITIALE DE L'ADN A 95°C PENDANT 3 MIN ; 30 CYCLES (DENATURATION A 94°C PENDANT 1 MIN, HYBRIDATION A 54°C PENDANT 1 MIN, ET ELONGATION A 72°C PENDANT 1 MIN) ; ELONGATION FINALE A 72°C PENDANT 5 MIN ; CONSERVATION DES PRODUITS A 4°C (DEL VECCHIO *ET AL.*, 1995).

COMME POUR LA PCR D'ESPECES (RECHERCHE DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES), DU BROMOPHENOL (APPLIGENE, FICOLL 400 A 30% ET SDS A 20%) DILUE DANS DU TAMPON TE 5X (EDTA, TRIS-BASE ET HCL 5N) A ETE AJOUTE AU PRODUIT FINAL, EN RAISON DE 2,5 µL/PUITS. LA PLAQUE A ETE ENSUITE CONGEELEE EN ATTENDANT LA REALISATION DE LA MIGRATION SUR GEL D'AGAROSE 1%. LA MIGRATION, LA COLORATION DU GEL ET LA PRISE DE PHOTOGRAPHIE SONT DECRITES DANS LA SECTION 2.2.3.3.

CARACTERISATION DES ISOLATS DE *S. AUREUS* PAR SPECTROSCOPIE IRTF

AFIN DE MIEUX CARACTERISER LA COLLECTION D'ISOLATS, NOUS AVONS FAIT APPEL A LA TECHNIQUE DE LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER (IRTF) POUR L'IDENTIFICATION ET LA DISCRIMINATION DE L'ESPECE *S. AUREUS*.

Préparation des biofilms

LES ISOLATS/SOUCHES A ANALYSER ONT ETE ENSEMENCES DANS 5 ML DE BHI BOUILLON EN RAISON DE TROIS TUBES PAR ISOLAT/SOUCHE, ET INCUBES 18 H A 37°C. LE MILIEU A ETE ELIMINE PAR CENTRIFUGATION 15 MIN A 5000 G A 4°C (CENTRIFUGEUSE BECKMAN), PUIS LE CULOT A ETE LAVE DEUX FOIS AVEC DE L'EAU DEMINERALISEE STERILE ET CENTRIFUGE (11800 G PENDANT 15 MIN A 4°C). LES CULOTS SONT ENSUITE REMIS EN SUSPENSION DANS DE L'EAU DEMINERALISEE STERILE A UNE CONCENTRATION D'ENVIRON 40 MG DE POIDS HUMIDE PAR ML. ENSUITE, 50 µL DE CETTE SUSPENSION CELLULAIRE ETAIENT DEPOSES SUR LA FENETRE DE MESURE (EN SELENURE DE ZINC), MONTEE SUR UNE ROUE D'ECHANTILLONNAGE, ET SECHES A L'ETUVE (A 50°C) PENDANT 45 MIN. POUR CHAQUE SUSPENSION CELLULAIRE PREPAREE, DEUX BIOFILMS ONT ETE REALISES. LA ROUE D'ECHANTILLONNAGE A ETE PLACEE DANS LE SPECTROMETRE INFRAROUGE ET L'ATMOSPHERE DANS L'APPAREIL A ETE EQUILIBRE PENDANT UNE HEURE.

Enregistrement des spectres

LES SPECTRES ONT ETE ENREGISTRES AVEC UN SPECTROMETRE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER, NICOLET 740 (THERMONICOLET, PARIS, FRANCE), PURGE AVEC DE L'AIR SECHE POUR ENLEVER L'EAU ET LE DIOXYDE DE CARBONE RESIDUELS DANS L'AIR. LES SPECTRES ONT ETE ENREGISTRES ENTRE 3000 ET 750 cm^{-1} , AVEC UNE RESOLUTION DE 2 cm^{-1} ET ETAIENT LE RESULTAT DE LA MOYENNE DE 100 SCANS (OU BALAYAGES). LES SPECTRES ONT ETE ENREGISTRES EN SIMPLE FAISCEAU ET UN SPECTRE DE REFERENCE (FENETRE SANS ECHANTILLON) A ETE ENREGISTRE TOUS LES QUATRE ECHANTILLONS (AVEC UNE FENETRE DIFFERENTE POUR CHAQUE REFERENCE).

Traitement des spectres

LE RAPPORT A ETE EFFECTUE ENTRE LA FENETRE AVEC ECHANTILLON ET LA FENETRE DE REFERENCE, PUIS LES SPECTRES ONT ETE ENREGISTRES SOUS FORMAT .JDX ET IMPORTES DANS LE LOGICIEL SAS® (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM FOR WINDOWS, VERSION 6,2, SOUTH CAROLINA, USA). LE TRAITEMENT DES DONNEES A ETE EFFECTUE DANS LA REGION SPECTRALE DE 1800 A 750 cm^{-1} SELON LA PROCEDURE D'ANALYSE CANONIQUE DECRITE PAR HOLT *ET AL.* (1995). C'EST UN PROCESSUS D'ANALYSE MULTIDIMENSIONNELLE. LA TECHNIQUE CONSISTE A CHERCHER DES COMBINAISONS LINEAIRES QUI MAXIMISENT LES RAPPORTS DE VARIANCE. ELLE S'APPUIE SUR LES DONNEES SPECTRALES BRUTES NORMALISEES. POUR FAIRE L'ANALYSE, IL EST NECESSAIRE DE REDUIRE LA DIMENSION DES DONNEES SPECTRALES, CECI EST FAIT PAR UNE ANALYSE DES COMPOSANTES PRINCIPALES (ACP). L'ANALYSE CANONIQUE REPRESENTE LES SPECTRES DANS UN ESPACE DE N DIMENSIONS, LA DISTANCE QUI SEPARA LES DIFFERENTS GROUPES EST REPRESENTEE PAR LA DISTANCE DE MAHALANOBIS, ELLE EST CALCULEE SELON L'EQUATION SUIVANTE :

$$M^2_{1,2} = (X_1 - X_2)^T S^{-1} (X_1 - X_2)$$

Où S : matrice de covariance à l'intérieur d'un groupe

X₁ : matrice des moyennes de groupe 1

X₂ : matrice des moyennes de groupe 2

PLUS LES DISTANCES DE MAHALANOBIS ENTRE DEUX GROUPES SONT ELEVEES, PLUS LES DEUX GROUPES SONT DIFFERENTS.

FABRICATIONS DE FROMAGES EXPERIMENTAUX

L'OBJECTIF DE CETTE ETAPE DU TRAVAIL ETAIT DE TROUVER DES ISOLATS DE *S. AUREUS* PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES EN CONDITIONS FROMAGERES AFIN DE LES TESTER PAR LA SUITE DANS TROIS TECHNOLOGIES SIMULANT DES FABRICATIONS TRADITIONNELLES. POUR ATTEINDRE CE BUT, UN FROMAGE MODELE A PATE PRESSEE NON CUITE, COMPORTANT UN DELACTOSAGE, AVEC UNE COURBE D'ACIDIFICATION « LENTE », A ETE RETENU POUR FAVORISER LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS LE FROMAGE PAR LES ISOLATS DE *S. AUREUS* CHOISIS.

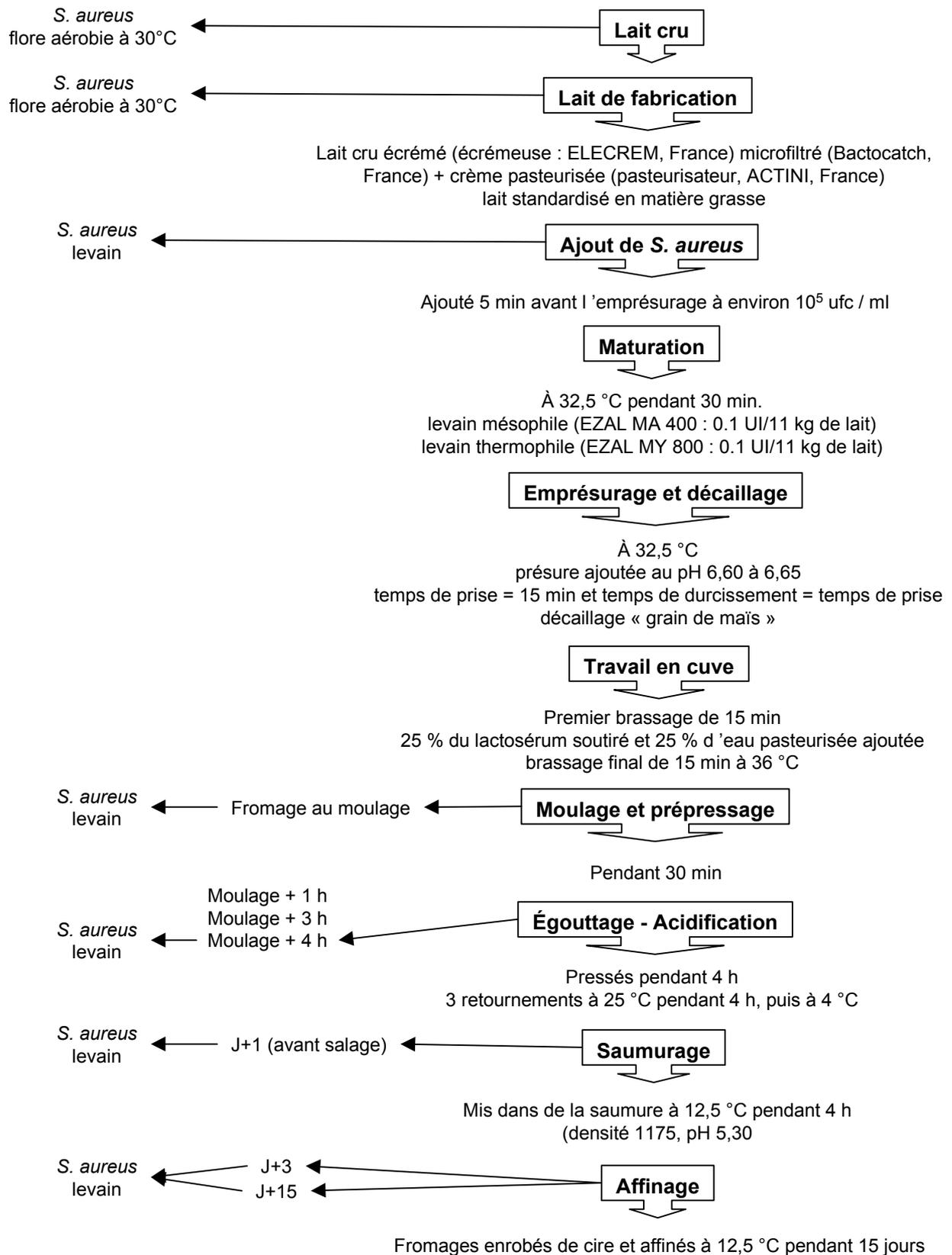


Figure 4 : schéma de fabrication du fromage modèle, calendrier des prélèvements et des analyses microbiologiques (suivi de *S. aureus* et du levain).

CROISSANCE DES ISOLATS DE *S. AUREUS* SUR LAIT

UNE PREMIERE EXPERIENCE A ETE REALISEE, A L'INSTITUT TECHNIQUE FRANÇAIS DES FROMAGES A LA ROCHE-SUR-FORON, SUR DU LAIT RECONSTITUE A 10% (LAIT G, ITFF), AVEC LES 29 ISOLATS DE *S. AUREUS* RETENUS POUR LA SUITE DU TRAVAIL, POUR VERIFIER LEUR CAPACITE DE CROISSANCE DANS CE MILIEU. LE LAIT G EST UN LAIT AYANT ETE IRRADIE. UNE PRECULTURE A ETE EFFECTUEE DANS 10 ML DE BOUILLON CASEINE SOJA (BIOKAR DIAGNOSTICS) PENDANT 1 NUIT A 37°C. 0,2 ML DE LA PRECULTURE A ETE DILUE DANS 9.8 ML D'EAU PHYSIOLOGIQUE. 1 ML DE LA DILUTION A ETE INOCULE DANS 200 ML DE LAIT RECONSTITUE. LE LAIT A ETE INCUBE 24 H A 32°C. CETTE TEMPERATURE A ETE CHOISIE CAR C'ETAIT LA TEMPERATURE D'EMPRESURAGE UTILISEE DANS LE FROMAGE MODELE. LE DENOMBREMENT A ETE EFFECTUE, APRES INOCULATION, APRES 2 H, 5 H ET 24 H, SUR GELOSE CASEINE-SOJA (BIOKAR DIAGNOSTICS, FRANCE).

PREPARATION DE L'INOCULUM DE *S. AUREUS*

LES ISOLATS ONT ETE D'ABORD INOCULES, A PARTIR DU TUBE CONGELE, DANS 5 ML DE BHI + 1% POUDRE DE LAIT (1 G DE POUDRE PAR LITRE DE BHI) ET INCUBEES 20 H A 37°C. LE SURNAGEANT A ETE ENLEVE PAR CENTRIFUGATION, 10000G, 10 MIN A 4°C, POUR EVITER TOUT TRANSFERT D'ENTEROTOXINES DANS LE LAIT DE FABRICATION, ET LE CULOT A ETE ENSUITE DISPERSE DANS 1 ML D'EAU PEPTONNEE (1 G/L DE BACTOPEPTONE - DIFCO, DETROIT, USA). DES DILUTIONS SUCCESSIVES ONT ETE REALISEES DANS 9 ML D'EAU PEPTONNEE. LES DILUTIONS ONT ETE ENSEMENCEES SUR MILIEU BHI GELOSE A L'AIDE D'UN APPAREIL SPIRALE (SPIRAL SYSTEMS, FRANCE). LES BOITES ONT ETE INCUBEES 2 JOURS A 37°C ET LE COMPTAGE RESULTAIT DE LA MOYENNE DE DEUX BOITES D'UNE MEME DILUTION. LA POPULATION DE *S. AUREUS* DANS 1 ML D'EAU PEPTONNEE A ETE EVALUEE ET UN VOLUME DONNE DE CETTE SUSPENSION ETAIT AJOUTEE EN CUVE POUR UN INOCULUM DONNE DE DEPART.

FABRICATION DU FROMAGE MODELE

LES FABRICATIONS SE SONT DERouleES SUR TROIS SEMAINES EN MAI 2002, DANS LA FROMAGERIE EXPERIMENTALE DE L'INRA DE POLIGNY. LES FABRICATIONS ONT ETE REALISEES SUR DEUX JOURNEES PAR SEMAINE, AVEC QUATRE FROMAGES PAR JOUR A RAISON D'UN FROMAGE ET UN ISOLAT DE *S. AUREUS* PAR CUVE. UN TOTAL DE 23 ISOLATS A ETE CHOISI POUR EVALUER LEUR CAPACITE A PRODUIRE DES ENTEROTOXINES DANS LE FROMAGE MODELE. LES FROMAGES ONT ETE FABRIQUES AVEC DU LAIT MICROFILTRÉ ET DE LA CREME PASTEURISEE POUR S'AFFRANCHIR DE L'INFLUENCE DE LA FLORE NATURELLE DU LAIT. UN FROMAGE MODELE A PATE PRESSEE NON CUITE, FAVORISANT LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES, A ETE UTILISE POUR L'ENSEMBLE DES ISOLATS SELECTIONNES.

L'ENSEMENCEMENT DU LAIT EN *S. AUREUS*

A ETE REALISE A UN NIVEAU HAUT (ENVIRON 10^5 /ML). QUATRE FROMAGES ONT ETE FABRIQUES PAR CUVE, AVEC 11 L DE LAIT, POUR PRODUIRE DES FROMAGES D'ENVIRON 290 G.

ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

LES FROMAGES FABRIQUES ONT ETE ANALYSES AU COURS DE LA FABRICATION ET DE L'AFFINAGE A DIVERS STADES (FIGURE 4) : LAIT CRU ; LAIT DE FABRICATION ; LAIT EN CUVE

(APRES ENSEMENCEMENT) ; FROMAGE AU MOULAGE ; FROMAGE AU MOULAGE + 4 H ; FROMAGE AU DEMOULAGE (J+1, NON SALE) ; J+3 ; J+15.

TABLEAU XV : LISTE DES MILIEUX GELOSES UTILISES ET LEURS CONDITIONS D'UTILISATION POUR LE SUIVI DE *S. AUREUS* ET DU LEVAIN AU COURS DE LA FABRICATION ET DE L'AFFINAGE DES FROMAGES MODELES.

	Milieux de culture	Conditions d'utilisation
<i>S. aureus</i>	BP-RPF (Biokar Diagnostics, France)	2 jours à 37°C en aérobiose
Flore aérobie à 30°C	Plate Count Agar (PCA, Difco, Detroit, USA)	3 jours à 30°C en aérobiose
Lactocoques	Milieu 17 lactosé (M17 ,Difco, Detroit, USA)	2 jours à 20°C en aérobiose
Streptocoques thermophiles	Milieu 17 lactosé (M17 ,Difco, Detroit, USA)	2 jours à 45°C en aérobiose
Lactobacilles thermophiles	Milieu De Man, Rogosa et Sharpe (MRS, Difco, Detroit, USA)	3 jours à 45°C en anaérobiose

PREPARATION DES ECHANTILLONS DE LAIT ET DE FROMAGE

LES ECHANTILLONS ONT ETE PREPARES SELON UNE METHODE BASEE SUR LA NORME FIL 122C, 1996.

Lait

LE LAIT ETAIT PRELEVE DANS UN FLACON A VIS STERILE ET HOMOGENEISE 5 MIN EN AGITANT. DES DILUTIONS SUCCESSIVES DU LAIT ONT ETE REALISEES DANS 9 ML D'EAU PEPTONEE. LES DILUTIONS ONT ETE ENSUITE ENSEMENCEES SUR MILIEU GELOSE A L'AIDE D'UN APPAREIL SPIRAL. LE COMPTAGE DES COLONIES RESULTAIT DE LA MOYENNE DE DEUX BOITES ENSEMENCEES AVEC LA MEME DILUTION.

Fromage

LE FROMAGE AU MOULAGE ETAIT PRELEVE, DANS DES FLACONS A VIS STERILE, AVEC UNE CUILLERE STERILE. A PARTIR DU STADE MOULAGE + 4 H, DEUX PORTIONS OPPOSEES DANS UN FROMAGE ONT ETE PRELEVEES

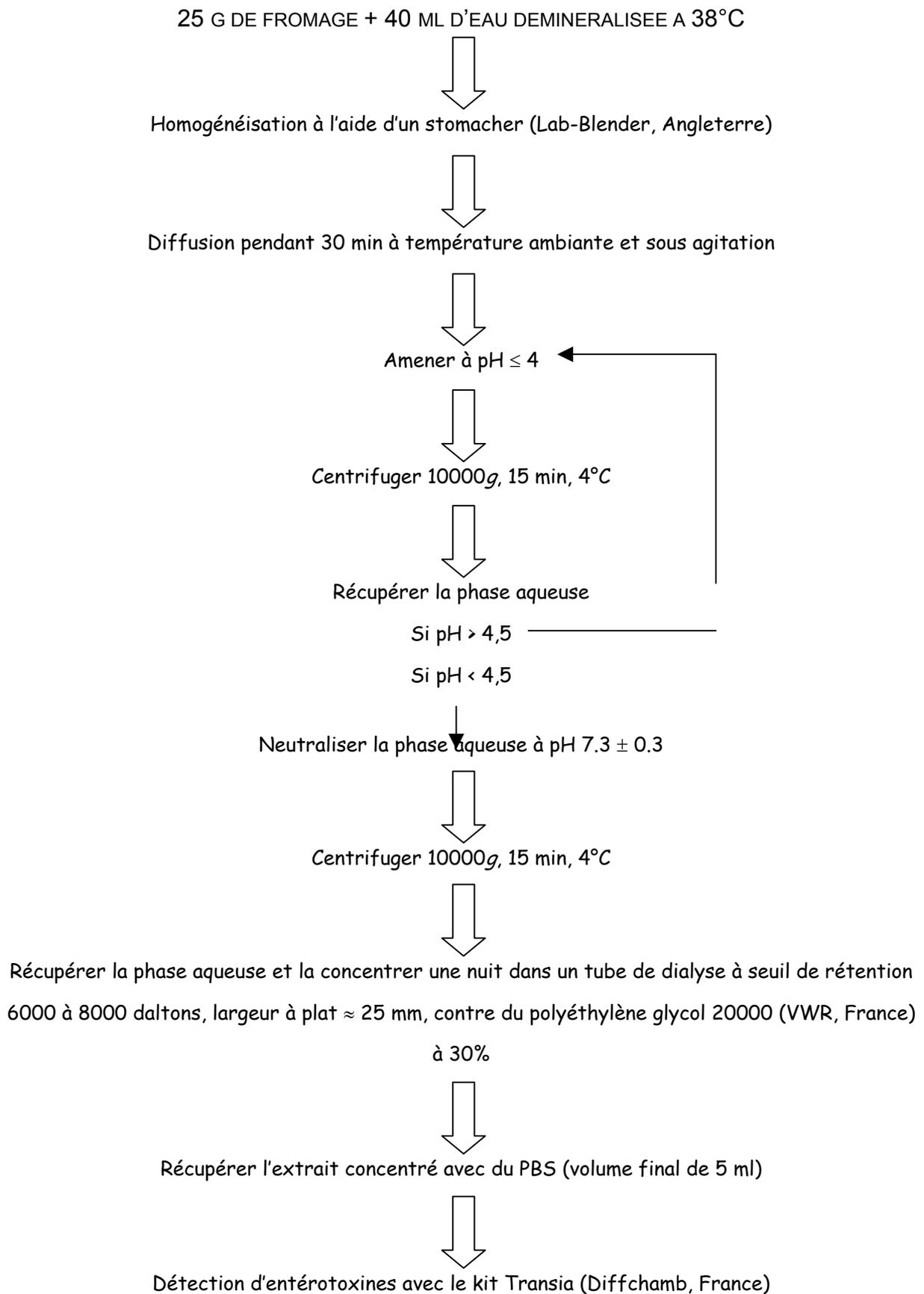


Figure 5 : schéma de préparation des échantillons de fromages et de l'extraction d'entérotoxines par dialyse/concentration.

POUR LES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES, LES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES ET L'EXTRACTION DES ENTEROTOXINES. POUR LES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES, 10 G DE FROMAGE ONT ETE PESES ET DILUES AU 1/10^{EME} DANS 90 ML DE TRI-SODIUM CITRATE A 2% (P/P, VWR, FRANCE). LE MELANGE A ETE HOMOGENEISE PENDANT 10 MIN A L'AIDE D'UN STOMACHER (LAB-BLENDER, ANGLETERRE). LES MILIEUX DE CULTURE UTILISES SONT PRESENTES DANS LE TABLEAU XV.

ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

PH : L'EVOLUTION DU PH DES FROMAGES (PH METRE METTLER TOLEDO 2400) A ETE SUIVIE AU COURS DE LA FABRICATION A DIVERS STADES : LAIT DE DEPART ; LAIT EN CUVE ; EMPRESURAGE ; MOULAGE ; MOULAGE + 1 H ; MOULAGE + 3 H ; MOULAGE + 4 H ; J+1 (AVANT SALAGE). ET ENSUITE, AU COURS DE L'AFFINAGE A J+3 ET A J+15.

EXTRAIT SEC : L'EXTRAIT SEC A ETE REALISE AVEC UNE METHODE BASEE SUR LA NORME FIL A4, 1982, AUX STADES J+1 ET J+15.

MATIERE GRASSE : LA TENEUR EN MATIERE GRASSE (METHODE BUTYROMETRIQUE DE HEISS, 1961) A ETE DETERMINEE AUX STADES J+1 ET J+15.

NaCl : LA TENEUR EN CHLORURE DES FROMAGES A ETE DETERMINE AU STADE J+15 SEULEMENT, A L'AIDE D'UN CHLORUREMETRE (CORNING 926), ETALONNE SELON LA METHODE DE DETERMINATION DES CHLORURES BASEE SUR LA NORME FIL 17A (1972).

PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS LE FROMAGE MODELE

LA RECHERCHE D'ENTEROTOXINES A ETE EFFECTUEE A J+3. EN CAS DE PRESENCE D'ENTEROTOXINES A CE STADE, UNE RECHERCHE PLUS EN AMONT A ETE EFFECTUEE AFIN DE VOIR A QUEL STADE A ETE PRODUITE L'ENTEROTOXINE. EN CAS D'ABSENCE D'ENTEROTOXINE A J+3, UNE RECHERCHE A ETE EFFECTUEE A J+15.

LES ECHANTILLONS DE FROMAGES NECESSAIRES POUR LA RECHERCHE D'ENTEROTOXINES ONT ETE CONGELES A -30°C EN ATTENDANT L'EXTRACTION.

L'EXTRACTION DES ENTEROTOXINES A ETE EFFECTUEE AU MOYEN DE LA METHODE OFFICIELLE DE L'AFSSA (ANONYME, 1999) QUI COMPORTE UNE PHASE DE DIALYSE/CONCENTRATION ET QUI PRECONISE PAR LA SUITE, L'UTILISATION DU KIT TRANSIA. LE SCHEMA DE PREPARATION DES ECHANTILLONS (FROMAGES) EST PRESENTE CI-CONTRE (FIGURE 5).

TABLEAU XVI : DEROULEMENT DES FABRICATIONS DES FROMAGES MODELES DE TYPE CANTAL.

	Semaine 1		Semaine 2		Semaine 3	
	<i>Jour 1</i>	<i>Jour 2</i>	<i>Jour 3</i>	<i>Jour 4</i>	<i>Jour 5</i>	<i>Jour 6</i>
Cuve 1	Isolat A	Isolat A	Isolat B	Isolat B	Isolat C	Isolat C
	Bas	Haut	Bas	Haut	Bas	Haut
Cuve 2	Isolat A	Isolat A	Isolat B	Isolat B	Isolat C	Isolat C
	Bas	Haut	Bas	Haut	Bas	Haut
Cuve 3	Isolat A	Isolat A	Isolat B	Isolat B	Isolat C	Isolat C
	Bas	Haut	Bas	Haut	Bas	Haut

Isolat A, Isolat B et Isolat C : trois Isolats de *S. aureus* producteurs d'entérotoxines dans le fromage modèle. Niveau « bas » = 100 ufc/ml ; Niveau « haut » = 2000 ufc/ml.

TABLEAU XVII : DEROULEMENT DES FABRICATIONS DES FROMAGES MODELES DE TYPE TOMME DE SAVOIE ET DE TYPE REBLOCHON.

	<i>Jour 1</i>	<i>Jour 2</i>	<i>Jour 3</i>	<i>Jour 4</i>	<i>Jour 5</i>
Cuve 1	Isolat A	Isolat C	Isolat B	Isolat A	Isolat C
	Bas	Bas	Bas	Bas	Bas
Cuve 2	Isolat A	Isolat C	Isolat B	Isolat A	Isolat C
	Haut	Haut	Haut	Haut	Haut
Cuve 3	Isolat B	Isolat A	Isolat C	Isolat B	
	Bas	Bas	Bas	Bas	
Cuve 4	Isolat B	Isolat A	Isolat C	Isolat B	
	Haut	Haut	Haut	Haut	

Isolat A, Isolat B et Isolat C : trois Isolats de *S. aureus* producteurs d'entérotoxines dans le fromage modèle. Niveau « bas » = 100 ufc/ml ; Niveau « haut » 2000 ufc/ml ; fabrications cuves 1 et 2 le matin ; fabrications cuves 3 et 4 l'après-midi.

L'EXTRAIT CONCENTRE OBTENU A ETE ENSUITE CONGELE DANS DES TUBES A HEMOLYSE EN VERRE, EN ATTENDANT LA DETECTION DES ENTEROTOXINES AVEC LE KIT TRANSIA. LES ECHANTILLONS POSITIFS AVEC LE KIT TRANSIA ONT ETE ENSUITE TESTES AVEC LE KIT OXOID. LES KITS ONT ETE UTILISES SELON LES INSTRUCTIONS DES FABRICANTS.

SUIVI DES ISOLATS DE *S. AUREUS* PAR SPECTROSCOPIE IRTF

POUR VERIFIER LA PRESENCE DES ISOLATS DE *S. AUREUS*, ENSEMENCES DANS LE LAIT ET DANS LES FROMAGES MODELES, LES COLONIES ISOLEES SUR BOITES BP-RPF ONT ETE ANALYSEES PAR SPECTROSCOPIE IRTF.

AU STADE J+1 (Fd), 10 COLONIES TYPIQUES SUR BP-RPF ONT ETE ISOLEES SUR BHI (20 H A 37°C) AVANT D'ETRE CONGELEES DANS DU BHI ET DU GLYCEROL 50% A -30°C. LA PURETE DES ISOLATS A ETE VERIFIEE SUR MILIEU PCA GELOSE (48 H A 37°C). LES ISOLATS ONT ETE PREPARES ET ANALYSES COMME DECRIT DANS LA SECTION 2.4.

FABRICATIONS DES FROMAGES SIMULANT TROIS TECHNOLOGIES TRADITIONNELLES

POUR CETTE PARTIE DU TRAVAIL, TROIS FROMAGES TRADITIONNELS ONT ETE CHOISIS POUR TESTER LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES AU COURS DE LA FABRICATION ET DE L'AFFINAGE. LES TROIS TECHNOLOGIES SONT PRESENTEES PAR LA SUITE. POUR CHAQUE MODELE, DU LAIT MICROFILTRÉ, DONT LA CREME A ETE PASTEURISEE, A ETE UTILISE. TROIS ISOLATS DE *S. AUREUS* PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES DANS LE FROMAGE MODELE ONT ETE SELECTIONNES POUR ETRE TESTES.

PROTOCOLE DE FABRICATION

POUR CHAQUE TYPE DE TECHNOLOGIE (TYPE CANTAL, TYPE TOMME DE SAVOIE ET TYPE REBLOCHON), LE PLAN EXPERIMENTAL SUIVANT A ETE UTILISE :

- Trois isolats de *S. aureus* producteurs d'entérotoxines dans le fromage modèle
- Deux niveaux d'ensemencement
 - 100 ufc/ml (niveau bas)
 - 2000 ufc/ml (niveau haut)
- Trois essais par niveau et par isolat (total = 18 fromages par technologie)

LES ISOLATS ONT ETE ENSEMENCES A DEUX NIVEAUX DANS LE LAIT DE FABRICATION. UN NIVEAU « BAS » A 100 UFC/ML DE LAIT CORRESPONDANT AU NIVEAU RECHERCHE PAR LES PROFESSIONNELS ET UN NIVEAU « HAUT » DE 2000 UFC/ML DE LAIT CORRESPONDANT AU MAXIMUM DE LA NORME ADMISE PAR LA REGLEMENTATION.

LES FROMAGES MODELES DE TYPE TOMME DE SAVOIE ET DE TYPE REBLOCHON ONT ETE FABRIQUES, AU MOIS DE NOVEMBRE 2002, A L'ITFF DE LA ROCHE-SUR-FORON ET LE MODELE DE TYPE CANTAL, EN JANVIER 2003, A LA FROMAGERIE EXPERIMENTALE DE L'INRA DE POLIGNY. LE DEROULEMENT DES FABRICATIONS SUR LES DEUX SITES EST PRESENTE DANS LES TABLEAUX XVI ET XVII.

POUR SURMONTER LE PROBLEME DE CONTAMINATIONS CROISEES DANS LES FROMAGES DE TYPE CANTAL, NOTAMMENT LIEES AU MATERIEL DE BROYAGE, LES TROIS ESSAIS POUR UN ISOLAT ET UN NIVEAU ONT ETE EFFECTUES LE MEME JOUR. POUR LES FROMAGES DE TYPE TOMME DE SAVOIE ET DE TYPE REBLOCHON, LE DISPOSITIF EXPERIMENTAL ETAIT COMPOSE DE BLOCS DE DEUX CUVES ENSEMENCEES AVEC LE MEME ISOLAT DE *S. AUREUS*, LA PREMIERE CUVE FABRIQUEE ETANT CELLE ENSEMENCEE AVEC LE NIVEAU LE PLUS BAS.

INOCULUM DE *S. AUREUS*

L'INOCULUM A ETE PREPARE SELON LE PROTOCOLE DECRIT DANS LA SECTION 3.2. UN VOLUME DONNE DE CETTE SUSPENSION BACTERIENNE A ETE ENSEMENCE DANS LE LAIT POUR UN NIVEAU D'ENSEMENCEMENT DE 100 UFC/ML OU DE 2000 UFC/ML. LES MEMES ISOLATS ET LE MEME PROTOCOLE ONT ETE UTILISES SUR LES DEUX SITES POUR LES TROIS TECHNOLOGIES.

FROMAGE DE TYPE CANTAL

LE LAIT A ETE PREPARE (MICROFILTRATION ET PASTEURISATION) COMME DECRIT POUR LE FROMAGE MODELE DANS LA SECTION 3.2. LES FABRICATIONS SE SONT DEROULEES DANS DES CUVES DE 40L (1 FROMAGE PAR CUVE). *S. AUREUS* A ETE AJOUTE AU LAIT DE FABRICATION 5 MIN AVANT L'EMPRESURAGE, SOIT A UN NIVEAU INITIAL DE 100 UFC/ML, SOIT A UN NIVEAU DE 2000 UFC/ML. LE SCHEMA DE FABRICATION EST PRESENTE DANS LA FIGURE 6.

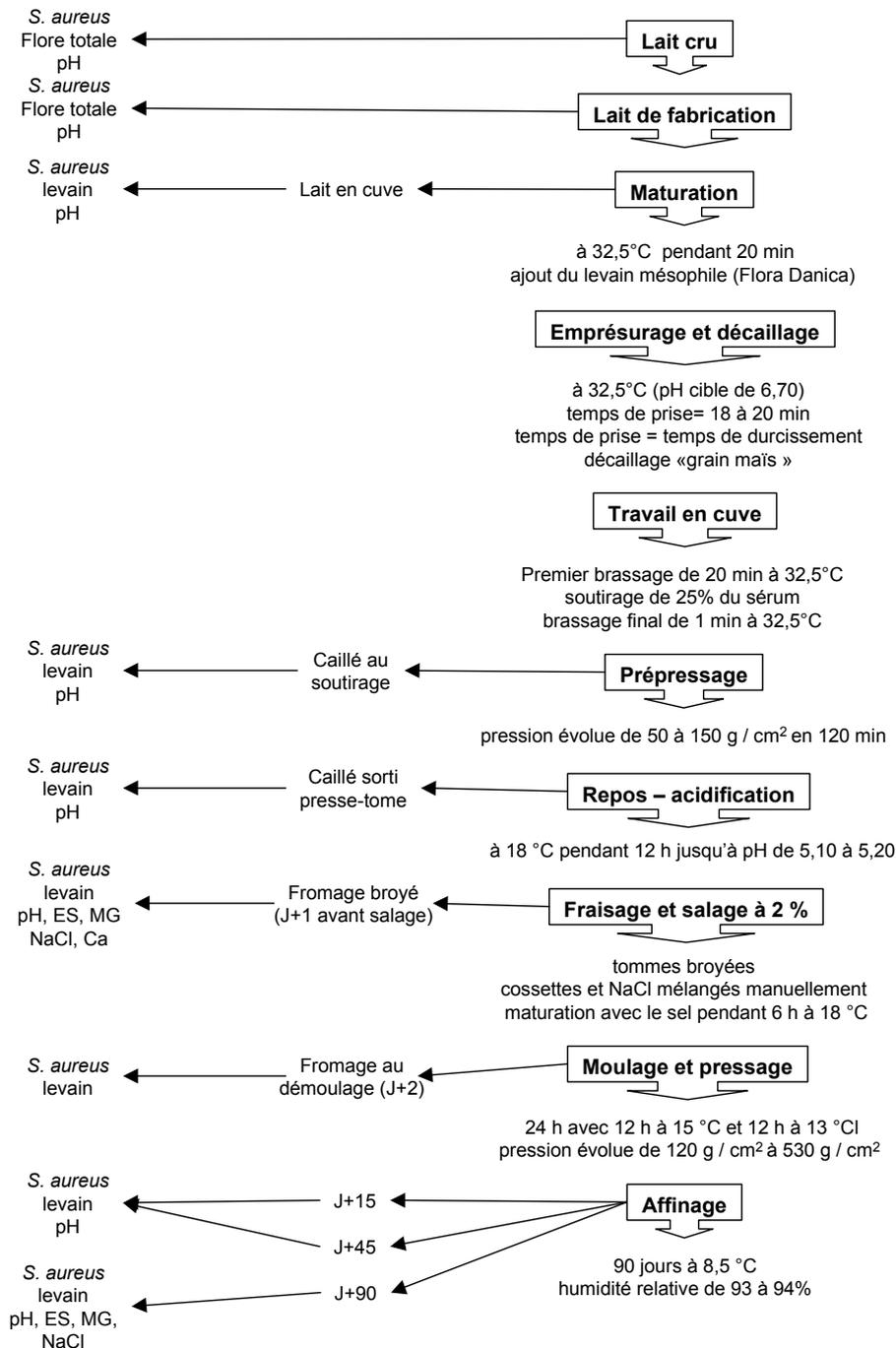


Figure 6 : schéma de fabrication du fromage modèle de type Cantal et calendrier de prélèvements pour les analyses microbiologiques et physico-chimiques.

FROMAGE DE TYPE TOMME DE SAVOIE

LE LAIT ETAIT RECEPTIONNE ET STOCKE A 4°C PENDANT 4 A 6 H. LE LAIT ETAIT ENSUITE ECREME PUIS MICROFILTRÉ A 40°C. LA CREME PASTEURISEE ETAIT AJOUTEE POUR UNE STANDARDISATION A 28 - 29 G/L DE MATIERES GRASSES ET LE MELANGE STOCKE A 6°C MAXIMUM. LES FABRICATIONS SE SONT DERouleES, DANS DES CUVES DE 120 L (SOIT 8 FROMAGES), A RAISON DE 4 ESSAIS PAR JOUR PENDANT CINQ JOURS CONSECUTIFS. LES ISOLATS DE *S. AUREUS* ONT ETE ENSEMENCES EN CUVE 30 MIN AVANT L'EMPRESURAGE. LE SCHEMA DE FABRICATION EST PRESENTE DANS LA FIGURE 7.

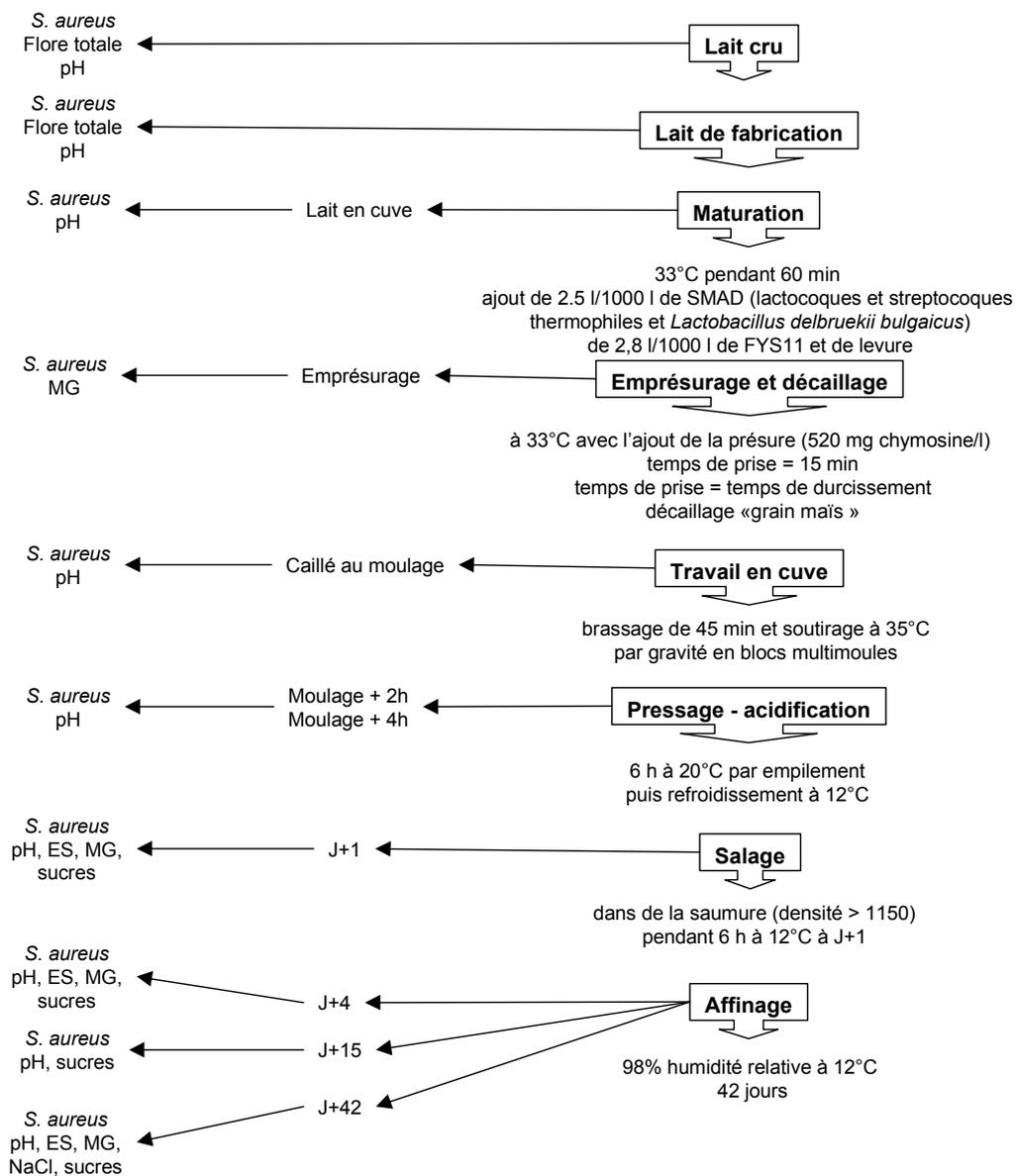


Figure 7 : schéma de fabrication du fromage modèle de type Tomme de Savoie et calendrier de prélèvements pour les analyses microbiologiques et physico-chimiques. ES = extrait sec ; MG = matière grasse ; sucres = lactose, galactose.

FROMAGE DE TYPE REBLOCHON

LE LAIT ETAIT RECEPTIONNE ET STOCKE A 4°C PENDANT 4 A 6 H. LE LAIT ETAIT ENSUITE ECREME PUIS MICROFILTRÉ A 40°C. LA CREME PASTEURISEE A ETE AJOUTEE ET LE MELANGE STOCKE A 6°C MAXIMUM. LES FABRICATIONS SE SONT DERouleES A RAISON DE 4 ESSAIS PAR JOUR PENDANT CINQ JOURS CONSECUTIFS DANS DES CUVES DE 60 L (SOIT 12 FROMAGES). LES ISOLATS DE *S. AUREUS* ONT ETE ENSEMENCES EN CUVE 30 MIN AVANT L'EMPRESURAGE. LE SCHEMA DE FABRICATION EST PRESENTE DANS LA FIGURE 8.

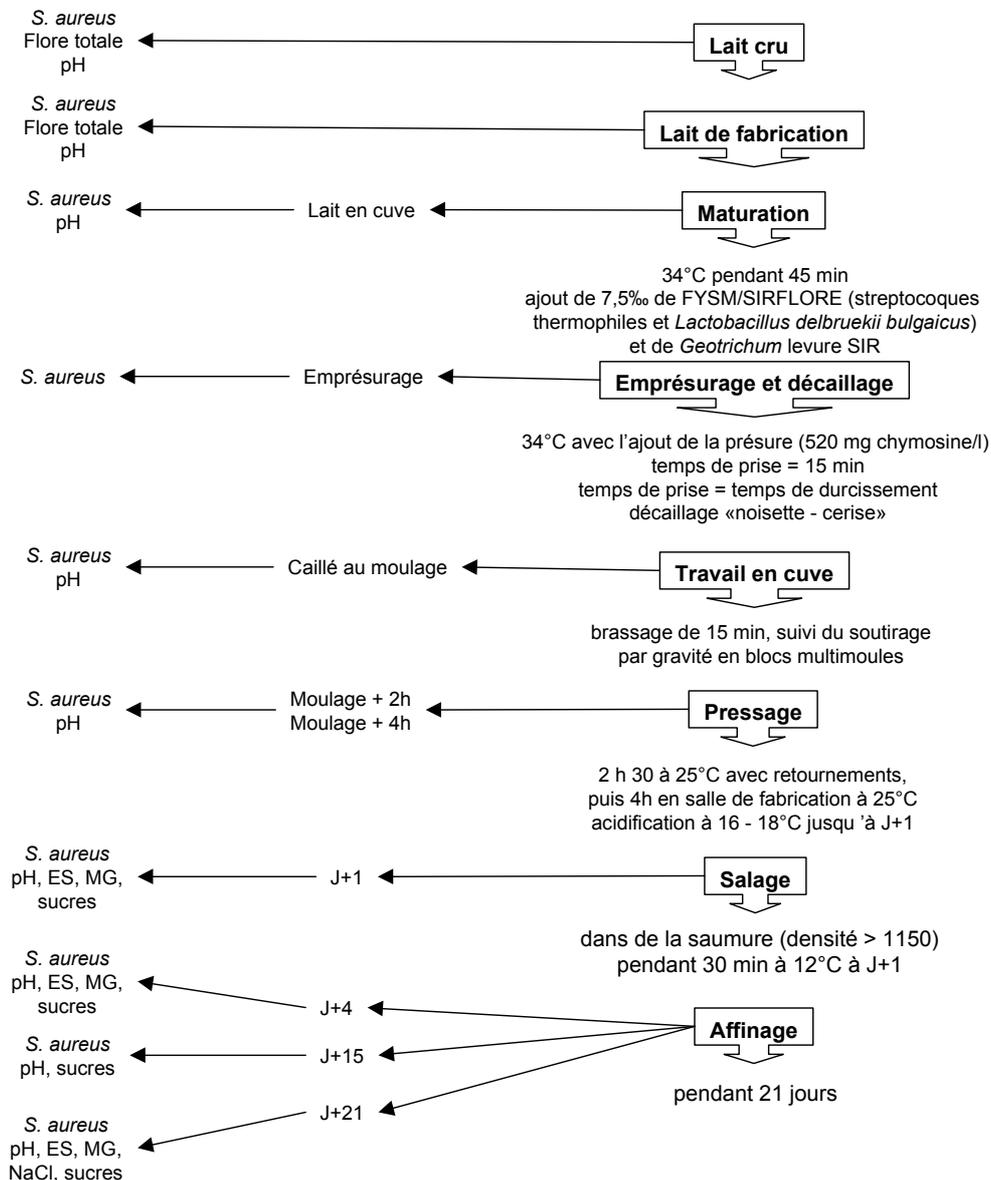


Figure 8 : schéma de fabrication du fromage modèle de type Reblochon et calendrier de prélèvements pour les analyses microbiologiques et physico-chimiques. ES = extrait sec ; MG = matière grasse ; sucres = lactose, galactose.

ANALYSES MICROBIOLOGIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES

SELON LES MODELES, LES STADES DE PRELEVEMENTS ET LES ANALYSES REALISEES VARIAIENT. LES ANALYSES DES FROMAGES DE TYPE TOMME DE SAVOIE ET DE TYPE

REBLOCHON, EFFECTUEES PAR LE LABORATOIRE D'ANALYSES ALIMENTAIRES ET DE RECHERCHES FROMAGERES, SONT PRESENTEES DANS LES FIGURES 7 ET 8. LES ANALYSES DES FROMAGES DE TYPE CANTAL, REALISEES A L'INRA DE POLIGNY, SONT PRESENTEES DANS LA FIGURE 6.

Lait

LE LAIT ETAIT PRELEVE DANS UN FLACON A VIS STERILE ET PREPARE COMME DECRIT PRECEDEMMENT DANS LA SECTION 3.5.1.

Fromage de type Cantal

LE FROMAGE AUX STADES CAILLE AU SOUTIRAGE, CAILLE SORTI PRESSE-TOMME ET FROMAGE BROYE A ETE PRELEVE, AVEC UNE CUILLERE STERILE, DANS UN FLACON A VIS STERILE. AUX STADES J+2 (AU DEMOULAGE), J+15, J+45 ET J+90, APPROXIMATIVEMENT 40 G DE FROMAGE ONT ETE PRELEVES AVEC UNE SONDE A FROMAGE STERILE POUR CHAQUE FROMAGE, COMME INDIQUE DANS LA FIGURE 9 CI-DESSOUS.

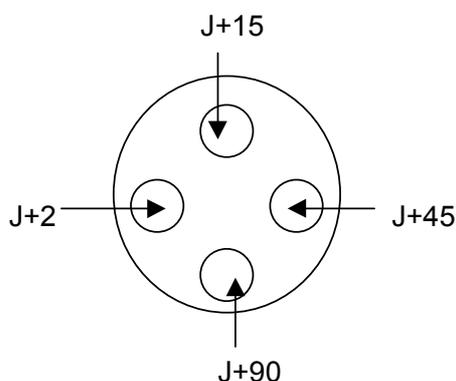


Figure 9 : prélèvement des échantillons sur les fromages de type Cantal

Fromages de type Tomme de Savoie et Reblochon

LE FROMAGE AUX STADES CAILLE, MOULAGE, MOULAGE + 2H ET MOULAGE + 4H ONT ETE PRELEVES DANS DES FLACONS STERILES. A J+1, J+4 ET J+21 LES ECHANTILLONS ONT ETE PRELEVES AU CENTRE DU FROMAGE, A RAISON D'UN FROMAGE PAR ECHANTILLON.

TOUS LES FROMAGES ONT ETE ENSUITE PREPARES COMME DECRIT DANS LA SECTION 3.5.2. LES MILIEUX DE DENOMBREMENT DES CULTURES BACTERIOLOGIQUES DES FROMAGES DE TYPE CANTAL SONT INDIQUES DANS LE TABLEAU XVIII.

TABLEAU XVIII : LISTE DES MILIEUX GELOSES UTILISES POUR LE SUIVI DES CULTURES BACTERIOLOGIQUES DES FROMAGES DE TYPE CANTAL.

	Milieux de culture	Conditions d'utilisation
<i>S. aureus</i>	BP-RPF	2 jours à 37°C en aérobiose
Flore aérobic à 30°C	PCA	3 jours à 30°C en aérobiose
Lactocoques	Milieu 17 lactosé	2 jours à 20°C en aérobiose

LE PH, LA MATIERE GRASSE ET LE SEL ONT ETE ANALYSES SELON LES METHODES DECRITES DANS LA SECTION 3.6. LES SUCRES (LE LACTOSE ET LE GALACTOSE) ONT EGALEMENT ETE ANALYSES DANS LES FROMAGES DE TYPE TOMME DE SAVOIE ET DE TYPE REBLOCHON A L'AIDE DE KITS ENZYMATIQUES (ROCHE DIAGNOSTIC, BOEHRINGER MANHEIM, MEYLAN, FRANCE).

PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS LES TROIS TECHNOLOGIES

LES RECHERCHES D'ENTEROTOXINES ONT ETE EFFECTUEES A J+2 POUR LE TYPE CANTAL ET A J+4 POUR LE TYPE TOMME DE SAVOIE ET LE TYPE REBLOCHON. EN CAS DE PRESENCE D'ENTEROTOXINES A CE STADE, UNE RECHERCHE PLUS EN AMONT A ETE EFFECTUEE AFIN DE VOIR A QUEL STADE A ETE PRODUITE L'ENTEROTOXINE. EN CAS D'ABSENCE D'ENTEROTOXINE A J+2 OU A J+4, UNE RECHERCHE A ETE EFFECTUEE A J+45 POUR LE CANTAL, A J+42 POUR LA TOMME DE SAVOIE ET A J+21 POUR LE REBLOCHON. LES ECHANTILLONS DE FROMAGES NECESSAIRES POUR LA RECHERCHE D'ENTEROTOXINES ETAIENT CONGELES A -30°C EN ATTENDANT L'EXTRACTION. COMME AVEC LE FROMAGE MODELE A PATE PRESSEE NON CUITE, L'EXTRACTION DES ENTEROTOXINES A ETE EFFECTUEE AVEC LA METHODE DITE DIALYSE/CONCENTRATION. L'EXTRAIT OBTENU ETAIT CONGELE EN ATTENDANT L'ANALYSE AVEC LE KIT TRANSIA. LES ECHANTILLONS POSITIFS AVEC LE KIT TRANSIA ONT ETE ENSUITE TESTES AVEC LE KIT OXOID.

POTENTIEL D'OXYDOREDUCTION - CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET PRODUCTION D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*

COMPTE TENU DU PEU DE DONNEES SUR LE POTENTIEL REDOX ET *S. AUREUS*, CETTE ETUDE VISAIT A EVALUER L'EFFET DU POTENTIEL REDOX SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS DU MILIEU SYNTHETIQUE ET DU LAIT. POUR METTRE EN EVIDENCE UN QUELCONQUE EFFET DU REDOX, DEUX CONDITIONS DE REDOX ONT ETE RETENUES : UNE DITE « OXYDANTE » AVEC AJOUT D'HEXACYANOFERRATE DE POTASSIUM, UNE DITE « REDUCTRICE » AVEC AJOUT DE DITHIOTHREITOL, CECI PAR RAPPORT A UN TEMOIN DANS LEQUEL AUCUNE MOLECULE N'ETAIT AJOUTEE.

CETTE PARTIE SE DIVISAIT EN QUATRE ETAPES :

- Evaluation de la croissance de *S. aureus* pendant 24h à 37°C dans du BHI et du lait selon l'inoculum de départ,
- Evaluation de la toxicité des molécules (hexacyanoferrate de Potassium et dithiothreitol), utilisées pour créer les conditions redox, sur *S. aureus*,
- Evaluation de l'effet du potentiel redox sur la croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxines dans le milieu BHI,
- Evaluation de l'effet du potentiel redox sur la croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxines dans le lait.

PREPARATION DES ISOLATS DE *S. AUREUS*

UNE PREMIERE ETAPE A ETE REALISEE CONCERNANT LA CROISSANCE DES TROIS ISOLATS DE *S. AUREUS* RETENUS, DANS DU BHI ET DU LAIT, POUR SUIVRE LEUR EVOLUTION AU COURS DE 24 H A 37°C AVEC DEUX NIVEAUX D'ENSEMENCEMENT DE DEPART : 10^4 UFC/ML ET 10^5 UFC/ML. LES ISOLATS ONT ETE PREPARES SELON LE PROTOCOLE DECRIT DANS LA SECTION 3.2 POUR L'INOCULUM DE DEPART. UNE PRECULTURE DES ISOLATS A ETE REALISEE (20 H A 37°C) DANS 5 ML DE BHI POUR LA CROISSANCE SUR BHI ET DANS 5 ML DE BHI + 1% POUDRE DE LAIT POUR LA CROISSANCE SUR LAIT. COMME DECRIT DANS LA SECTION 3.2 POUR L'INOCULATION DES ISOLATS DANS LES FROMAGES MODELES, LES CULTURES ONT ETE CENTRIFUGEES ET LE CULOT REMIS EN SUSPENSION DANS 1 ML D'EAU PEPTONNEE. UNE QUANTITE DONNEE DE LA SUSPENSION BACTERIENNE A ETE ENSUITE ENSEMENCEE DANS 200 ML DE BHI ET INCUBEE 24 H A 37°C. LA CROISSANCE A ETE SUIVIE, DES L'ENSEMENCEMENT, TOUTES LES HEURES JUSQU'A 8 H PUIS A 24 H. UN ML DE MILIEU A ETE PRELEVE A CHAQUE STADE D'ANALYSE ET DES DILUTIONS SUCCESSIVES ONT ETE REALISEES DANS 9 ML D'EAU PEPTONNEE ET ENSEMENCEES SUR DU BHI GELOSE, COMME DECRIT DANS LA SECTION 3.2. LES BOITES ETAIENT INCUBEES 2 JOURS A 37°C.

TEST DE LA TOXICITE DES MOLECULES REDUCTRICES ET OXYDANTES

POUR CREER LES DIFFERENTES CONDITIONS REDOX, DEUX MOLECULES ONT ETE RETENUES, L'HEXACYANOFERRATE DE POTASSIUM ($K_3Fe(CN)_6$, SIGMA, FRANCE) COMME OXYDANT ET LE DITHIOTHREITOL (DTT, $C_4H_{10}O_2S_2$, VWR, FRANCE) COMME REDUCTEUR. LEUR TOXICITE ENVERS LES TROIS ISOLATS DE *S. AUREUS* A ETE PREALABLEMENT VERIFIEE. LA QUANTITE DE REDUCTEUR OU D'OXYDANT CHOISIE POUR L'EXPERIENCE (2ML D'UNE SOLUTION DE 200 G/L D'OXYDANT ET 2 ML D'UNE SOLUTION DE 50 G/L DU REDUCTEUR) A ETE MISE DANS 200 ML DE BHI, LE POTENTIEL REDOX A ETE ENSUITE AJUSTE, AVEC L'OXYDANT OU LE REDUCTEUR RESPECTIVEMENT, AU POTENTIEL REDOX DU BHI STANDARD (TEMOIN). LA CROISSANCE DES ISOLATS DE *S. AUREUS*, AVEC UN INOCULUM DE DEPART DE 10^5 UFC/ML, A ETE SUIVIE AU COURS DE 24 H A 37°C AVEC DES PRELEVEMENTS, DES L'ENSEMENCEMENT, TOUTES LES HEURES JUSQU'A 8 H ET A 24 H.

ETALONNAGE ET NETTOYAGE DES SONDAS PH ET REDOX

LES SONDAS PH (INLAB[®]417, METTLER-TOLEDO, URDORF, SUISSE) ONT ETE ETALONNEES DE FAÇON CLASSIQUE AVEC DES SOLUTIONS TAMPON STANDARD PH 7 ET PH 4 (RADIOMETER ANALYTICAL S.A., FRANCE), ET NETTOYEEES AVEC DE L'ALCOOL.

APRES AVOIR ETE TRAITEES THERMIQUEMENT AU BAIN-MARIE A 85°C PENDANT 30 MIN, LES SONDAS REDOX (Pt4805-DXK-S8/S120, METTLER-TOLEDO) ONT ETE FROTTEES AVEC DE LA POUDRE D'OXYDE D'ALUMINIUM SUR DU PAPIER LEGEREMENT HUMIDIFIE, PUIS RINCEES AVEC DE L'ALCOOL. LES SONDAS ONT ETE ETALONNEES DANS DE L'EAU DU ROBINET. QUAND LES SONDAS DONNAIENT TOUTES LA MEME REPONSE, ELLES ETAIENT CONSIDEREES COMME ETALONNEES. LA REPONSE DEVAIT ETRE DE $300\text{ mV} \pm 30$.

EVALUATION DE L'EFFET DU POTENTIEL REDOX SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES

Sur milieu synthétique

L'EFFET DU POTENTIEL REDOX A ETE TESTE SUR TROIS ISOLATS DE *S. AUREUS* : PRODUCTEURS DE SEA OU DE SEC *IN VITRO*, ET UN NON PRODUCTEUR. EN PLUS DU TEMOIN, DEUX CONDITIONS DE REDOX ONT ETE UTILISEES : REDUCTRICES ET OXYDANTES. LE PROTOCOLE EXPERIMENTAL EST PRESENTE DANS LE TABLEAU XIX.

TROIS FLACONS DE 200 ML ONT ETE PREPARES POUR CHAQUE CONDITION, AFIN DE SUIVRE LE POTENTIEL REDOX, LE PH ET LA CROISSANCE DE *S. AUREUS*. TROIS ESSAIS ONT ETE REALISES PAR CONDITION (DEUX POUR LE TEMOIN) A RAISON DE TROIS PAR JOUR, DEUX JOURS PAR SEMAINE (2 REDUCTEURS + 1 OXYDANT + 1 TEMOIN, PUIS 1 REDUCTEUR + 2 OXYDANTS + 1 TEMOIN) ET UN ISOLAT PAR SEMAINE. LES ISOLATS ONT ETE SUIVIS PENDANT 24H DANS DU BOUILLON BHI A 37°C.

POUR LE SUIVI DE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS*, DES PRELEVEMENTS ONT ETE EFFECTUES, DES L'ENSEMENCEMENT, TOUTES LES HEURES JUSQU'A 8 H ET A 24 H. POUR LA RECHERCHE D'ENTEROTOXINES, LES PRELEVEMENTS ONT ETE EFFECTUES, DES L'ENSEMENCEMENT, TOUTES LES DEUX HEURES JUSQU'A 8 H ET A 24 H.

Tableau XIX : protocole d'expérimentation pour le suivi du potentiel redox avec trois isolats de *S. aureus*.

Condition	Semaine 1		Semaine 2		Semaine 3	
	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6
	Isolat 1A	Isolat 1A	Isolat 3C	Isolat 3C	Isolat 5N	Isolat 5N
1	Oxydant	Oxydant	Oxydant	Oxydant	Oxydant	Oxydant
2	Réducteur	Oxydant	Réducteur	Oxydant	Réducteur	Oxydant
3	Réducteur	Réducteur	Réducteur	Réducteur	Réducteur	Réducteur
4	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin

Isolat 1A : producteur de SEA ; Isolat 3C : producteur de SEC ; Isolat 5N : non producteur ; trois flacons de mesure par condition (redox, pH et croissance).

Sur lait

UNE EVALUATION DE L'EFFET DU REDOX SUR LA CROISSANCE D'UN ISOLAT DE *S. AUREUS* PRODUCTEUR SEA *IN VITRO* ET SUR LA PRODUCTION DE CETTE ENTEROTOXINE, A ETE REALISEE SUR LAIT UHT ECREME. LES MEME PARAMETRES D'EXPERIMENTATION ET DE PRELEVEMENTS ONT ETE UTILISES.

Suivi du pH et du redox

LE PH ET LE REDOX ONT ETE SUIVIS EN CONTINU A L'AIDE DES SONDAS, AVEC UNE MESURE TOUTES LES 5 MIN. LES SONDAS ETAIENT RELIEES A UN APPAREIL DE MESURE A PLUSIEURS VOIES (CONSORT P507, BIOBLOCK, FRANCE), ET LE POTENTIEL REDOX ET LE PH ONT ETE SUIVIS AVEC LE LOGICIEL ELIT ELECTROCHEMICAL SOFTWARE FOR 8 CHANNEL ELECTRODE INTERFACE 8808 (VERSION 2,4 84SA, CHEMPUTRIX). LE LOGICIEL DE MESURE DU

POTENTIEL REDOX NE CORRIGEAIT PAS AUTOMATIQUEMENT LA TEMPERATURE. AINSI, LES MESURES BRUTES ONT ETE CORRIGEEES EN ACCORD AVEC L'ELECTRODE DE REFERENCE ET LA TEMPERATURE DE MESURE. LA VALEUR DE 198,5 mV A ETE AJOUTEE A CHAQUE MESURE. CETTE VALEUR A ETE CALCULEE A PARTIR DE LA FORMULE DONNEE PAR LE FABRICANT DES SONDAS REDOX :

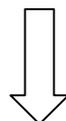
$$E_{\text{CORRIGE}} = E_{\text{MESURE}} + 223,78 - (0,614684 \times T) - (0,001846 \times T^2)$$

OU E EST LE POTENTIEL REDOX EN mV ET T EST LA TEMPERATURE EN °C.

5 ml de lait prélevé



centrifugation 10000g, 15 min à 4°C



Surnageant récupéré et pH ajusté à < 4,5

centrifugation 10000g, 15 min à 4°C

Surnageant récupéré et pH neutralisé à 7,3 ± 0,3



centrifugation 10000g, 15 min à 4°C

Surnageant récupéré, aliquoté en tubes ependorf et congelé à -30°C

Figure 10 : schéma d'extraction des entérotoxines des échantillons du lait

EGALEMENT, CES MESURES NE PRENAIENT PAS EN COMPTE LA DEPENDANCE DU PH VIS-A-VIS DU POTENTIEL D'OXYDORÉDUCTION. SELON L'EQUATION DE NERNST AVEC L'ELECTRODE A HYDROGENE, A PH 0 LE POTENTIEL REDOX EST DE 0 mV. POUR CHAQUE AUGMENTATION D'UNE UNITE DE PH, LE POTENTIEL REDOX DIMINUE DE 59 mV. IL ETAIT ALORS NECESSAIRE DE CALCULER CETTE VALEUR PAR RAPPORT AU MILIEU UTILISE ET A PH 7. LE COEFFICIENT A ETE CALCULE EN MESURANT LE POTENTIEL REDOX DANS DU BHI ET DANS DU LAIT EN AJUSTANT LE PH AVEC DE L'ACIDE LACTIQUE DILUE A 1/10^{IEME}.

$$E_{H7} = E_{CORRIGE} - Y \cdot (7-PH)$$

OU Y = 51,3 DANS LE BHI ET Y = 59,7 DANS LE LAIT. CES VALEURS SONT LES MOYENNES DE DEUX ESSAIS.

EXTRACTION ET DETECTION DES ENTEROTOXINES

AU COURS DES 24 H, DES PRELEVEMENTS ONT ETE EFFECTUES A T=0, ET ENSUITE TOUTES LES DEUX HEURES, AFIN DE SUIVRE L'EVOLUTION DE LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES. L'EXTRACTION A ETE FAITE DIRECTEMENT APRES CHAQUE PRELEVEMENT, SANS DILUTION DE L'ECHANTILLON, SELON LA METHODE DECRITE DANS LA SECTION 2.2.1. L'ECHANTILLON A ETE CENTRIFUGE ET LE SURNAGEANT PRELEVE ET STERILISE PAR FILTRATION. LE SURNAGEANT A ETE ALIQUOTE EN TUBES EPENDORF A RAISON DE 100 µL/TUBE ET DE 5 TUBES PAR STADE ET CONGELE A -30°C EN ATTENDANT LA DETECTION DES ENTEROTOXINES. LES ENTEROTOXINES DANS LE LAIT ONT ETE EXTRAITES SELON LE SCHEMA DECRIT DANS LA FIGURE 10. LES EXTRAITS DE LAIT ONT ETE ALIQUOTES EN TUBES EPENDORF A RAISON D'UN ML PAR TUBE, ET CONGELES A -30°C.

LA DETECTION DES ENTEROTOXINES A ETE REALISEE AVEC LE KIT TRANSIA SELON LA METHODE DECRITE DANS LA SECTION 2.2.1. LES DIFFERENCES DE QUANTITE D'ENTEROTOXINES PRODUITES POUVANT ETRE APPRECIEES PAR UNE AUGMENTATION OU UNE DIMINUTION DE LA DENSITE OPTIQUE.

TRAITEMENTS STATISTIQUES

POUR LES DONNEES MESUREES A UN TEMPS DONNE, UNE ANALYSE DE VARIANCE CLASSIQUE A ETE UTILISEE. TOUTEFOIS, UNE DES SPECIFICITES DES DONNEES QUI ONT ETE COLLECTEES ETAIT LEUR DEPENDANCE DANS LE TEMPS. LES COURBES DE CROISSANCE ONT ETE REALISEES SUR LE MEME LAIT OU LE MEME FROMAGE. DE CE FAIT, POUR ETUDIER L'EFFET DE FACTEURS SUR LA COURBE DE CROISSANCE, IL ETAIT NECESSAIRE D'UTILISER UNE METHODE QUI TIENNE COMPTE DE CETTE DEPENDANCE TEMPORELLE. CETTE METHODE EST LA METHODE DES SERIES REPETEES. LE PRINCIPE EST D'ESTIMER LES EFFETS DES FACTEURS (EFFETS FIXES) TOUT EN TENANT COMPTE DE LA DEPENDANCE TEMPORELLE (EFFET ALEATOIRE). LA METHODE EST DECRITE EN DETAIL DANS LE LIVRE DE PINHEIRO ET BATES (2000).

LES RESULTATS OBTENUS SONT PRESENTES COMME SUIT :

	Niveau1	Niveau2	Niveau3	P
Facteur1	a	b	ab	**
Poly(Temps,2)	pente ***	courbure **		***
	Niveau1*pente	Niveau2*pente	Niveau3*pente	

Facteur1*poly(Temps,2)	a	a	a	*
	Niveau1*courbure	Niveau2*courbure	Niveau3*courbure	
	b	a	ab	

FACTEUR1 INDIQUE UN FACTEUR A 3 NIVEAUX, POLY(TEMPS,2) INDIQUE QU'ON UTILISE UN POLYNOME DE DEGRE 2 POUR REPRESENTER LES COURBES, FACTEUR1*POLY(TEMPS,2) INDIQUE L'INTERACTION ENTRE LE FACTEUR1 ET LE TEMPS REPRESENTE PAR UN POLYNOME DE DEGRE 2.

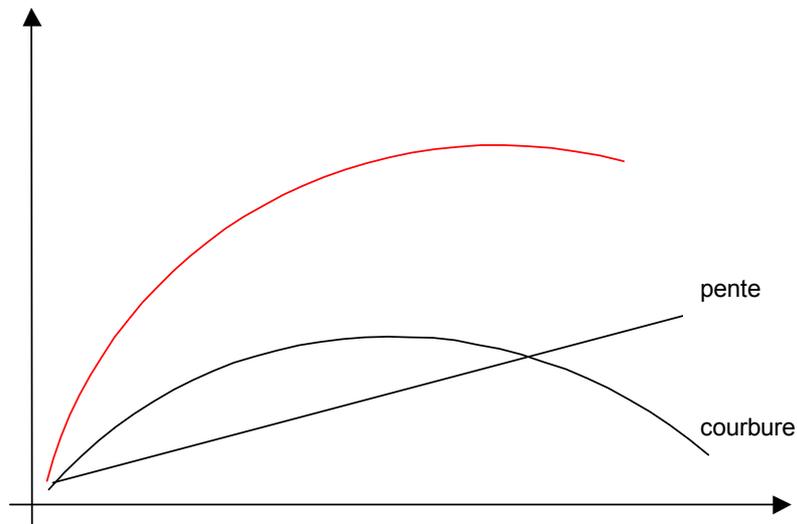


Figure 11 : composition de la courbe de croissance, décomposée en une pente et une courbure.

LA LIGNE FACTEUR1 EXPLICITE L'EFFET GLOBAL (MOYENNE PONDEREE AVEC LE TEMPS) DE CE FACTEUR. ELLE PERMET DE DIRE SI LES NIVEAUX DU FACTEUR1 ONT UN EFFET GLOBAL SUR LA REPONSE. LA LIGNE POLY(TEMPS,2) INDIQUE SI L'ENSEMBLE DES COURBES PEUT ETRE MODELISE AVEC UN POLYNOME DE DEGRE 2. LA FORME EST DECOMPOSEE EN UNE PENTE ET UNE COURBURE COMME MONTRE DANS LA FIGURE 11. L'INTERACTION FACTEUR1*POLY(TEMPS,2) INDIQUE LES DIFFERENCES DE FORME QUI EXISTENT ENTRE LES NIVEAUX DE FACTEUR. CES DIFFERENCES SONT EXPRIMEES EN DIFFERENCES DANS LA PENTE ET DANS LA COURBURE.

Résultats et Discussion

- I. **Collecte et isolement des staphylocoques à coagulase positive et caractérisation des isolats de *Staphylococcus aureus***

- II. **A - Production d'entérotoxines staphylococciques dans un fromage modèle à pâte pressée non cuite**

B - Production d'entérotoxines staphylococciques dans des fromages expérimentaux simulant trois technologies traditionnelles

- III. **Effet du potentiel d'oxydoréduction sur la croissance de *Staphylococcus aureus* et la production d'entérotoxines sur BHI et sur lait**

Résultats et Discussion – Partie I

**Collecte et isolement des staphylocoques à coagulase positive et
caractérisation des isolats de
*Staphylococcus aureus***

TABLEAU XX : DIFFERENTIATION DES ESPECES ET DES SOUS-ESPECES DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE.

<i>Staphylococcus</i> spp.	Croissance en aérobiose	Diamètre des colonies ≥ 5 mm	Pigment	Hémolyse	« Clumping factor »	Acidification	
						Maltose	D- Tréhalose
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> ssp.	-/f	-	-	+	-	+	-
<i>S. intermedius</i>	+	+	-	+	d	-/f	+
<i>S. hyicus</i>	+	+	-	-	-	-	+
<i>S. delphini</i>	+	+	-	+	-	+	-
<i>S. lutrae</i>	+	-	-	+	-	+	+
<i>S. schleiferi</i> ssp.	+	+	-	+	-	-	-

+ = 90% ou plus d'isolats positifs ; - = 90% ou plus d'isolats négatifs ; d = 11 à 89% d'isolats positifs ; -/f = réaction négative ou faible.

TABLEAU XXI : LISTE DES TESTS ET DES REACTIONS UTILISES POUR SEPARER LES ISOLATS DE *S. AUREUS* EN BIOTYPES A HUMAIN, B AVIAIRE, C BOVIN, C OVIN, D LIEVRE ET INCONNU.

Classification	Biotypes			
	A	B	C	D
Staphylokinase	+	-	-	-
Pigment	+	+	+	v-
Coagulation de plasma bovin	-	-	+	-
Bêta hémolyse	v-	v+	+	+
Croissance sur milieu cristal violet	-	v+	v	-

+ = > 80% positifs ; - = > 80% négatifs ; v = variable (v+ ou v- = prédominance positive ou négative respectivement) ; f = réaction faible. **Croissance sur cristal violet** : + = colonies blanches, jaunes ou oranges ; - = colonies bleues ou violettes.

L'OBJECTIF PRINCIPAL DE L'ETUDE ETAIT D'EVALUER L'APTITUDE DE *S. AUREUS* A PRODUIRE DES ENTEROTOXINES DANS DES CONDITIONS CONTROLEES DE FABRICATION FROMAGERE EN FONCTION DE LA DIVERSITE PHENOTYPIQUE ET GENETIQUE DES SOUCHES.

COLLECTE ET ISOLEMENT DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE

L'OBJECTIF DE CETTE ETAPE ETAIT DOUBLE. LE PREMIER OBJECTIF ETAIT DE COLLECTER, A PARTIR DE LAITS ET DE FROMAGES TRADITIONNELS, UN GRAND NOMBRE D'ISOLATS POUR AVOIR LE PLUS DE DIVERSITE POSSIBLE DANS LES SOUCHES DE *S. AUREUS* ENTEROTOXINOGENES POUR LA SUITE DE L'ETUDE. LE DEUXIEME OBJECTIF ETAIT D'AVOIR UNE IMAGE ACTUALISEE DE LA DIVERSITE DE *S. AUREUS* ISOLEES DE PRODUITS LAITIERS, LAITS CRUS ET FROMAGES AU LAIT CRU PRINCIPALEMENT.

LES CULTURES SUR BOITES DE BP-RPF ONT ETE RECUPEREES PENDANT DES ANALYSES DE ROUTINE DE DIFFERENTES VARIETES DE FROMAGES AU LAIT CRU DE TYPE PATE PRESSEE NON CUITE, PROVENANT DE DEUX REGIONS DE FRANCE (RHONE-ALPES ET MASSIF CENTRAL), DES FROMAGES SUIVANTS : SAINT-NECTAIRE, REBLOCHON, TOMME DE SAVOIE, ABONDANCE, CANTAL, SALERS ET LAGUIOLE. LES BOITES ONT ETE REÇUES DANS LE LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE A L'ENV DE LYON PENDANT LA PERIODE D'OCTOBRE 2000 A AVRIL 2002. LES COLONIES ONT ETE ISOLEES SELON LEUR ASPECT MORPHOLOGIQUE SUR CE MILIEU (COLONIES NOIRES AVEC UN HALO).

AU TOTAL, 1036 ISOLATS ONT ETE COLLECTES PENDANT CETTE PERIODE. APRES CARACTERISATION PHENOTYPIQUE (TABLEAU XX) LES ISOLATS SUSPECTES D'ETRE DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE ONT ETE DIVISES EN TROIS GROUPES. LE PREMIER CONSTITUAIT LES ISOLATS DE L'ESPECE *S. AUREUS* AVEC UN TOTAL DE 852 ISOLATS (82,2%), LE DEUXIEME COMPRENAIT L'ESPECE *S. INTERMEDIUS* AVEC UN TOTAL DE 138 ISOLATS (13,3%) ET FINALEMENT LE TROISIEME GROUPE CONTENAIT 46 ISOLATS (4,5%) DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE. AUCUNE CARACTERISATION N'A ETE EFFECTUEE SUR LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE.

CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES ISOLATS DE *S. AUREUS*

BIOTYPAGE

LES ISOLATS IDENTIFIES COMME ETANT DE L'ESPECE *S. AUREUS* ONT SUBI DES TESTS DE BIOTYPAGE (TABLEAU XXI), SELON LE SCHEMA DE HAJEK ET MARSALEK (1971) MODIFIE PAR DEVRIESE ET OEDING (1976) ET ISIGIDI *ET AL.* (1992). LES 852 ISOLATS DE *S. AUREUS* ONT PU ETRE DIVISES EN CINQ BIOTYPES : A HUMAIN, B AVIAIRE, C BOVIN, C OVIN ET D LIEVRE.

TABLEAU XXII : REPARTITION DE LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES EN FONCTION DU BIOTYPE DES ISOLATS COLLECTES.

Biotype	Entérotoxines	Isolats non producteurs de SE	Total des isolats
---------	---------------	-------------------------------	-------------------

	A	B	C	D	A+D	B+D	C+D	Autres*		
A humain	1			12	1				9	23
B aviaire			1				1		9	11
C bovin			1	2				3	499	505
C ovin			1	1					34	36
D lièvre		1	2	9					9	21
Inconnu	2			7		2	2		212	225
Total				49 (~ 6% d'isolats producteurs)					772	821

* isolats positifs avec le kit Transia, mais qui ne produisent pas SEA, SEB, SEC ou SED à des niveaux détectables avec le kit Oxoid.

TABLEAU XXIII : REPARTITION DE LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES EN FONCTION DU BIOTYPE DES 17 ISOLATS AJOUTES A LA COLLECTION

Biotype	Entérotoxines				Non producteurs	Total
	A	B	C	D		
A humain		1				1
B aviaire						0
C bovin				1	3	4
C ovin			4	1		5
D lièvre			1	1		2
Inconnu	2	1		1	1	5
Total	2	2	5	4	4	17

LES ISOLATS N'APPARTENANT PAS A UN DE CES BIOTYPES, SELON LE SCHEMA UTILISE, ONT ETE CLASSES COMME ETANT SANS HOTE SPECIFIQUE (BIOTYPE INCONNU). IL EST NECESSAIRE DE NOTER QUE CE BIOTYPE ETAIT SOUVENT PROCHE DU BIOTYPE C BOVIN. DE TOUS LES BIOTYPES, LE BIOTYPE C BOVIN ETAIT LE PLUS REPANDU. LA DISTRIBUTION DES BIOTYPES DES 852 ISOLATS ETAIT DE 529 POUR LE BIOTYPE C BOVIN (62,1%), 227 POUR LE BIOTYPE INCONNU (26,6%), 35 POUR LE BIOTYPE C OVIN (4,1%), 25 POUR LE BIOTYPE A HUMAIN (2,9%), 25 POUR LE BIOTYPE D LIEVRE (2,9%), ET 11 POUR LE BIOTYPE B AVIAIRE (1,3%). EN PLUS, 17 ISOLATS COLLECTES EN 1999 ET EN 2000, DES MEMES REGIONS DE FRANCE, ONT ETE INCLUS. CES ISOLATS ETAIENT DE BIOTYPE A HUMAIN (1), C BOVIN (4), C OVIN (5), D LIEVRE (2) ET INCONNU (5). LES 17 ISOLATS ONT ETE AJOUTES POUR AUGMENTER LE NOMBRE TOTAL D'ISOLATS PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*.

PRODUCTION D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*

LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES A ETE DETERMINEE AVEC LE KIT TRANSIA POUR 821 DES 852 ISOLATS DE *S. AUREUS* COLLECTES ENTRE OCTOBRE 2000 ET AVRIL 2002 ET LES 17 ISOLATS COLLECTES EN 1999 ET EN 2000. ENVIRON 6% (49/821) DES ISOLATS DE *S. AUREUS* SONT PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*.

LES ISOLATS, PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES AVEC LE KIT TRANSIA, ONT ETE ENSUITE TYPES AVEC LE KIT OXOID. LA REPARTITION DES ENTEROTOXINES SELON LE BIOTYPE DE L'ISOLAT EST PRESENTEE DANS LE TABLEAU XXII. LA DISTRIBUTION DES ENTEROTOXINES PRODUITES ETAIT LA SUIVANTE : 3 SEA (6,1%), 1 SEB (2,0%), 5 SEC (C1, C2, C3 : 10,2%), 31 SED (63,3%) ET 3 AUTRES (6,1% : ISOLATS POSITIFS AVEC LE KIT TRANSIA MAIS NEGATIFS AVEC LE KIT OXOID). SIX ISOLATS (12,3%) ETAIENT CAPABLES DE PRODUIRE, EN COMBINAISON, DES ENTEROTOXINES *IN VITRO* : SEA ET SED (1), SEB ET SED (2), SEC ET SED (3). SED ETAIT LA PLUS SOUVENT REPRESENTEE, SUIVIE DE SEC.

SUR LES 17 ISOLATS COLLECTES ENTRE 1999 ET 2000, 13 ETAIENT PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*. LA DISTRIBUTION DES BIOTYPES ET DES ENTEROTOXINES PRODUITES EST PRESENTEE DANS LE TABLEAU XXIII.

AU TOTAL, 62 (49/821 ET 13/17) ISOLATS DE *S. AUREUS*, COLLECTES A PARTIR DE LAITS ET DE FROMAGES DES DEUX REGIONS DE FRANCE, SE TROUVAIENT ETRE PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES, DONT 5 DE SEA, 3 DE SEB, 10 DE SEC, 35 DE SED, 3 D'AUTRES ENTEROTOXINES NON CARACTERISABLES AVEC LE KIT OXOID ET 6 ISOLATS PRODUCTEURS DE PLUSIEURS ENTEROTOXINES *IN VITRO*. CHACUN DES BIOTYPES ET CHACUNE DES ENTEROTOXINES (SEA A SED) ETAIENT REPRESENTES.

QUELQUES SOUCHES DE *S. AUREUS* PRODUCTRICES D'ENTEROTOXINES ET D'ORIGINES DIFFERENTES, ONT EGALEMENT ETE OBTENUES A PARTIR D'AUTRES COLLECTIONS (AFSSA, UNIVERSITE DE CAEN, INRA DE RENNES, ENV DE TOULOUSE). NEANMOINS, IL S'EST AVERE QU'UNE DES 44 SOUCHES N'ETAIT PAS PRODUCTRICE D'ENTEROTOXINES DETECTABLES *IN VITRO*. LES ENTEROTOXINES PRODUITES PAR LES 43 SOUCHES SONT PRESENTEES DANS LE TABLEAU XXIV.

TABLEAU XXIV : TYPE D'ENTEROTOXINES PRODUITES ET ORIGINES DES SOUCHES OBTENUES A PARTIR D'AUTRES COLLECTIONS.

Entérotoxine(s)	Nombre de	Origines
------------------------	------------------	-----------------

souches		
A	10	Fromage à pâte molle à croûte fleurie (1), lait (3), lait de mammite ovine (2), blessure (1), tarte à la crème (1), sang (1), inconnu (1)
B	1	Hôpital
C	17	Fromage blanc (1), lait (8), lait de mammite ovine (5), inconnu (3)
D	2	Lait (1), caillé fromager (1)
Autres*	7	Lait de mammite ovine (2), mammite bovine (1), lait (1), fromage de chèvre (1), inconnu (2)
AB	1	Inconnu
AD	4	Fromage à pâte pressée non cuite (1), fromage de brebis (1), fromage vache-brebis (1), inconnu (1)
H**	1	Inconnu

* souches positives avec le kit Transia, mais qui ne produisent pas SEA, SEB, SEC ou SED à des niveaux détectables avec le kit Oxoid. ** production de SEH n'a pas pu être confirmée avec les kits utilisés.

L'ENSEMBLE DES ISOLATS COLLECTES DANS LE LAIT, LE FROMAGE, L'ENVIRONNEMENT DES FROMAGERIES DE DEUX REGIONS DE FRANCE ET LES SOUCHES OBTENUES A PARTIR D'AUTRES COLLECTIONS, SERA DORENAVANT APPELE « LA COLLECTION AQS-SA ».

SELECTION DES ISOLATS EN VUE DE LEUR CARACTERISATION

SUITE AU BIOTYPAGE DES ISOLATS ET LE TYPAGE DES ENTEROTOXINES PRODUITES, IL ETAIT NECESSAIRE DE CARACTERISER DE MANIERE PLUS APPROFONDIE LA COLLECTION AQS-SA, AFIN D'ORIENTER LE CHOIX DES ISOLATS POUR LA SUITE DE L'ETUDE. TROIS METHODES ONT ETE APPLIQUEES EN VUE DE CETTE CARACTERISATION : L'ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE - METHODE DE REFERENCE POUR L'ETUDE D'ISOLATS CLINIQUES -, LA REP-PCR A ETE INCLUSE POUR COMPLETER LA PFGE, LA PCR POUR LA RECHERCHE DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES, ET LA SPECTROSCOPIE IRTF.

LE NOMBRE D'ISOLATS DE *S. AUREUS* (882) A CARACTERISER PAR ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE, IRTF ET PCR ETANT JUGE TROP IMPORTANT, UN CHOIX A ETE FAIT POUR EN REDUIRE LE NOMBRE, SELON LE BIOTYPE, L'ORIGINE ET L'ENTEROTOXINE PRODUITE *IN VITRO* (VOIR TABLEAU XXV).

TABLEAU XXV : REPARTITION DES ISOLATS COLLECTES A PARTIR DE LAITS ET DE FROMAGES DE DEUX REGIONS DE FRANCE ET DES SOUCHES OBTENUES A PARTIR D'AUTRES COLLECTIONS.

Total d'isolats	Nombre de	PFGE	PCR/IRTF	Origine
-----------------	-----------	------	----------	---------

ou de souches	producteurs <i>in vitro</i> *	producteurs <i>in vitro</i>	non producteurs	producteurs <i>in vitro</i>	non producteurs	
821	49	41	20	38	90	Isolés entre octobre 2000 et avril 2002
17	13	9	-	9	-	Isolés entre 1999 et 2002
44	44	42	-	43	-	Collections externes
882	106	92	20	90	90	
		112		180		

*production d'entérotoxines *in vitro*. **Totaux indiqués en gras.**

LA REPARTITION DES 182 ISOLATS, EN FONCTION DU BIOTYPE ET DE L'ENTEROTOXINE PRODUITE *IN VITRO* EST PRESENTÉE DANS LE TABLEAU XXVI CI-APRÈS.

TABLEAU XXVI : REPARTITION DES ISOLATS/SOUCHES CHOISIS POUR LES ANALYSES EN CHAMP PULSÉ, EN IRTF ET PAR PCR, EN FONCTION DU BIOTYPE ET DE L'ENTEROTOXINE PRODUITE *IN VITRO*.

Entérotoxines	Biotype					Inconnu
	A	B aviaire	C bovin	C ovin	D lièvre	
A	5	1				8
B	1				1	2
C	2	1	1	13	4	6
D	12		2		6*	5†
Autres**	2		5	2	1	2
Plusieurs	2	1				8
Aucune	7 (4)	8 (2)	36 (5)	9 (2)	7 (3)	23 (4)

() : nombre d'isolats non producteurs choisis pour la caractérisation en champ pulsé. * trois isolats ont été inclus en plus pour le champ pulsé (total = 6). † Un isolat n'a pas été inclus pour la caractérisation en champ pulsé. ** Isolats positifs avec le kit Transia, mais qui ne produisent pas SEA, SEB, SEC ou SED à des niveaux détectables avec le kit Oxoid.

INITIALEMENT, LES ISOLATS ONT ÉTÉ CHOISIS EN PAIRES (UN PRODUCTEUR AVEC UN NON PRODUCTEUR), ISOLÉS DU MÊME FROMAGE ET AVEC LE MÊME BIOTYPE. NEANMOINS, DANS CERTAINS CAS, CE CHOIX N'ÉTAIT PAS POSSIBLE CAR IL Y AVAIT PLUS D'ISOLATS PRODUCTEURS QUE D'ISOLATS NON PRODUCTEURS, OU *VICE VERSA*. DE PLUS, LA COLLECTION AQS-SA N'ÉTAIT PAS CONSTITUÉE D'UN NOMBRE ÉGAL D'ISOLATS DE CHAQUE BIOTYPE, DE CHAQUE TYPE D'ENTEROTOXINE ET DE CHAQUE TYPE DE FROMAGE. AINSI, LE CHOIX DE LA REPARTITION DES ISOLATS TENTE DE RESPECTER UN ÉQUILIBRE ENTRE LES ORIGINES DES FROMAGES, LES BIOTYPES RENCONTRES ET LES ENTEROTOXINES PRODUITES. PAR EXEMPLE, UN GRAND NOMBRE D'ISOLATS DE BIOTYPE C BOVIN A ÉTÉ RETENU CAR LA COLLECTION AQS-SA EST CONSTITUÉE PRINCIPALEMENT DE CES DERNIERS.

CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DES ISOLATS DE *S. AUREUS*

RECHERCHE DES GÈNES CODANT LES ENTEROTOXINES

LES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES A, B, C, D, E, G, H, I, J ET TSST-1 (*SEA*, *SEB*, *SEC*, *SED*, *SEE*, *SEG*, *SEH*, *SEI*, *SEJ* ET *TST*, RESPECTIVEMENT), ONT ETE RECHERCHES DANS 180 ISOLATS/SOUCHES DE *S. AUREUS*, DONT 90 PRODUCTEURS *IN VITRO* DES ENTEROTOXINES A A E, A UN NIVEAU DETECTABLE AVEC LE KIT TRANSIA ET CARACTERISES AVEC LE KIT OXOID, ET 90 NON PRODUCTEURS.

Production des entérotoxines A à E et présence des gènes correspondants

SUR LES 90 ISOLATS/SOUCHES, SEULEMENT 88 ETAIENT PRODUCTEURS *IN VITRO* D'ENTEROTOXINES. EN EFFET, UN ISOLAT PRODUCTEUR DE L'ENTEROTOXINE H N'A PAS PU ETRE CONFIRME PAR LES KITS ET UN ISOLAT/SOUCHE PROVENANT D'UN LAIT DE MAMMITE OVINE S'EST AVERE NON PRODUCTEUR. SUR LES 90 ISOLATS/SOUCHES PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*, 79 POSSEDAIENT UN OU PLUSIEURS DES GENES *SEA* A *SEE*. POUR 20 D'ENTRE EUX LE OU LES GENE(S) N'ETAI(EN)T PAS EXPRIME(S) A UN NIVEAU DETECTABLE. DES GENES *SEA* A *SEE* PRESENTS MAIS NON EXPRIMES, *SEC* ETAIT LE PLUS REPRESENTE.

Présence des « nouveaux » gènes en comparaison avec les gènes sea à see

LES « NOUVEAUX » GENES *SEG*, *SEH*, *SEI*, *SEJ* ET *TST* ETAIENT PRESENTS DANS 162 DES 180 ISOLATS/SOUCHES, ALORS QUE LES GENES *SEA* A *SEE* ETAIENT PRESENTS DANS SEULEMENT 94 ISOLATS/SOUCHES. LA REPARTITION DES ISOLATS, POSSEDANT DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES, EN FONCTION DU BIOTYPE, EST PRESENTEE DANS LE TABLEAU XXVII.

TABLEAU XXVIII : REPARTITION EN FONCTION DU BIOTYPE DES ISOLATS/SOUCHES POSSEDANT UN OU PLUSIEURS GENE(S) CODANT UNE ENTEROTOXINE STAPHYLOCOCCIQUE SPECIFIQUE.

Gènes*	Nombre d'isolats/souches possédant un gène						Total
	A humain	B aviaire	C bovin	C ovin	D lièvre	Inconnu	
A	2						2
ABHIJ	1						1
ACDGHJIJ	1						1
ACDHIJ						1	1
ADHIJ						1	1
ADHJ						1	1
ADIJ						1	1
AGH	1						1
AGHT						3	3
AH						3	3
AHI		1					1
AHIT						1	1
BCDGHJIJ						2	2
BCGHI					1		1

BCGI				2			2
BCI						1	1
BG			1				1
BGH						1	1
BGI	1						1
C				1			1
CDGHIJ						2	2
CDGHIJT			1				1
CDGIJ						1	1
CDGIJT	1		1			2	4
CDGJT		1					1
CDHIJ	2					1	3
CDHJT	2						2
CDIJ	1						1
CEI	1						1
CG			1				1
CGHI				1			1
CGHJ	1						1
CGI	2	1	2	1		4	10
CGIJ			1				1
CGIT				2	4	3	9
CGT				1		2	3
CH	1				1		2
CHI						1	1
CI		1		3			4
CIT				2			2
CJT				1			1
CT						1	1
DEJ	1						1
DGHI						1	1
DGHIJ	3				1		4
DGHIJT						1	1
DGHJ						1	1
DHIJ	3						3
DHJ	2						2
E	1						1
G			7	3	1	3	14
GH			1	1			2
GHIT				1			1
GI	3	4	8	2	2	10	29

GIJ						1	1
GIT		2	1		1		4
H						1	1
HI				1			1
I	1	1	8	1		4	15
IT			2		1		3
J			1				1
Total	31	11	35	23	14	52	166

A : sea ; B : seb ; C : sec ; D : sed ; E : see ; G : seg ; H : seh ; I : sei ; J : sej ; T : tst

TABLEAU XXVII : REPARTITION EN FONCTION DU BIOTYPE DES ISOLATS/SOUCHES POSSEDANT DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES.

Biotype	Isolats/souches testés	Présence de gènes	Présence de gènes sea à see	Présence de « nouveaux » gènes (seg à tst)
A humain	31	31	27	28
B aviaire	11	11	4	11
C bovin	44	35	7	35
C ovin	24	22	13	21
D lièvre	16	14	9	14
Inconnu	54	53	34	53
Total	180	166	94	162

AU VU DE CES RESULTATS, LE NOMBRE D'ISOLATS DE *S. AUREUS* POTENTIELLEMENT ENTEROTOXINOGENE A AUGMENTE, PASSANT DE 52% D'ISOLATS POSSEDANT DES GENES SEA A SEE A 90% D'ISOLATS POSSEDANT AU MOINS UN GENE CODANT UNE ENTEROTOXINE. PAR EXEMPLE, DE 16 ET 63% D'ISOLATS POTENTIELLEMENT ENTEROTOXINOGENES, LES POURCENTAGES ONT AUGMENTE JUSQU'A 80 ET 98%, RESPECTIVEMENT, DANS LES BIOTYPES C BOVIN ET INCONNU EN TENANT COMPTE DES GENES CODANT LES « NOUVELLES » ENTEROTOXINES. DE MEME, CES POURCENTAGES ONT AUGMENTE POUR LES BIOTYPES B AVIAIRE, C OVIN ET D LIEVRE PASSANT RESPECTIVEMENT DE 36, 54 ET 56% A 100, 88 ET 88% D'ISOLATS POTENTIELLEMENT ENTEROTOXINOGENES. SUR LE TOTAL, SEULS 4 ISOLATS/SOUCHES NE POSSEDAIENT QUE DES GENES DE SEA A SEE.

UN TOTAL DE 9 ISOLATS/SOUCHES ETAIENT PRODUCTEURS *IN VITRO* MAIS NE POSSEDAIENT PAS LE GENE CODANT L'ENTEROTOXINE DETECTEE (DONT UN POSSEDAIT UN GENE QUI N'ETAIT PAS EXPRIME). SUR 9 ISOLATS/SOUCHES, 6 POSSEDAIENT DE NOUVEAUX GENES ET 3 SUR 9 NE POSSEDAIENT AUCUN DES GENES RECHERCHES. LA RECHERCHE DES GENES DANS LES 6 ISOLATS/SOUCHES POSSEDANT DE NOUVEAUX GENES A DEMONTRE LA PRESENCE, SEUL OU EN COMBINAISON, DES GENES SEG, SEH, SEI, SEJ ET TST. UN TOTAL DE 15 ISOLATS/SOUCHES ETAIENT NON PRODUCTEURS *IN VITRO* MAIS POSSEDAIENT AU MOINS UN GENE CODANT SEA A SEE, PAR CONTRE, CES 15 ISOLATS/SOUCHES POSSEDAIENT DE NOUVEAUX GENES.

SEULS 12 ISOLATS/SOUCHES PARI MI LES 180 TESTES, NE PRODUISAIENT PAS D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*, ET NE POSSEDAIENT AUCUN DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES SEA A SEJ ET TSST-1.

Répartition des gènes

LA REPARTITION DES ISOLATS, EN FONCTION DU BIOTYPE, POSSEDANT UN GENE CODANT UNE ENTEROTOXINE SPECIFIQUE EST PRESENTEE DANS LE TABLEAU XXVIII.

TABLEAU XXIX : REPARTITION DES PULSOTYPES, EN FONCTION DU BIOTYPE, DES 111 ISOLATS DE *S. AUREUS* ETUDIES.

Biotype	Nombre d'isolats	Pulsotype
A humain	28	<i>P1</i> (12), <i>P4</i> (1), <i>P6</i> (1), P13 (1), <i>P15</i> (3), <i>P16</i> (1), P17 (2), P21 (1), D22 (2) D24 (1) D26 (1) D27 (1)
C bovin	12	<i>P1</i> (1), <i>P2</i> (1), <i>P6</i> (7), P14 (1), P23 (1), P29 (1)
C ovin	17	P3 (4), <i>P5</i> (1), <i>P6</i> (1), P7 (7), P9 (1), P11 (1), P12 (1), <i>P24</i> (1)
D lièvre	15	<i>P1</i> (6), <i>P2</i> (6), <i>P4</i> (1), <i>P6</i> (1), <i>P19</i> (1)
B aviaire	5	<i>P6</i> (2), <i>P8</i> (2), <i>P15</i> (1)
Inconnu	34	<i>P1</i> (4), <i>P2</i> (2), <i>P5</i> (1), <i>P6</i> (5), <i>P8</i> (2), P10 (1), <i>P15</i> (11), <i>P16</i> (2), P18 (1) <i>P19</i> (1) P20 (1) <i>P24</i> (1) P25 (1) P28 (1)

En *italique-gras* sont notés les pulsotypes communs à plusieurs biotypes. () : nombre d'isolats présentant le pulsotype.

TABLEAU XXX : REPARTITION DES PULSOTYPES, EN FONCTION DE L'ENTEROTOXINE PRODUITE, DES 111 ISOLATS DE *S. AUREUS* ETUDIES.

Entérotoxines	Nombre d'isolats testés	Pulsotype
D	23	P1 (23) = 100%
C	27	<i>P2</i> (8), P3 (4), P4 (2), P5 (2), <i>P7</i> (5), <i>P8</i> (1), P9 (1), P10 (1), P11 (1), P12 (1), P13 (1)
A	14	<i>P6</i> (1), <i>P15</i> (7), P16 (3), P17 (2), P18 (1)
B	4	P19 (2), P20 (1), P21 (1)
Plusieurs entérotoxines :		
A et D	11	<i>P15</i> (5)
A et B		<i>P15</i> (1)
Autres entérotoxines*	12	<i>P6</i> (5), <i>P7</i> (2), P14 (1), P22 (3), P23 (1)
Aucune**	20	<i>P2</i> (1), <i>P6</i> (11), P24 (3), P25 (1), P26 (1), P27 (1), P28 (1) P29 (1)

En *italique-gras* sont notés les pulsotypes communs à plusieurs types d'entérotoxines. () : nombre d'isolats présentant le pulsotype ; * Isolats positifs avec le kit Transia, mais pas de production

d'entérotoxines SEA, SEB, SEC ou SED à des niveaux détectables avec le kit Oxoid ; ** Isolats non producteurs d'entérotoxines A à E.

LES GENES *SEG* ET *SEI* ETAIENT LARGEMENT DOMINANTS DANS LES ISOLATS/SOUCHES ETUDIES, PUISQUE 60% ET 71% DES 166 ISOLATS/SOUCHES, POSITIFS POUR LES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES, POSSEDAIENT *SEG* ET *SEI*, RESPECTIVEMENT. ONT ETE OBSERVES, 61 ASSOCIATIONS DIFFERENTES DE GENES ET GENES SEULS PARMIS LES 166 ISOLATS/SOUCHES. LES MODALITES LES PLUS FREQUEMMENT RENCONTREES ETAIENT [*SEG* + *SEI*], [*SEI*], [*SEG*], [*SEC* + *SEG* + *SEI*] ET [*SEC* + *SEG* + *SEI* + *TST*], REPRESENTANT 17, 9, 8, 6 ET 5%, RESPECTIVEMENT DES 166 ISOLATS/SOUCHES POSITIFS AVEC LA PCR.

UN TOTAL DE 36 (22%) DES 166 DES ISOLATS/SOUCHES POSSEDAIENT LE GENE *TST*. DANS 64% DES CAS (23/36), CE GENE ETAIT PRESENT AVEC *SEC*, EN COMBINAISON AVEC D'AUTRES GENES. A L'EXCEPTION DE 7 ISOLATS/SOUCHES SUR 40, *SED* ETAIT TOUJOURS ASSOCIE AVEC *SEI*. DANS 77 (46%) DES 166 ISOLATS/SOUCHES, *SEG* ET *SEI* ONT ETE RETROUVES ENSEMBLE, « SEULS » (29/166) OU AVEC D'AUTRES GENES (*SEA* A *TST*).

LA RECHERCHE DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES A MONTRE QU'UN FORT POURCENTAGE D'ISOLATS/SOUCHES (92%) POSSEDAIENT AU MOINS UN DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES, NEANMOINS CERTAINS DES GENES *SEA* A *SEE* NE SONT PAS EXPRIMES.

TYPAGE GENETIQUE PAR ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE

L'ETUDE PORTAIT SUR 111 ISOLATS (CF. TABLEAU XXVI). LES RESULTATS DES PROFILS D'ADN OBTENUS APRES DIGESTION PAR L'ENZYME DE RESTRICTION *SmaI* SONT PRESENTES DANS LES TABLEAUX XXIX ET XXX. LES 111 ISOLATS DE *S. AUREUS* TESTES ETAIENT DISTRIBUES DANS 29 PULSOTYPES DIFFERENTS. LE PULSOTYPE P1 CONTENAIT LE PLUS GRAND NOMBRE D'ISOLATS (23), SUIVI PAR P6 QUI CONTENAIT 17 ISOLATS, PAR P15 AVEC 15, PUIS P2 AVEC 9 ET FINALEMENT P7 QUI CONTENAIT 7 ISOLATS. TOUS LES AUTRES PULSOTYPES (24/29) REGROUPEAIENT 4 ISOLATS AU PLUS, AVEC LA MAJORITE CONTENANT UN PROFIL UNIQUE (15/24). LES RESULTATS DANS LE TABLEAU XXIX MONTRENT QU'UN PULSOTYPE PEUT REGROUPER PLUSIEURS BIOTYPES. PAR EXEMPLE, LE PULSOTYPE P1 ETAIT CONSTITUE DE 23 ISOLATS APPARTENANT AUX BIOTYPES A HUMAIN (12/23), C BOVIN (1/23), D LIEVRE (6/23) ET INCONNU (4/23). INVERSEMENT, CERTAINS PULSOTYPES NE CONTENAIENT QU'UN SEUL BIOTYPE, UN EXEMPLE ETANT LE PULSOTYPE P22 QUI ETAIT CONSTITUE DE 3 ISOLATS DE BIOTYPE A HUMAIN.

LE TABLEAU XXX MONTRE QUE LES 91 ISOLATS ENTEROTOXINOGENES ETAIENT DISTRIBUES DANS 23 PULSOTYPES DIFFERENTS (AVEC L'ENZYME DE RESTRICTION *SmaI*). LE PULSOTYPE P1 (23 ISOLATS) ETAIT CONSTITUE UNIQUEMENT D'ISOLATS PRODUCTEURS DE *SED* *IN VITRO*, ISOLATS PROVENANT A LA FOIS DE RHONE-ALPES ET DU MASSIF CENTRAL. LE PULSOTYPE P1 PRESENTAIT UN PROFIL ELECTROPHORETIQUE DE 13 FRAGMENTS, PRESENTE DANS LA FIGURE 12. LES RESULTATS DANS LE TABLEAU XXX MONTRENT EGALEMENT QUE 5 DES PULSOTYPES OBTENUS (P2, P6, P7, P8 ET P15) POUVAIENT REGROUPER DES ISOLATS PRODUISANT DIFFERENTES ENTEROTOXINES. PAR EXEMPLE, LE PULSOTYPE P6 ETAIT CONSTITUE D'UN ISOLAT PRODUCTEUR DE *SEA* ET DE 5 ISOLATS PRODUCTEURS D'AUTRES ENTEROTOXINES, AINSI QUE DES ISOLATS NON PRODUCTEURS.

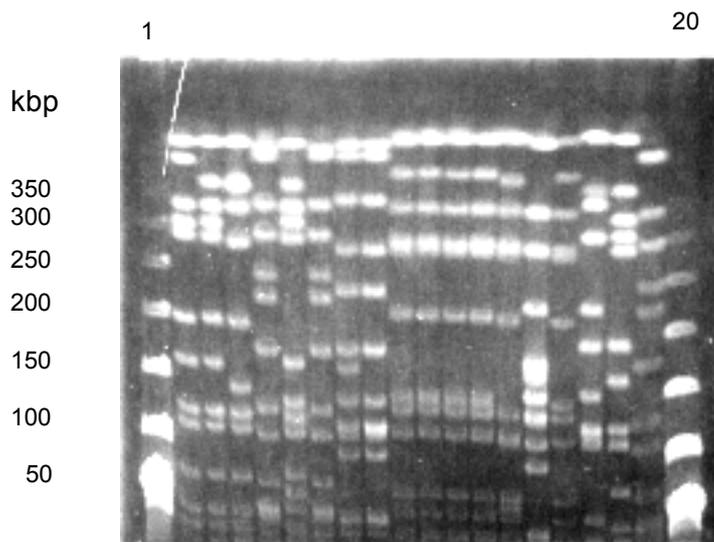


Figure 12 : quelques profils typiques obtenus par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) de certains isolats entérotoxigènes de *S. aureus*. Les lignes sont listées de 1 à 20. Lignes 1 & 20 : témoin de poids moléculaire pulse marker 50-1000 kb ; Lignes 2, 3, 4, 6 & 18 : pulsotype P2 ; Lignes 5, 7, 8, 9 & 19 : pulsotype P6 ; Lignes 10 à 14 & ligne 16 : Pulsotype P1 ; Ligne 15 : pulsotype P15 ; Ligne 17 : pulsotype P7.

AU CONTRAIRE, LES 18 AUTRES PULSOTYPES OBTENUS NE COMPORTAIENT QU'UN NOMBRE FAIBLE D'ISOLATS MAIS TOUS PRODUISAIENT LA MEME ENTEROTOXINE. PAR EXEMPLE, LE PULSOTYPE P3 REGROUPAIT 4 ISOLATS PRODUCTEURS DE SEC. LES 4 ISOLATS PRODUCTEURS DE SEB SONT REPARTIS DANS TROIS PULSOTYPES DIFFERENTS NE COMPORTANT PAS D'AUTRES ISOLATS.

CETTE TECHNIQUE A DEMONTRE LA GRANDE DIVERSITE GENETIQUE DES ISOLATS DE *S. AUREUS* ISOLEES DU LAIT CRU ET DES FROMAGES AU LAIT CRU. EN EFFET, 29 PULSOTYPES DIFFERENTS ONT ETE OBTENUS. LA SIMILITUDE DES ISOLATS PRODUCTEURS DE SED EST EGALEMENT UN RESULTAT A SOULIGNER.

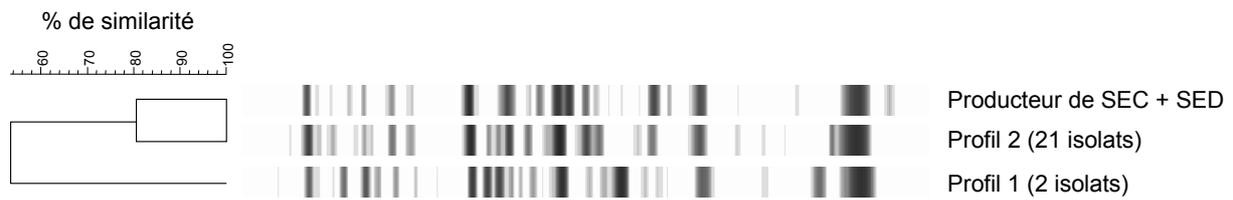


Figure 13 : dendrogramme des deux profils électrophorétiques des isolats producteurs de SED *in vitro*, obtenus par rep-PCR avec les amorces ERIC et le profil d'un isolat producteur de SEC et SED *in vitro*.

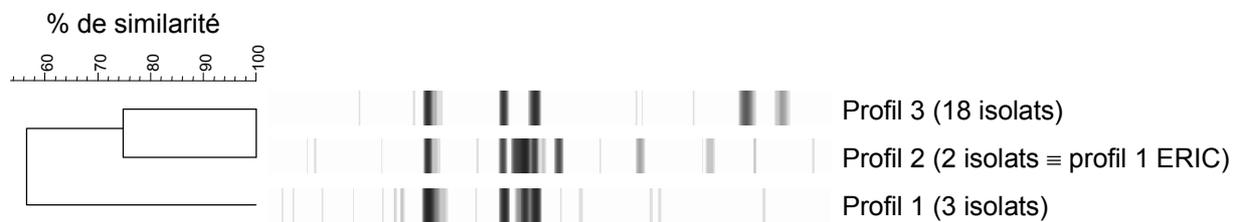


Figure 14 : dendrogramme des trois profils électrophorétiques des isolats producteurs de SED *in vitro*, obtenus par rep-PCR avec les amorces REP.

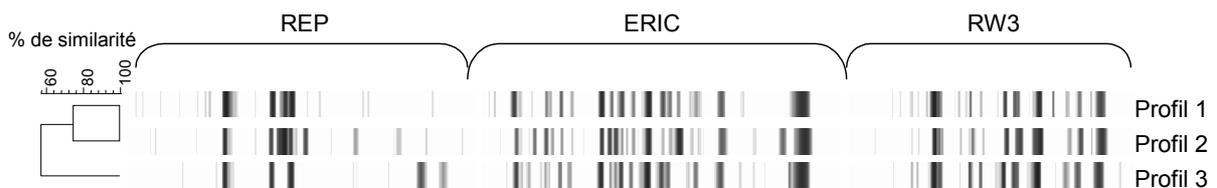


Figure 15 : dendrogramme obtenu par la combinaison des trois profils électrophorétiques des isolats producteurs de SED *in vitro*, obtenus par rep-PCR avec les amorces ERIC, REP et RW3.

TYPAGE GENETIQUE PAR REP-PCR

AFIN D’AFFINER L’ETUDE DES 23 ISOLATS PRODUCTEURS DE SED, APPARTENANT TOUS AU PULSOTYPE P1, ET PROVENANT DE REGIONS GEOGRAPHIQUES DISTINCTES, LA REP-PCR, A ETE UTILISEE COMME TECHNIQUE COMPLEMENTAIRE. DEUX JEUX D’AMORCES ONT ETE TESTES : ERIC ET REP. LES PROFILS OBTENUS AVEC LES DEUX JEUX D’AMORCES ONT ETE ANALYSES AVEC LE LOGICIEL BIONUMERICS ET SONT PRESENTES DANS LES FIGURES 13 ET 14. UN ISOLAT PRODUCTEUR DE SEC ET SED *IN VITRO* A EGALEMENT ETE ANALYSE AVEC L’AMORCE ERIC (FIGURE 13). CET ISOLAT POSSEDAIT UN PROFIL DIFFERENT DE TOUS LES ISOLATS PRODUCTEURS DE SED.

L’ANALYSE AVEC LE LOGICIEL BIONUMERICS ET L’ANALYSE VISUELLE DES PROFILS ELECTROPHORETIQUES RESULTANT DE LA PCR AVEC LES AMORCES ERIC, A REVELE DEUX PROFILS DIFFERENTS. LE PROFIL 1, COMPRENAIT 2 ISOLATS DE BIOTYPES A HUMAIN ET D LIEVRE, ISOLEES A PARTIR DU MEME TYPE DE FROMAGE. LE DEUXIEME PROFIL ETAIT CONSTITUE DE 21 ISOLATS DE BIOTYPES A HUMAIN, D LIEVRE ET INCONNU, ISOLEES DE TROIS VARIETES DE FROMAGES ET PROVENANT DE DEUX REGIONS GEOGRAPHIQUES DISTINCTES.

LES AMORCES REP ONT REVELE TROIS PROFILS DIFFERENTS. LE PREMIER PROFIL REGROUPAIT 3 ISOLATS DE BIOTYPES A HUMAIN ET D LIEVRE, PROVENANT DU LAIT, DU FROMAGE ET DE L’ENVIRONNEMENT DE DEUX VARIETES DE FROMAGE DE LA MEME REGION DE FRANCE. LE DEUXIEME ETAIT CONSTITUE DES DEUX MEME ISOLATS CONTENUS DANS LE PROFIL 1 OBTENU AVEC LES AMORCES ERIC. LE TROISIEME ETAIT CONSTITUE DES 18 AUTRES ISOLATS PRODUCTEURS DE SED, DE BIOTYPES DIFFERENTS ET COLLECTES A PARTIR DE LAITS ET DE FROMAGES PROVENANT DE TROIS VARIETES DE FROMAGES DE DEUX REGIONS DE FRANCE.

LA COMBINAISON DES DEUX TECHNIQUES A DONNE TROIS PROFILS, INDIQUANT QUE NOUS SOMMES EN PRESENCE D’AU MOINS TROIS SOUCHES. UN ATELIER PRODUISANT UNE VARIETE DE FROMAGE COMPTAIT 17 DES 23 ISOLATS, COLLECTES A PARTIR DU LAIT, DE FROMAGE ET DE L’ENVIRONNEMENT PENDANT LA MEME PERIODE HIVERNALE, ESTIMEE A UN MOIS. CES ISOLATS ETAIENT DE BIOTYPES A HUMAIN (9), D LIEVRE (5) ET INCONNU (3). NEANMOINS, IL EST IMPORTANT DE NOTER QUE CES ISOLATS SONT REPARTIS DANS LES TROIS PROFILS DIFFERENTS.

UNE TROISIEME AMORCE, RW3, A EGALEMENT ETE TESTEE SUR LES MEMES ISOLATS, MAIS L’ANALYSE AVEC LE LOGICIEL BIONUMERICS ET L’ANALYSE VISUELLE ETAIENT MOINS CONCLUANTS. EN EFFET, LES ISOLATS DONNAIENT L’IMPRESSION D’APPARTENIR A UN MEME PROFIL, COMME AVEC LE CHAMP PULSE.

TABLEAU XXXI : LISTE DES ESPECES ET DES SOUS-ESPECES DE STAPHYLOCOQUES UTILISEES POUR ELABORER LE MODELE « STAPHYLOCOQUES », ET LEURS ORIGINES.

<i>Espèce de Staphylococcus</i>	Origine *	<i>Espèce de Staphylococcus</i>	Origine *
<i>S. arlettae</i> ^T	DSMZ 20672	<i>S. gallinarum</i>	CIP 105918
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	LMG 8224	<i>S. gallinarum</i>	LMG 19119
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	LMG 9826	<i>S. gallinarum</i> ^T	DSMZ

			20610
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	LMG 10147	<i>S. haemolyticus</i> ^T	DSMZ 20263
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	LMG 14265	<i>S. hominis ssp. hominis</i>	DSMZ 20329
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	LMG 15154	<i>S. hominis ssp. hominis</i>	DSMZ 20330
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	LMG 16805	<i>S. hominis ssp. hominis</i> ^T	LMG 13348
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	LMG16820	<i>S. hyicus</i> ^T	DSMZ 20459
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	CIP 53.156	<i>S. intermedius</i>	CIP 81.77
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	CIP 4.83	<i>S. intermedius</i>	LMG 9079
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	CIP 67.7	<i>S. intermedius</i> ^T	LMG 13351
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	CIP 67.8	<i>S. kloosii</i> ^T	DSMZ 20676
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	CIP 100922	<i>S. lentus</i>	DSMZ 6672
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	CIP 106152	<i>S. lentus</i>	LMG 19110
<i>S. aureus ssp. aureus</i> ^T	DSMZ 20231	<i>S. lentus</i> ^T	DSMZ 20352
<i>S. auricularis</i> ^T	DSMZ 20609	<i>S. lugdunensis</i> ^T	DSMZ 4804
<i>S. capitis ssp. capitis</i>	DSMZ 6180	<i>S. lutrae</i> ^T	DSMZ 10244
<i>S. capitis ssp. capitis</i>	DSMZ 20325	<i>S. muscae</i> ^T	DSMZ 7068
<i>S. capitis ssp. capitis</i> ^T	LMG 13353	<i>S. pasteurii</i> ^T	DSMZ 10656
<i>S. capitis ssp. ureolyticus</i> ^T	DSMZ 6717	<i>S. piscifermentans</i> ^T	DSMZ 7373
<i>S. caprae</i>	CIP 104519	<i>S. pulvereri</i> ^T	DSMZ 9930
<i>S. caprae</i>	LMG 19123	<i>S. saprophyticus ssp. saprophyticus</i>	CIP 104064
<i>S. caprae</i> ^T	DSMZ 20608	<i>S. saprophyticus ssp. saprophyticus</i>	CIP 103545

<i>S. carnosus ssp. utilis</i>	DSMZ 11676	<i>S. saprophyticus ssp. saprophyticus</i> ^T	DSMZ 20229
<i>S. carnosus</i> ^T	DSMZ 20501	<i>S. schleiferi ssp. coagulans</i> ^T	DSMZ 6628
<i>S. caseolyticus</i> ^T	DSMZ 20597	<i>S. schleiferi ssp. schleiferi</i> ^T	DSMZ 4807
<i>S. chromogenes</i> ^T	DSMZ 20454	<i>S. sciuri ssp. sciuri</i>	DSM 6671
<i>S. cohnii ssp. cohnii</i>	DSMZ 6669	<i>S. sciuri ssp. sciuri</i>	CIP 105824
<i>S. cohnii ssp. cohnii</i>	DSMZ 20261	<i>S. sciuri ssp. sciuri</i> ^T	DSMZ 20345
<i>S. cohnii</i> ^T	DSMZ 20260	<i>S. simulans</i>	DSMZ 20323
<i>S. cohnii ssp. urealyticum</i> ^T	DSMZ 6718	<i>S. simulans</i>	DSMZ 20723
<i>S. condimentii</i> ^T	DSMZ 11674	<i>S. simulans</i> ^T	DSMZ 20322
<i>S. delphini</i> ^T	DSMZ 20771	<i>S. vitulinus</i>	CIP104850
<i>S. epidermis</i>	LMG 10273	<i>S. vitulinus</i>	CIP 104987
<i>S. epidermis</i>	LMG 13655	<i>S. warneri</i>	DSM 20036
<i>S. epidermis</i> ^T	DSMZ 20044	<i>S. warneri</i>	CIP 103960
<i>S. equorum</i>	LMG 19116	<i>S. warneri</i> ^T	LMG 13354
<i>S. equorum</i>	LMG 9118	<i>S. xylosus</i>	DSMZ 6179
<i>S. equorum</i> ^T	DSMZ 20674	<i>S. xylosus</i>	DSMZ 20029
<i>S. felis</i> ^T	DSMZ 7377	<i>S. xylosus</i> ^T	DSMZ 20266
<i>S. fleurettii</i> ^T	DSMZ 13212		

* DSMZ = collection allemande de micro-organismes et de cultures cellulaires ; LMG = collection belge de micro-organismes ; CIP = centre de ressources biologiques de l'Institut Pasteur

LA COMBINAISON DE CES TROIS TECHNIQUES A CONFIRME LA PRESENCE DE TROIS PROFILS DISTINCTS POUR LES 23 ISOLATS DE BIOTYPES DIFFERENTS ET PROVENANT DE REGIONS DIFFERENTES DE FRANCE. LE DENDROGRAMME OBTENU PAR LA COMBINAISON DES PROFILS ELECTROPHORETIQUES DES TROIS AMORCES EST PRESENTE DANS LA FIGURE 15. CES RESULTATS ONT MONTRE QUE LES ISOLATS DE *S. AUREUS* PRODUCTEURS DE SED, DE BIOTYPE ET D'ORIGINE DIFFERENTS ETAIENT ASSEZ FORTEMENT LIES GENETIQUEMENT.

CARACTERISATION DE *S. AUREUS* PAR SPECTROSCOPIE IRTF

CETTE PARTIE DE L'ETUDE A ETE REALISEE POUR DEMONTRER LA CAPACITE DE LA SPECTROSCOPIE IRTF (1) A DISTINGUER *S. AUREUS* DES AUTRES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES ET (2) A DETERMINER L'APTITUDE DE CHAQUE ISOLAT A LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES.

DISCRIMINATION DES STAPHYLOCOQUES ET CARACTERISATION DE *S. AUREUS*

AFIN D'EVALUER LA CAPACITE DE L'INFORMATION SPECTRALE A DISCRIMINER LES DIFFERENTES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES, UN MODELE D'IDENTIFICATION A ETE ETABLI A PARTIR D'UNE GRANDE VARIETE D'ESPECES ET DE SOUS-ESPECES DE STAPHYLOCOQUES. L'ENSEMBLE DE CES ESPECES (35) ET SOUS-ESPECES (4) AINSI QUE LEURS ORIGINES SONT PRESENTES DANS LE TABLEAU XXXI. A PARTIR DE LA BIBLIOTHEQUE SPECTRALE ENREGISTREE (SIX SPECTRES PAR SOUCHE), DES MODELES D'IDENTIFICATION SONT ELABORES. CES MODELES ONT POUR OBJECTIF DE DETERMINER L'ESPECE D'UN STAPHYLOCOQUE SUR LA BASE DE SON SPECTRE INFRAROUGE.

L'ANALYSE DISCRIMINANTE MULTIDIMENSIONNELLE, UTILISEE POUR ELABORER LES MODELES, REPRESENT LES SPECTRES DANS UN ESPACE DE DIMENSION REDUITE. DANS CET ESPACE, LA DISTANCE QUI SEPARER LES DIFFERENTS GROUPES EST REPRESENTEE PAR LA DISTANCE DE MAHALANOBIS (LEFIER *ET AL.*, 2000). CETTE DISTANCE PERMET DE VISUALISER LES DIFFERENCES ENTRE ESPECES ANALYSEES. PLUS LES DISTANCES DE MAHALANOBIS ENTRE DEUX GROUPES SONT ELEVEES, PLUS LES DEUX GROUPES SONT DIFFERENTS AU VU DE LEUR SPECTRE INFRAROUGE. PAR EXEMPLE, LES DISTANCES DE MAHALANOBIS ENTRE *S. CASEOLYTICUS*, OU *S. AURICULARIS*, ET *S. AUREUS* SONT GRANDES, INDIQUANT UNE GRANDE DIFFERENCE ENTRE LES DONNEES SPECTRALES DE CES ESPECES. PAR AILLEURS, CETTE DISTANCE EST UTILISEE POUR AFFECTER UN ISOLAT DE STAPHYLOCOQUE INCONNU A UNE ESPECE DONNEE (AFFECTATION DE L'INDIVIDU AU GROUPE POUR LEQUEL LA DISTANCE DE MAHALANOBIS EST LA PLUS FAIBLE).

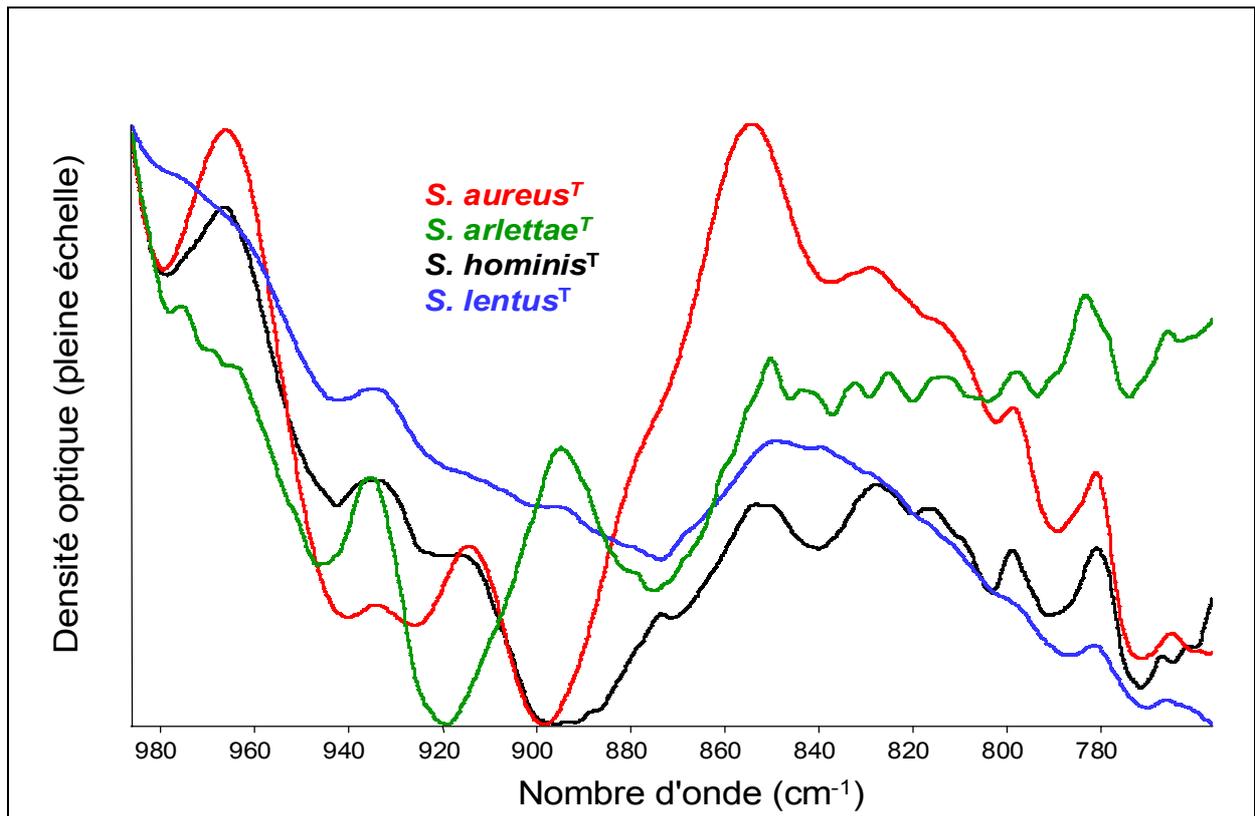


Figure 16 : région du spectre infrarouge de quatre espèces de staphylocoques comprenant l’empreinte infrarouge (900 et 750 cm⁻¹).

POUR EVALUER SA CAPACITE A IDENTIFIER PRECISEMENT UNE ESPECE, CE MODELE A ETE VALIDE AVEC UN NOUVEAU JEU DE DONNEES CONSTITUE DES ISOLATS DE *S. AUREUS* DE LA COLLECTION AQS-Sa. UN SPECTRE INCONNU EST AFFECTE A UN GROUPE EN FONCTION DE SA SIMILITUDE SPECTRALE.

Les spectres de quatre espèces de staphylocoques, présentés dans la figure 16, montrent des différences importantes. Ces différences sont plus particulièrement remarquées dans la région de l’empreinte infrarouge (comprise entre 900 et 750 cm⁻¹).

LE MODELE « STAPHYLOCOQUES », ELABORE A PARTIR DE 35 ESPECES DE STAPHYLOCOQUES, PERMETTAIT DE DISCRIMINER LES DIFFERENTES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES ENTRE ELLES, ET PLUS PARTICULIEREMENT *S. AUREUS*. LES DISTANCES DE MAHALANOBIS ENTRE *S. AUREUS* ET LES AUTRES ESPECES SONT PRESENTEES DANS LE TABLEAU XXXII. LES ESPECES LES PLUS PROCHES DE *S. AUREUS* (EN GRAS DANS LE TABLEAU) SONT *S. WARNERI*, *S. HOMINIS*, *S. LUTRAE*, *S. SCHLEIFERI* SSP. *COAGULANS*, *S. SIMULANS*, *S. INTERMEDIUS* ET *S. CARNOSUS*, AVEC DES DISTANCES DE MAHALANOBIS AU CARRE RESPECTIVES DE 27, 30, 32, 32, 35, 37 ET 39.

TABLEAU XXXII : DISTANCES DE MAHALANOBIS AU CARRE ENTRE *S. AUREUS* ET LES AUTRES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES.

Espèce	Distance de <i>S. aureus</i>	Espèce	Distance de <i>S. aureus</i>
<i>S. auricularis</i>	508	<i>S. hominis</i>	30
<i>S. arlettae</i>	89	<i>S. hyicus</i>	55
<i>S. capitis</i>	67	<i>S. intermedius</i>	37
<i>S. capitis ssp. ureolyticus</i>	50	<i>S. kloosii</i>	154
<i>S. caprae</i>	51	<i>S. lentus</i>	101
<i>S. carnosus</i>	39	<i>S. lugdunensis</i>	54
<i>S. carnosus ssp. utilis</i>	63	<i>S. lutrae</i>	32
<i>S. caseolyticus</i>	289	<i>S. muscae</i>	134
<i>S. chromogenes</i>	41	<i>S. pasteurii</i>	133
<i>S. cohnii</i>	59	<i>S. piscifermentans</i>	83
<i>S. cohnii ssp. urealyticum</i>	131	<i>S. pulvereri</i>	186
<i>S. condimenti</i>	69	<i>S. saprophyticus</i>	68
<i>S. delphini</i>	89	<i>S. schleiferi</i>	81
<i>S. epidermis</i>	79	<i>S. schleiferi ssp coagulans</i>	32
<i>S. equorum</i>	47	<i>S. sciuri</i>	99
<i>S. felis</i>	46	<i>S. simulans</i>	35

<i>S. fleuretti</i>	101	<i>S. vitulinus</i>	64
<i>S. gallinarum</i>	61	<i>S. warneri</i>	27
<i>S. haemolyticus</i>	71	<i>S. xylosus</i>	55

L'INFORMATION SPECTRALE PERMET DE CARACTERISER LES DIFFERENTES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES, MAIS MONTRE EGALEMENT QUE CERTAINES ESPECES SONT PROCHES DE *S. AUREUS*.

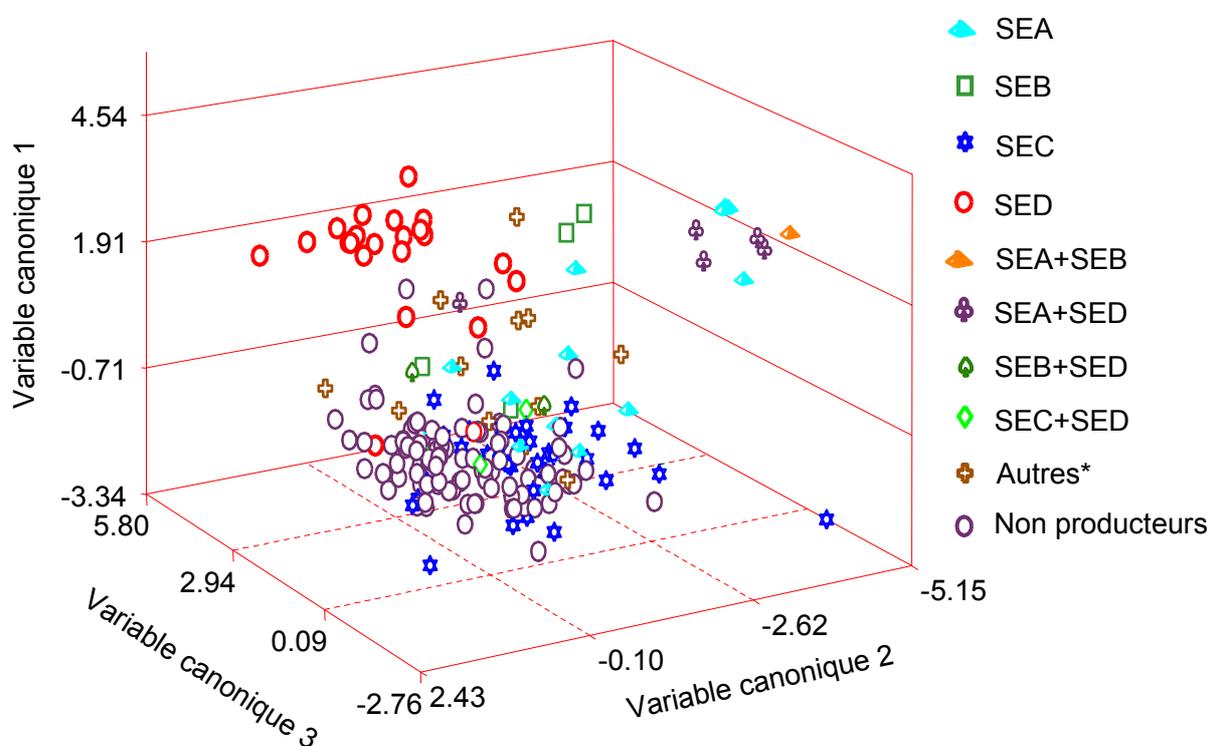


Figure 17 : représentation, en fonction des trois premières variables canoniques, des résultats de la discrimination entre les groupes d'isolats producteurs (selon les entérotoxines produites) et ceux non producteurs d'entérotoxines *in vitro*. * Isolats positifs avec le kit Transia, mais qui ne produisent pas SEA, SEB, SEC ou SED à des niveaux détectables avec le kit Oxoid.

AFIN DE JUGER SI CETTE PROXIMITE ETAIT EN MESURE DE PERTURBER L'IDENTIFICATION DE *S. AUREUS*, UN DEUXIEME MODELE A ETE ELABORE. CERTAINES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES, PROCHES DE *S. AUREUS*, ET QUELQUES SOUCHES DE *S. AUREUS*, INDIQUEES EN GRAS DANS LE TABLEAU XXXI, ONT ETE EXCLUES DU MODELE ET MIS DANS LE JEU DE VALIDATION. CE NOUVEAU MODELE A PERMIS DE DISCRIMINER LES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES ETUDIEES. AUCUNE CONFUSION N'A EU LIEU ENTRE LES ESPECES PROCHES DE *S. AUREUS* ET LES SOUCHES DE *S. AUREUS*.

CE MODELE A ETE VALIDE SUR UN JEU D'ECHANTILLONS QUI COMPRENAIT LES SPECTRES MOYENS DE 180 ISOLATS/SOUCHES DE *S. AUREUS* DE LA COLLECTION AQS-SA, ET LES SPECTRES DE 15 ESPECES DE STAPHYLOCOQUES (INDIQUEES EN GRAS DANS LE TABLEAU XXXI). SIX SPECTRES ONT ETE ENREGISTRES PAR ISOLAT/SOUCHE. UN TOTAL DE 97% DES SPECTRES DES ISOLATS/SOUCHES DE *S. AUREUS* A ETE CORRECTEMENT CLASSE EN TANT QUE *S. AUREUS*, CE QUI DEMONTE L'INTERET DE LA TECHNIQUE COMME METHODE RAPIDE D'IDENTIFICATION. DE PLUS, IL EST IMPORTANT DE NOTER QU'AUCUNE ESPECE DANS LE JEU DE VALIDATION, AUTRE QUE *S. AUREUS*, N'A ETE ASSIMILEE A *S. AUREUS*.

LA SPECTROSCOPIE IRTF ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES

LE POUVOIR DE LA SPECTROSCOPIE IRTF POUR L'IDENTIFICATION DES SOUCHES DE *S. AUREUS* ENTEROTOXINOGENES A ETE EXPLORÉ.

AFIN D'EVALUER LA CAPACITE DE L'INFORMATION SPECTRALE A DIFFERENCIER LES ISOLATS PRODUCTEURS DES ISOLATS NON PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES, UN MODELE CONSTITUE DE NEUF GROUPES (PRODUCTEURS DE SEA, SEA ET SEB, SEA ET SED, SEB, SEB ET SED, SEC, SEC ET SED, ET SED, ET NON PRODUCTEURS), A ETE ELABORE AVEC LES SPECTRES DE 180 ISOLATS DE *S. AUREUS* DONT 90 PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES *IN VITRO* (SEA A SEE, RECHERCHEES AVEC LES KITS TRANSIA ET OXOID). LE CHOIX DES ISOLATS, LES ENTEROTOXINES PRODUITES ET LES BIOTYPES SONT DECRITS DANS LA SECTION 3 DE CETTE PARTIE. LA DISCRIMINATION ENTRE LES DIFFERENTS ISOLATS MONTRE QUE LES PRODUCTEURS DE SED SEMBLENT ASSEZ DIFFERENTS DES AUTRES (FIGURE 17), AINSI QUE CERTAINS ISOLATS PRODUCTEURS DE SEA ET SED, DE SEA ET SEB, ET DE SEA. DE PLUS, CERTAINS DE CES MEMES ISOLATS APPARTENAIENT AU MEME PULSOTYPE OBTENU PAR ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE (LE PULSOTYPE P15). POURTANT, L'INFORMATION SPECTRALE NE PERMET GLOBALEMENT PAS DE DISCRIMINER LES ISOLATS PRODUCTEURS DES ISOLATS NON PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*.

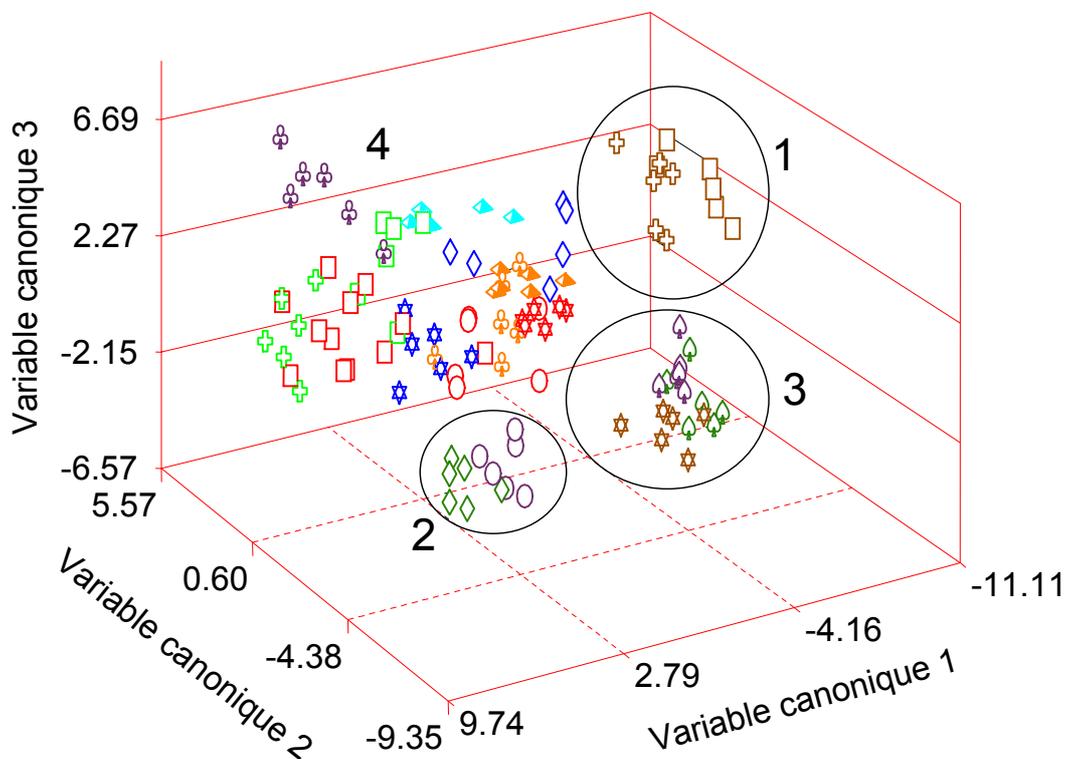


Figure 18 : représentation, en fonction des trois premières variables canoniques, des résultats de la discrimination entre les isolats producteurs de SED *in vitro* (19 isolats et 6 spectres/isolat). Chaque symbole représente le spectre d'un isolat.

AU NIVEAU DE LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES, 90 DES 180 ISOLATS RETENUS ETAIENT PRODUCTEURS *IN VITRO*. NEANMOINS, LA RECHERCHE DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES SEA A SEJ ET TSST-1 A MONTRE QUE 166 DES 180 ISOLATS POSSEDAIENT AU MOINS UN GENE, ET ONT UN POUVOIR « POTENTIELLEMENT » ENTEROTOXINOGENE. AFIN DE JUGER SI LA PRESENCE DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES SEA A SEJ ET TSST-1 ETAIT EN MESURE D'AMELIORER LA DISCRIMINATION ENTRE LES ISOLATS, UN DEUXIEME MODELE A ETE ELABORE ENTRE DEUX GROUPES D'ISOLATS : LE GROUPE 1 CONTENAIT LES ISOLATS (166) POSSEDANT AU MOINS UN GENE ET LE GROUPE 2 CONTENAIT LES ISOLATS (14) NE POSSEDANT AUCUN GENE. NEANMOINS, A NOUVEAU, L'INFORMATION SPECTRALE N'A PAS PERMIS LA DISCRIMINATION DES DEUX GROUPES D'ISOLATS.

ISOLATS PRODUCTEURS DE L'ENTEROTOXINE D

LES RESULTATS OBTENUS PAR ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE ONT MONTRE QUE LES ISOLATS PRODUCTEURS DE SED APPARTENAIENT A UN SEUL ET UNIQUE PULSOTYPE. CETTE CARACTERISATION A ETE AUSSI OBTENUE PAR IRTF. LA REP-PCR A ETE UTILISEE AFIN D'AFFINER L'ETUDE DE CES ISOLATS PRODUCTEURS DE SED. CETTE TECHNIQUE A MIS EN EVIDENCE LA PRESENCE D'AU MOINS TROIS SOUCHES. AU VU DES RESULTATS OBTENUS EN BIOLOGIE MOLECULAIRE, UN MODELE A ETE ELABORE AVEC LES SPECTRES DE 19 ISOLATS PRODUCTEURS DE SED (SIX SPECTRES PAR ISOLAT), AFIN DE TESTER LA CAPACITE DE L'INFORMATION SPECTRALE A DISCRIMINER ENTRE CES ISOLATS. LA REPRESENTATION EN TROIS DIMENSIONS EST PRESENTEE DANS LA FIGURE 18.

L'INFORMATION SPECTRALE A PERMIS DE METTRE EN EVIDENCE LA PRESENCE DE QUATRE GROUPES D'ISOLATS. LE GROUPE 1 ETAIT CONSTITUE DE DEUX ISOLATS DU MEME BIOTYPE COLLECTES A PARTIR DE LA MEME VARIETE DE FROMAGE. LES GROUPES 2 ET 3 CONTENAIENT 2 ET 3 ISOLATS DE BIOTYPES DIFFERENTS ET COLLECTES A PARTIR DE FROMAGES DE DEUX REGIONS DIFFERENTES. LE GROUPE 4 CONTENAIT 12 ISOLATS DE BIOTYPES DIFFERENTS ET COLLECTES A PARTIR DE DEUX VARIETES DE FROMAGES PROVENANT DE DEUX REGIONS DE FRANCE.

EN CONCLUSION, LA SPECTROSCOPIE IRTF A DEMONTRE SA CAPACITE A DISCRIMINER *S. AUREUS* DES AUTRES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES ET SON POUVOIR A IDENTIFIER DES ISOLATS DE *S. AUREUS* COLLECTES DE LAITS ET DE FROMAGES. L'INFORMATION SPECTRALE OBTENUE NE PERMET PAS DE DISCRIMINER LES ISOLATS PRODUCTEURS DE CEUX QUI NE LE SONT PAS. LES ISOLATS PRODUCTEURS DE SED SONT LES SEULS QUI SEMBLENT POUVOIR ETRE DISCRIMINES SUR LA BASE DE LEUR INFORMATION SPECTRALE.

SYNTHESE DES RESULTATS

Un total de 1036 isolats de staphylocoques à coagulase positive a été collecté à partir de boîtes de BP-RPF au cours d'analyses de routine de fromages dans deux régions de France. Un total de 82,2% appartenait à l'espèce *S. aureus*, 13,3% à l'espèce *S. intermedius* et 4,5% à d'autres espèces de staphylocoques à coagulase négative. Les 852 isolats de *S. aureus* ont été classés en différents biotypes : A humain (25), B aviaire (11), C bovin (529), D lièvre (25) et inconnu (227). Les biotypes C bovin et inconnu étaient le plus souvent retrouvés. En ce qui concerne la production d'entérotoxines, au total, 6% des isolats de la collection AQS-Sa étaient producteurs de SEA à SEE *in vitro*. Pour augmenter le nombre d'isolats entérotoxigènes pour la suite de l'étude, 13 isolats collectés des même produits laitiers et 43 souches d'autres collections ont également été incluses. Ainsi, 105 isolats/souches producteurs d'entérotoxines *in vitro*, isolés de produits laitiers, d'autres aliments et d'origines non alimentaires, ont été recueillis au cours de l'étude.

Pour une caractérisation plus approfondie, 92 isolats/souches entérotoxigènes et 90 non entérotoxigènes ont été choisis, selon le biotype et la production d'entérotoxines *in vitro*. La recherche des gènes codant les entérotoxines (SEA et SEJ et TSST-1) dans 180 isolats/souches a révélé la présence de gènes dans 75 des isolats/souches originellement « non producteur » (de SEA à SEE). Seulement 12 des 180 isolats/souches analysés ne produisaient pas d'entérotoxines *in vitro* et ne possédaient aucun des gènes codant les entérotoxines.

La caractérisation de la collection par électrophorèse en champ pulsé, portant sur 111 isolats/souches, a démontré la grande diversité génétique des isolats/souches analysés. Néanmoins, les isolats producteurs de SED *in vitro* se distinguaient des autres isolats/souches, notamment des isolats/souches producteurs d'autres entérotoxines. L'analyse par rep-PCR sur les isolats producteurs de SED, avec les trois jeux d'amorces (REP, ERIC et RW3), a confirmé que ces isolats étaient génétiquement similaires, collectés sur trois types de fromage et de régions géographiquement distinctes. Ces résultats ont montré, néanmoins, la présence de trois souches différentes parmi les isolats/souches producteurs.

La spectroscopie IRTF s'est avéré capable de discriminer *S. aureus* des autres espèces de staphylocoques, mais également d'identifier les isolats/souches de la collection AQS-Sa en tant que *S. aureus*. Dans un deuxième temps, la capacité de la méthode à discriminer les isolats producteurs, des non producteurs d'entérotoxines *in vitro* a été évaluée. Cette méthode a effectivement permis de différencier les isolats producteurs de SED des autres isolats, mais n'a pas permis de distinguer les isolats/souches producteurs d'entérotoxines des isolats non producteurs. De plus, l'IRTF a confirmé les résultats obtenus en biologie moléculaire en montrant la présence de plusieurs souches parmi les isolats producteurs de SED mais toutefois, fortement liées génétiquement entre elles.

DISCUSSION

EN FRANCE, LA PRESENCE DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE, ET PLUS PARTICULIEREMENT *S. AUREUS*, DANS LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS EST UN PROBLEME RECURRENT. EN PARTICULIER, LES FROMAGES A PATE PRESSEE NON CUITE AU LAIT CRU, ET DANS UNE MOINDRE MESURE CEUX A PATE MOLLE, SONT SENSIBLES AU PROBLEME DE *S. AUREUS* (LAPEYRE, 1999 ; DE BUYSER *ET AL.*, 2001). LES NORMES EN FRANCE POUR LE DENOMBREMENT DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE (ISO 5944 : 2001 / FIL 60 : 2001) COMPORTENT UN COMPTAGE DES COLONIES SUR MILIEU SPECIFIQUE AVEC (BP) LA CONFIRMATION DE LA COAGULASE OU SANS (BP-RPF). DE PLUS, LE MILIEU BP-RPF EST RECOMMANDE POUR LE DENOMBREMENT DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE DANS LES FROMAGES AU LAIT CRU (DE BUYSER *ET AL.*, 1998). SUR CE MILIEU (STADHOUDERS *ET AL.*, 1976 ; SAWHNEY, 1986), LA PRESENCE DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE EST REVELEE PAR DES COLONIES NOIRES AVEC UN HALO DENSE. IL EST IMPORTANT DE NOTER QUE *S. AUREUS* N'EST PAS LA SEULE ESPECE DE STAPHYLOCOQUES A

COAGULASE POSITIVE. AINSI, AU COURS DE CE TRAVAIL, DES ISOLATS DE *S. INTERMEDIUS* ONT EGALEMENT ETE COLLECTES A PARTIR DE BP-RPF. D'AUTRES ETUDES ONT EGALEMENT MONTRE LA PRESENCE DE *S. INTERMEDIUS* ET D'AUTRES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE, TELLES QUE *S. HYICUS*, ISOLEES DE MAMMITES BOVINES (CAPURRO ET AL., 1999).

LES SOUCHES DE L'ESPECE *S. AUREUS*, PEUVENT ETRE SEPARÉES EN FONCTION DE L'HOTE AVEC LEQUEL ELLES SONT ASSOCIÉES, ELLES SONT ALORS ATTRIBUÉES A UN BIOTYPE. LE BIOTYPAGE DE LA COLLECTION AQS-SA A PERMIS DE MONTRER QU'ELLE ETAIT CONSTITUÉE PRINCIPALEMENT DU BIOTYPE C BOVIN, BIOTYPE SOUVENT RETROUVE DANS LE LAIT CRU DE VACHE (DEVRIESE ET OEDING, 1976 ; ROSEC ET AL., 1997 ; SESQUES ET BALLOT, 1998). APRES LE BIOTYPE C BOVIN, LE BIOTYPE LE PLUS REPANDU DANS LA COLLECTION EST LE BIOTYPE INCONNU, QUI S'EST AVERE ETRE LE PLUS SOUVENT UN BIOTYPE TRES PROCHE DU C BOVIN. LES AUTRES BIOTYPES (A HUMAIN, B AVIAIRE, C OVIN ET D LIEVRE) SONT EN PLUS FAIBLE POURCENTAGE. LEUR EXISTENCE DANS CE TYPE DE PRODUIT PEUT ETRE EXPLIQUEE PAR UNE CONTAMINATION D'ORIGINE HUMAINE ET PAR LA PRESENCE DE CERTAINS ANIMAUX A LA FERME. TOUTEFOIS, LE FAIBLE POURCENTAGE D'ISOLATS DE BIOTYPE A HUMAIN OBTENU (MOINS DE 3%) TRADUIT GLOBALEMENT DE BONNES PRATIQUES D'HYGIENE CHEZ LES PRODUCTEURS DES FROMAGES ETUDIÉS. L'ESPECE *S. INTERMEDIUS*, DONT QUELQUES ISOLATS ONT EGALEMENT ETE COLLECTES DE CES MEMES PRODUITS, EST L'ESPECE QUI EST LA PLUS SOUVENT RETROUVEE SUR DES CHIENS, MAIS EGALEMENT SUR DES CHEVAUX OU DES OISEAUX, ANIMAUX QUI PEUVENT ETRE RETROUVES A LA FERME (BAIRD-PARKER, 1990 ; BECKER ET AL., 2001). LA CONTAMINATION SE FAIT A LA FERME, CE QUI MET EN EVIDENCE LA POSSIBILITE DE TRANSFERT D'HOTE A HOTE (ADESIYUN ET AL., 1998).

AU TOTAL, 6% DES ISOLATS DE LA COLLECTION SONT CAPABLES DE PRODUIRE *IN VITRO*, UNE OU PLUSIEURS ENTEROTOXINES, DE SEA A SEE. CE POURCENTAGE D'ISOLATS PRODUCTEURS EST EN ACCORD AVEC LA LITTERATURE (AARESTRUP ET JENSEN, 1997 ; ROSEC ET AL., 1997), MEME SI LE POURCENTAGE PEUT VARIER, DE 6 A 70%, SELON LES ETUDES ET LES SOURCES D'ISOLEMENT (KENNY ET AL., 1993; MATSUNAGA ET AL., 1993; CARDOSO ET AL., 1999; LARSEN ET AL., 2000; HOLECKOVA ET AL., 2002). DANS LE CADRE DE CE TRAVAIL, LES ISOLATS PRODUCTEURS DE SED SE SONT AVERES PLUS NOMBREUX QUE CEUX PRODUCTEURS DE SEC, CONTRAIREMENT AUX RESULTATS DE ROSEC ET AL. (1997) QUI ONT DEMONTRE PLUS DE SOUCHES PRODUCTRICES DE SEC, MAIS A PARTIR DE DIVERS ALIMENTS : FROMAGES AU LAIT CRU, PLATS CUISINES, VIANDE DE PORC CRU OU CUITE, ETC. D'AUTRES ETUDES (TAKEUCHI ET AL., 1998; STEPHAN ET AL., 2001) ONT EGALEMENT RETROUVE PLUS DE SOUCHES, ISOLEES DE LAIT, PRODUCTRICES DE SEC.

SELON LE BIOTYPE DES ISOLATS, DES ETUDES ONT MONTRE QU'ILS N'ONT PAS LE MEME POUVOIR PATHOGENE. DE TOUS LES ISOLATS, CEUX DU BIOTYPE A SONT LE PLUS ENTEROTOXINOGENES (ISIGIDI ET AL., 1992 ; ROSEC ET AL., 1997) ET CEUX DE BIOTYPE C BOVIN, LE PLUS FAIBLEMENT (SESQUES, 1994 ; AARESTRUP ET JENSEN, 1997). LES BIOTYPES C OVIN ET D LIEVRE DE LA COLLECTION AQS-SA CONTIENNENT UN FORT POURCENTAGE D'ISOLATS ENTEROTOXINOGENES ET LE BIOTYPE D LIEVRE POSSEDE LE PLUS FORT POURCENTAGE DE CETTE COLLECTION. TRES PEU D'INFORMATIONS EXISTENT DANS LA LITTERATURE CONCERNANT LES SOUCHES DE BIOTYPE D LIEVRE (SESQUES, 1994).

GLOBALEMENT, LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE SONT SOUVENT PRESENTS DANS LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS, MAIS UN TRES FAIBLE POURCENTAGE EST ENTEROTOXINOGENE, CE QUI PEUT EXPLIQUER POURQUOI LES ENTEROTOXINES SONT

RAREMENT RETROUVEES DANS CE TYPE DE PRODUIT, MEME QUAND LE NIVEAU DE *S. AUREUS* DEPASSE 10^5 UFC/ML (MEYRAND ET VERNZOY-ROZAND, 1999).

COMPTE TENU DE LA DECOUVERTE DE NOMBREUSES « NOUVELLES » ENTEROTOXINES, LA RECHERCHE DE LA PRODUCTION DE SEA A SEE *IN VITRO* NE REPRESENTE PLUS LA CAPACITE REELLE DE PRODUCTION (POTENTIELLE) D'ENTEROTOXINES PAR *S. AUREUS*, (JARRAUD *ET AL.*, 2001 ; KURODA *ET AL.*, 2001 ; ORWIN *ET AL.*, 2001 ; ORWIN *ET AL.*, 2002 ; LETERTRE *ET AL.*, 2003A). LES SOUCHES POSSEDANT DES GENES CODANT UNE OU PLUSIEURS DE CES ENTEROTOXINES ONT ALORS LA CAPACITE DE LES PRODUIRE. CEPENDANT, CECI N'IMPLIQUE PAS FORCEMENT QUE CES SOUCHES SOIENT PRODUCTRICES *IN VITRO* ET A FORTIORI *IN VIVO* (SHARMA *ET AL.*, 2000 ; ZSCHÖCK *ET AL.*, 2000A ; CHEN *ET AL.*, 2001). LES GENES CODANT SEA A SEE, SEG A SEJ ET TSST-1 ONT ETE RECHERCHES DANS UNE SELECTION D'ISOLATS DE LA COLLECTION AQS-SA. FINALEMENT, UN TRES FORT POURCENTAGE D'ISOLATS (92% PARMI CEUX ANALYSES) POSSEDENT LA CAPACITE DE PRODUIRE DES ENTEROTOXINES, COMME IL A DEJA ETE DEMONTRE DANS D'AUTRES ETUDES (AKINEDEN *ET AL.*, 2001 ; ROSEC ET GIGAUD, 2002). TAKEUCHI *ET AL.* (1998) ONT TESTE DES ISOLATS DU LAIT DE VACHE POUR LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES ET 60% DES ISOLATS ETAIENT PRODUCTEURS DE TSST-1 ET SEC. NOUS AVONS RETROUVE LES MEMES POURCENTAGE D'ISOLATS POSSEDANT LES GENES CODANT TSST-1 ET SEC MAIS LA PLUPART NE LA PRODUISAIT PAS.

LES ENTEROTOXINES LES PLUS FREQUENTES DANS DES PRODUITS IMPLIQUES DANS DES TIAC, SONT SEA ET SED (BALABAN ET RASOOLY, 2000 ; FUEYO *ET AL.*, 2001). AUX ETATS-UNIS, 78% DES TIAC SONT DUES A SEA, SUIVIE PAR SED. DE MEME AU ROYAUME-UNI, SEA, SEA ET SED, ET SEC ET SED ONT ETE RESPONSABLES DE 57, 15 ET 8% RESPECTIVEMENT DES TIAC ENTRE 1969 ET 1990 (WIENEKE *ET AL.*, 1993). AU VU DU FORT POURCENTAGE REPRESENTANT LA TOTALITE DES TIAC DANS LESQUELLES SEA A SED ONT ETE IMPLIQUEES CES DERNIERES ANNEES, ON PEUT DEDUIRE QUE LES NOUVELLES ENTEROTOXINES NE SONT QUE RAREMENT MISES EN CAUSE DANS LES TIAC. EN REVANCHE, UNE RECHERCHE D'ENTEROTOXINES DANS DES ECHANTILLONS DE MINAS, UN FROMAGE BRESILIEN, IMPLIQUE DANS UNE TIAC, A MONTRE LA PRESENCE DE SEH. DE PLUS, MCLAUCHLIN *ET AL.* (2000) ONT TESTE DES ALIMENTS SUSPECTES D'ETRE LIES A DES TIAC, EN RECHERCHANT LA PRESENCE DE SEA A SED ET TSST-1, ET EGALEMENT EN RECHERCHANT LA PRESENCE DES GENES DES AUTRES ENTEROTOXINES. QUAND LES FRAGMENTS DE GENES ONT ETE DIRECTEMENT RECHERCHES DANS LES PRODUITS, LE GENE CODANT SEG ETAIT LE PLUS FREQUENT, SUIVI DE CELUI CODANT SEA. NEANMOINS, IL FAUT NOTER QUE LA PRESENCE DU GENE NE VEUT PAS NECESSAIREMENT DIRE QU'IL A ETE EXPRIME. DANS LES ECHANTILLONS PROVENANT DE FROMAGES, SEULEMENT SEA A ETE RETROUVEE. A LA LUMIERE DE NOS RESULTATS ET DE CEUX OBSERVES DANS LA LITTERATURE, UN FAIBLE POURCENTAGE D'ISOLATS ETANT PRODUCTEUR DE SEA A SEE *IN VITRO*, ET DONC DE SEA ET SED, LES RISQUES LIES A LA PRESENCE D'ENTEROTOXINES SONT TRES FAIBLES. AU JAPON OMOE *ET AL.*, (2002) ONT MENE UNE ETUDE SUR DES ISOLATS ISSUS DE PERSONNES MALADES OU EN BONNE SANTE, D'ALIMENTS IMPLIQUES DANS DES TIAC, DU LAIT CRU DE VACHE, ET DE VACHES. ILS ONT MONTRE QU'AUCUN DES ISOLATS POSSEDANT LES GENES CODANT SEG ET SEI, N'ONT PRODUIT LES ENTEROTOXINES A DES NIVEAUX DETECTABLES, MEME QUAND LES GENES ETAIENT TRANSCRITS.

UNE ETUDE DE ZHANG *ET AL.* (1998) A MIS EN EVIDENCE LA PRESENCE DU GENE CODANT SEJ SUR LE MEME PLASMIDE QUE LE GENE CODANT SED. ROSEC ET GIRAUD (2002) ONT EGALEMENT RETROUVE CES DEUX GENES ENSEMBLE. AU CONTRAIRE, NOS RESULTATS ONT

MONTRE L'EXISTENCE DE CERTAINS ISOLATS POSSEDANT LE GENE CODANT SEJ MAIS PAS CELUI CODANT SED. CECI PEUT ETRE LE RESULTAT DE FAUX NEGATIFS LIES A L'EXISTENCE DE VARIANTS POSSEDANT DES MUTATIONS DANS CERTAINS GENES CODANT LES ENTEROTOXINES (LETERTRE *ET AL.*, 2003B). DE PLUS, UNE AUTRE ETUDE A DEMONTRE LA POSSIBILITE DE PERDRE DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES (MOORE ET LINDSAY, 2001).

A L'ORIGINE, LES GENES CODANT SEG ET SEI ONT ETE TROUVES SUR DEUX SOUCHES DIFFERENTES (MUNSON *ET AL.*, 1998 ; MCLAUCHLIN *ET AL.*, 2000). CES DERNIERS RESULTATS SONT EN ACCORD AVEC CEUX OBTENUS PAR NOTRE ETUDE MAIS EGALEMENT CEUX OBTENUS PAR L'ETUDE DE MOORE ET LINDSAY (2001). DANS CES DEUX CAS, DES ISOLATS POSSEDANT LE GENE CODANT SEI ET PAS SEG, ET *VICE VERSA*, ONT ETE RETROUVES. NEANMOINS, CES DEUX GENES ONT EGALEMENT ETE RETROUVES CONJOINTEMENT PAR CERTAINS AUTEURS (JARRAUD *ET AL.*, 2001 ; ROSEC ET GIGAUD, 2002).

LA RECHERCHE DES GENES CODANT SEA A SEJ ET TSST-1 A DEMONTRE LA GRANDE DIVERSITE DE COMBINAISONS DE GENES RETROUVEES EN FONCTION DE L'ISOLAT (MUNSON *ET AL.*, 1998 ; MCLAUCHLIN *ET AL.*, 2000 ; MOORE ET LINDSAY, 2001 ; STEPHAN *ET AL.*, 2002)

UNE PARTIE DE LA COLLECTION D'ISOLATS AQS-SA A EGALEMENT ETE TYPÉE AVEC DES METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE AFIN D'APPRECIER SA DIVERSITE GENETIQUE. DEUX METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ONT ETE UTILISEES, EN PREMIER LIEU LA PFGE, ET PUIS LA REP-PCR POUR UN NOMBRE RESTREINT D'ISOLATS. L'OBJECTIF PRINCIPAL DE LA PFGE ETAIT DE MONTRER DES RELATIONS GENETIQUES POUVANT EXISTER ENTRE LES DIFFERENTS ISOLATS PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES D'UNE PART, ET ENTRE ISOLATS PRODUCTEURS ET NON PRODUCTEURS D'AUTRE PART. AKINEDEN *ET AL.* (2001) ONT MONTRE QUE CETTE TECHNIQUE AVAIT UN POUVOIR DISCRIMINANT SATISFAISANT POUR LES SOUCHES DE *S. AUREUS*. GLOBALEMENT, LA VARIETE GENETIQUE DE NOTRE COLLECTION (HORS BIOTYPES ET ENTEROTOXINES) EST EN ACCORD AVEC LA LITTERATURE, CONCERNANT LES SOUCHES COLLECTEES A PARTIR DE LAITS DE VACHE ET DE LAITS DE BREBIS (STEPHAN *ET AL.*, 2001 ; VAUTOR *ET AL.*, 2003). DANS LE CADRE DE NOS TRAVAUX, LA PFGE A MONTRE QU'UN PULSOTYPE POUVAIT CONTENIR SOIT PLUSIEURS ISOLATS DU MEME BIOTYPE, SOIT DES ISOLATS PRODUCTEURS D'UNE MEME ENTEROTOXINE, SOIT REGROUPER DES ISOLATS DE PLUSIEURS BIOTYPES OU PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES DIFFERENTES. LES TRAVAUX PHYLOGENETIQUES BASES SUR LE SEQUENÇAGE DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES PEUVENT EXPLIQUER CERTAINS REGROUPEMENTS (BALABAN ET RASOOLY, 2000). LES ENTEROTOXINES SEA A SEE PEUVENT ETRE DIVISEES EN DEUX GROUPES DISTINCTS, L'UN CONSTITUE DE SEA, SED ET SEE ET L'AUTRE DE SEB ET SEC. CERTAINS PULSOTYPES DE LA COLLECTION AQS-SA CONTIENNENT DES ISOLATS PRODUCTEURS DE SEA ET DE SEA ET SED, CE QUI N'EST PAS ETONNANT AU VU DES RELATIONS PHYLOGENETIQUES. IL SEMBLE AINSI QUE CERTAINS PULSOTYPES NE REGROUPENT QUE DES ISOLATS PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES APPARTENANT A UN MEME GROUPE PHYLOGENETIQUE. CEPENDANT, UNE ETUDE RECENTE DE HENNEKINNE *ET AL.*, (2003B), A MONTRE CERTAINES SIMILITUDES ENTRE LE PULSOTYPE ET LE BIOTYPE, PLUS PARTICULIEREMENT LE BIOTYPE « ABATTOIR », CE QUI N'A PAS ETE CONFIRME PAR NOS RESULTATS. EN REVANCHE, NOS TRAVAUX ONT MIS EN EVIDENCE LE POUVOIR DISCRIMINANT DE LA METHODE POUR LES ISOLATS PRODUCTEURS DE SED, QUI SE REGROUPENT DANS UN MEME PULSOTYPE. CE RESULTAT N'AVAIT JAMAIS ETE OBSERVE JUSQU'A MAINTENANT. DANS LE MEME REGISTRE, UNE ETUDE DE STEPHAN *ET AL.* (2001) A MONTRE DES SIMILITUDES GENETIQUES ENTRE DES ISOLATS PRODUCTEURS DE SEC COLLECTES SUR VACHES

SOUFFRANT DE MAMMITE (19 SUR 23 POSSEDANT LE MEME PULSOTYPE), ET AYANT LES PROFILS OBTENUS AVEC LA PFGE TRES PROCHES.

LA TECHNIQUE REP-PCR A ETE UTILISEE POUR AFFINER LA CARACTERISATION DES ISOLATS PRODUCTEURS DE SED. CES ISOLATS ETAIENT TRES PROCHES, MAIS CETTE TECHNIQUE MONTRE QUELQUES DIFFERENCES ENTRE EUX. NOUS AVONS PU DISTINGUER AU MOINS TROIS SOUCHES, MEME SI ELLES SEMBLENT FORTEMENT LIEES GENETIQUEMENT. UNE ÉTUDE DE VAN DER ZEE *ET AL.* (1999), A DEJA DEMONTRE QUE LA REP-PCR CONFIRMAIT LA DISCRIMINATION ETABLIE PAR LA PFGE, TOUT EN UTILISANT D'AUTRES AMORCES. UNE ETUDE DE BLANC *ET AL.* (2001) A EGALEMENT DEMONTRE QUE LA DIFFERENTIATION DE LA PCR ETAIT EN CONCORDANCE AVEC CELLE DE LA PFGE, AVEC DES SOUCHES DE *S. AUREUS* RESISTANTES A LA METHICILLINE.

LA PFGE ET LA PCR ONT DEMONTRE QUE TROIS SOUCHES DE LA COLLECTION AQS-SA, PRODUCTEURS DE SED, PROVENANT D'UN MEME ATELIER. CES TROIS SOUCHES ONT SUBSISTE AU COURS DU TEMPS, PUISQU'ELLES ONT ETE ISOLEES DE LAIT, DE FROMAGES ET DE L'ENVIRONNEMENT DU MEME ATELIER, SUR UNE PERIODE D'UN MOIS.

LA SPECTROSCOPIE IRTF A ETE TESTEE POUR SES CAPACITES DE DISCRIMINATION, D'IDENTIFICATION ET DE CARACTERISATION DE *S. AUREUS*. CETTE METHODE POSSEDE UN BON POUVOIR DE DISCRIMINATION DES MICRO-ORGANISMES AU NIVEAU ESPECE ET MEME AU NIVEAU SOUCHE, COMME CELA A DEJA ETE MONTRE DANS D'AUTRES ETUDES (BEATTIE *ET AL.*, 1998 ; KÜMMERLE *ET AL.*, 1998 ; LEFIER *ET AL.*, 2000). HELM *ET AL.* (1991B), ONT DEMONTRE LA CAPACITE DE CETTE METHODE A DISCRIMINER DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE DE CEUX A COAGULASE NEGATIVE. NOS TRAVAUX ONT VALIDE LA CAPACITE DE LA SPECTROSCOPIE IRTF A DISCRIMINER *S. AUREUS* DES AUTRES ESPECES DE STAPHYLOCOQUES, MAIS EGALEMENT SON POUVOIR D'IDENTIFIER DES ISOLATS DE *S. AUREUS* COLLECTES DE LAIT CRU ET DE FROMAGES AU LAIT CRU, UN POINT IMPORTANT AU VU DES PROBLEMES D'IDENTIFICATION DUS A LA PRESENCE D'AUTRES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE SUR LE MILIEU BP-RPF (CAPURRO *ET AL.*, 1999).

DANS UN DEUXIEME TEMPS, LA SPECTROSCOPIE IRTF A ETE TESTEE POUR DISCRIMINER LES ISOLATS DE *S. AUREUS* PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES *IN VITRO* DES NON PRODUCTEURS. CETTE METHODE N'A PAS PERMIS DE DISCRIMINER LES DEUX GROUPES, SELON LEUR CAPACITE A PRODUIRE SEA A SEE. DEPUIS QUE LES ENTEROTOXINES DITES « NOUVELLES » SONT CONNUES, IL APPARAÎT QUE LE POTENTIEL DE PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DES SOUCHES EST ACCRU. DE MEME, LES SPECTRES IRTF DES ISOLATS PRODUCTEURS DE SEC SONT PROCHES DE CEUX QUI SONT NON PRODUCTEURS. CECI POURRAIT ETRE EXPLIQUE PAR LE FAIT QUE DANS BEAUCOUP DE CAS, LE GENE SEC N'EST PAS EXPRIME. PAR AILLEURS, LA SPECTROSCOPIE IRTF N'A PAS PU DISCRIMINER LES DEUX GROUPES D'ISOLATS POTENTIELLEMENT PRODUCTEURS ET NON PRODUCTEURS EN INCLUANT LES « NOUVELLES » ENTEROTOXINES, PEUT-ETRE PARCE QUE D'AUTRES GENES CODANT DES ENTEROTOXINES TELLES QUE SEK, SEL, SEM, ETC. ONT ETE DECOUVERTS CES DERNIERES ANNEES (LINDSAY *ET AL.*, 1998 ; JARRAUD *ET AL.*, 2001 ; KURODA *ET AL.*, 2001). OR CES GENES N'ONT PAS ETE RECHERCHES AU COURS DE NOTRE TRAVAIL. TOUTEFOIS, CETTE TECHNIQUE A PERMIS DE RENFORCER LES RESULTATS OBTENUS EN BIOLOGIE MOLECULAIRE AVEC LA METHODE DE LA REP-PCR. LA REP-PCR PRESENTAIT LES ISOLATS DE LA COLLECTION AQS-SA PRODUCTEURS DE SED COMME ETANT UN GROUPE D'AU MOINS TROIS SOUCHES DIFFERENTES, MAIS FORTEMENT LIEES GENETIQUEMENT. LA SPECTROSCOPIE IRTF A CONFIRME LA PRESENCE DE PLUSIEURS SOUCHES. CETTE CONCORDANCE ENTRE LES METHODES « CLASSIQUES » D'IDENTIFICATION ET LA

SPECTROSCOPIE IRTF, POUR CERTAINES ESPECES DE MICROORGANISMES, A DEJA ETE MONTREE AUX NIVEAUX PHENOTYPIQUE ET GENETIQUE (KIRSCHNER *ET AL.*, 2001 ; WEINRICHTER *ET AL.*, 2001).

CETTE PREMIERE ETAPE DU TRAVAIL A DEMONTRE LA GRANDE DIVERSITE PHENOTYPIQUE (DE BIOTYPES ET D'ISOLATS PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*) ET GENETIQUE, DES ISOLATS DE *S. AUREUS* COLLECTES A PARTIR DE LAIT ET DE FROMAGES AU LAIT CRU. CEPENDANT, LES DIFFERENCES OBSERVEES ENTRE LES SPECTRES IRTF NE SEMBLANT PAS ETRE DIRECTEMENT LIEES A L'ENTEROTOXINE. LES LIENS SEMBLANT ETRE BEAUCOUP PLUS COMPLEXES. LA SPECTROSCOPIE IRTF A PERMIS DE DIFFERENCIER, EN PARTIE, LES ISOLATS PRODUCTEURS DE SED DES AUTRES ISOLATS PRODUCTEURS ET NON PRODUCTEURS, ET DE RENFORCER LES RESULTATS OBTENUS PAR REP-PCR.

LA GRANDE DIVERSITE DE BIOTYPES ET D'ENTEROTOXINES PRODUITES *IN VITRO*, ET LA VARIABILITE GENETIQUE (29 PULSOTYPES DIFFERENTS) DE LA COLLECTION AQS-SA, VA NOUS PERMETTRE DE SELECTIONNER DES ISOLATS AYANT DES PROPRIETES DIFFERENTES. L'UTILISATION DE CES ISOLATS EN FABRICATION FROMAGERE EXPERIMENTALE VA NOUS PERMETTRE D'APPREHENDER LES CONDITIONS ET LES FACTEURS TECHNOLOGIQUES FAVORISANT LA PRODUCTION DES ENTEROTOXINES.

Résultats et Discussion – Partie II

**A - Production d'entérotoxines staphylococciques dans un fromage
modèle à pâte pressée non cuite**

**B - PRODUCTION D'ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES DANS DES FROMAGES
EXPERIMENTAUX SIMULANT TROIS TECHNOLOGIES TRADITIONNELLES**

TABLEAU XXXIII : CHOIX DES ISOLATS POUR LES FABRICATIONS DU FROMAGE MODELE.

Isolat	Pulsotype*	Biotype	Production d'entérotoxines**	Lieu*** d'isolement	Fromage
1	P16	Inconnu	A (++)		11
2	P14	A humain	AD (++++)		12
3	P15	Inconnu	A (+++)	1F	13
4	P21	Inconnu	A (++)	1L	14
5	P12	A humain	AD (++++)	1F	21
6	P39	Inconnu	A (+)	2F	22
7	P1	A humain	D (+++)	1E	23
8	P1	C bovin	D (++++)	4F	24
9	P1	A humain	D (++++)	1F	31
10	P1	A humain	D (++++)	1L	32
11	P1	A humain	D (++++)	4F	33
12	P1	C bovin	D (++)	4F	34
13	P4	D lièvre	C (+)	3F	41
14	P1	D lièvre	D (++++)	1F	42
15	P9	C ovin	C (++++)	1L	43
16	P11	B aviaire	C (+++)	4F	44
17	P32	C ovin	C (++++)	5L	51
18	P41	D lièvre	B (++++)	2F	52
19	P50	A humain	B (++)	2F	53
20	P13	Inconnu	BD (++++)	2F	54
21	P20	A humain	AB (++++)		61
22	P11	Inconnu	CD (++)	4F	62
23	P43	A humain	A (++)		63
24	P46	Inconnu	A (++)		
25	P21	Inconnu	A (+)		
26	P35	C ovin	C (+++)		
27	P36	C ovin	C (+++)		
28	P42	A humain	C (+++)		
29	P49	Inconnu	C (+++)		

* pulsotype obtenu par électrophorèse en champ pulsé ; ** + = très faiblement producteur ; ++ = faiblement producteur ; +++ = fortement producteur ; ++++ = très fortement producteur. Les niveaux de production d'entérotoxines *in vitro* des isolats ont été choisis en fonction de la densité optique obtenue avec le kit Transia (approche semi-quantitative). *** 1 à 5 = variété de fromage ; E = environnement ; L = lait ; F = fromage.

A – Production d'entérotoxines staphylococciques dans un fromage modèle à pâte pressée non cuite

L'objectif principal de cette partie était d'évaluer l'aptitude d'une sélection d'isolats de *S. aureus*, de la collection AQS-Sa, à se développer et à produire des entérotoxines dans un fromage modèle à pâte pressée non cuite.

2. CHOIX DES ISOLATS EN VUE DES FABRICATIONS FROMAGERES

LES ISOLATS ONT ETE CHOISIS SELON LES CRITERES SUIVANTS :

- production de différentes entérotoxines, plus particulièrement SEA et SED,
- différents niveaux de production d'entérotoxines,
- biotypes différents.

Des isolats de biotype A humain (produisant de SEA) et un isolat responsable d'une TIAC impliquant du fromage ont été privilégiés.

LES ISOLATS PRODUCTEURS DE SEA OU SED, ONT ETE PRIVILEGIES, CAR CES ENTEROTOXINES SONT LES PLUS FREQUENTS DANS LES ALIMENTS IMPLIQUES DANS LES TIAC. LES ISOLATS COLLECTES AU COURS DU PROGRAMME AQS-SA ONT ETE PRIVILEGIES, MAIS UN ISOLAT PROVENANT D'UNE TIAC A ETE RETENU CAR IL EST CONNU POUR PRODUIRE DES ENTEROTOXINES DANS LE FROMAGE. LES ISOLATS ONT EGALEMENT ETE SELECTIONNES EN FONCTION DE LA QUANTITE D'ENTEROTOXINES PRODUITE *IN VITRO*. EN PLUS DE CES CRITERES DE CHOIX, LE PULSOTYPE ET LE BIOTYPE ONT EGALEMENT ETE PRIS EN COMPTE, POUR ESSAYER DE RESPECTER UN EQUILIBRE. SEPT ISOLATS DU PULSOTYPE P1 ONT ETE RETENUS POUR ETRE TESTES DANS LE FROMAGE MODELE, MAIS LES ISOLATS CHOISIS SONT DE BIOTYPES DIFFERENTS OU COLLECTES DE FROMAGES ET DE REGIONS DIFFERENTS. LES QUATRE ISOLATS COLLECTES DANS LE MEME LIEU (CODE ORIGINE 1) PROVENAIENT SOIT DU LAIT, SOIT DU FROMAGE, SOIT DE L'ENVIRONNEMENT. DE PLUS, UN DES QUATRE A UN PROFIL DIFFERENT AVEC LA REP-PCR (ISOLAT 9). LES ISOLATS CHOISIS SONT PRESENTES DANS LE TABLEAU XXXIII.

CROISSANCE DES ISOLATS SUR LAIT

LES ISOLATS ONT ETE COLLECTES A PARTIR DU LAIT ET DU FROMAGE, CEPENDANT PAR PRECAUTION, AVANT DE COMMENCER LES FABRICATIONS FROMAGERES, LEUR APTITUDE A SE DEVELOPPER SUR LAIT A ETE EVALUEE. CETTE CROISSANCE A ETE MESUREE DANS DU LAIT RECONSTITUE (LAIT G), AVEC UN INOCULUM DE DEPART DE 10^4 UFC/ML, A 32°C PENDANT 24 H. LA CROISSANCE A ETE SUIVIE APRES INOCULATION, A 2, 5 ET 24 H, ET DEUX ESSAIS ONT ETE REALISES PAR ISOLAT.

TABLEAU XXXIV : RESULTATS DE L'ANALYSE DE LA VARIANCE DE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* SUR LAIT G EN FONCTION DE L'ENTEROTOXINE ET DU BIOTYPE.

Poly(temps,2)		penne 23.0115 ***	courbure -1.8310 ***						
Entérotoxine		A 6.1805 NS	AB 5.9877 NS	AD 5.9447 NS	B 6.1207 NS	BD 6.4635 •	C 5.7746 *	CD 6.6180 **	D 6.0345 NS
Biotype		A 6.1805 NS	B 6.6652 *	Cb 6.2316 NS	Co 5.9308 •	D 5.9718 •	Inconnu 5.7479 **	** NS	NS
Entérotoxine*poly(temps,2)	Pente	6.1805 NS	8.1272 NS	10.6533 **	7.4015 NS	5.7645 NS	6.9305 NS	5.3656 NS	9.5349 *
	Courbure	6.1805 NS	4.3197 NS	8.6430 •	6.8095 NS	7.2046 NS	5.4039 NS	5.6266 NS	4.6186 NS
Biotype*poly(temps,2)	Pente	6.1805 NS	8.7584 NS	5.5891 NS	11.3749 ***	7.8378 NS	9.8195 ***		
	Courbure	6.1805 NS	8.3749 •	6.7952 NS	7.3007 NS	7.2522 NS	6.1315 NS		

*** p<0,0001 ; ** p<0,001 ; * p<0,005 ; • p<0,1 ; NS non significatif

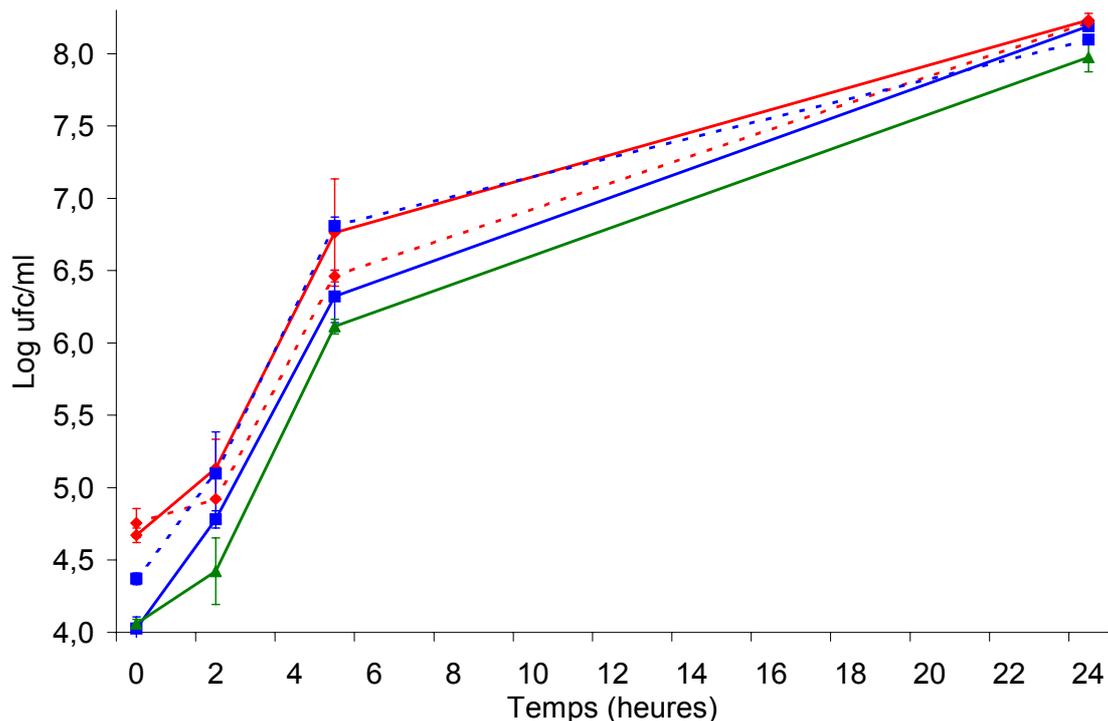


Figure 19 : courbes de suivi de la croissance sur lait G de cinq isolats de *S. aureus*. Isolat 1 (—◆—) ; isolat 6 (—■—) ; isolat 13 (—▲—) ; isolat 18 (---◆---) ; isolat 21 (---■---).

AUCUN DES 29 ISOLATS N' A EU DE DIFFICULTE A CROITRE DANS LE LAIT RECONSTITUE. UNE SELECTION DE COURBES DE CROISSANCE CARACTERISTIQUES EST PRESENTEE DANS LA FIGURE 19. LES ENSEMENCEMENTS DE DEPART VARIAIENT DE $2,3 \times 10^3$ UFC/ML A $6,3 \times 10^4$ UFC/ML AVEC UN NIVEAU MOYEN DE $2,4 \times 10^4$ UFC/ML. LES ISOLATS SE SONT BIEN DEVELOPPES EN 24 H A 32°C , AVEC UNE POPULATION QUI VARIAIT DE $1,2 \times 10^7$ A $6,6 \times 10^8$ UFC/ML ($1,9 \times 10^8$ UFC/ML EN MOYENNE). POUR LA PLUPART DES ISOLATS, LA POPULATION A AUGMENTE DE 4 LOG UFC/ML EN 24 H.

LE TYPE D'ENTEROTOXINE PRODUITE *IN VITRO* ET LE BIOTYPE DE L'ISOLAT AVAIENT UN EFFET SIGNIFICATIF ($P < 0,001$) SUR LES NIVEAUX DE POPULATIONS DE *S. AUREUS*, ET LA CINETIQUE DE CROISSANCE (TABLEAU XXXIV). CEPENDANT, LES EFFETS DU BIOTYPE ET DU TYPE D'ENTEROTOXINE N'ETAIENT PAS COMPLETEMENT INDEPENDANTS, PUISQUE LES ISOLATS DE BIOTYPE INCONNU PRODUISENT MAJORITAIREMENT LA SEA.

LES ISOLATS DE BIOTYPES A HUMAIN, B AVIAIRE ET C BOVIN AVAIENT EN MOYENNE UNE POPULATION SUPERIEURE AUX ISOLATS DE BIOTYPES C OVIN, D LIEVRE ET INCONNU. PAR CONTRE, LES ISOLATS DE BIOTYPE C OVIN ($P < 0,01$), DE BIOTYPE D LIEVRE ($P < 0,1$) ET BIOTYPE INCONNU ($P < 0,001$) AVAIENT UNE PENTE DE LA COURBE DE CROISSANCE PLUS FORTE QUE CEUX DE BIOTYPE A HUMAIN, ET DONC UNE AUGMENTATION DE LA POPULATION AU COURS DE LA CULTURE PLUS ELEVEE (TABLEAU XXXIV).

LES ISOLATS PRODUCTEURS DE SEA AVAIENT EN MOYENNE UNE POPULATION SUPERIEURE AUX ISOLATS PRODUCTEURS DE SEC ($P < 0,01$), MAIS INFERIEURE AUX PRODUCTEURS DE SEC+SED ($P < 0,01$). LES ISOLATS PRODUCTEURS DE SED ($P < 0,001$), AINSI QUE LES PRODUCTEURS DE SEA+SED ($P < 0,01$) AVAIENT UNE PENTE DE LA COURBE DE CROISSANCE PLUS FORTE QUE LES PRODUCTEURS DE SEA. LES PRODUCTEURS DE SEA+SED

PRESENTAIENT EGALEMENT UNE CROISSANCE PLUS RAPIDE AU DEBUT ($P < 0,05$) QUE LES PRODUCTEURS DE SEA (TABLEAU XXXIV).

EN FONCTION DU BIOTYPE ET DE L'ENTEROTOXINE PRODUITE *IN VITRO*, LES ISOLATS N'AVAIENT PAS LES MEMES TAUX DE POPULATIONS OU LES MEMES CINETIQUES DE CROISSANCE. LES ISOLATS N'AVAIENT AUCUN PROBLEME A CROITRE DANS DU LAIT. COMPTE TENU DE CES RESULTATS, LES 23 PREMIERS ISOLATS ONT ETE RETENUS POUR EVALUER LEUR APTITUDE A SE DEVELOPPER ET A PRODUIRE DES ENTEROTOXINES DANS LE FROMAGE MODELE.

FROMAGE MODELE

LES FABRICATIONS SE SONT DERouleES DANS LA FROMAGERIE EXPERIMENTALE DE L'INRA DE POLIGNY ET ONT ETE REALISEES AVEC DU LAIT MICROFILTRE DONT LA CREME A ETE PASTEURISEE POUR S'AFFRANCHIR EN GRANDE PARTIE DE LA FLORE NATURELLE DU LAIT CRU ET EGALEMENT, DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE PRESENTS DANS LE LAIT INITIAL.

QUALITE MICROBIOLOGIQUE DU LAIT

LA FLORE AEROBIE A 30°C DU LAIT CRU INITIAL ETAIT DE $1,7 \times 10^5$ UFC/ML $\pm 1,4$ EN MOYENNE. APRES MICROFILTRATION DU LAIT ECREME ET PASTEURISATION DE LA CREME, LA FLORE TOTALE A ETE DIVISEE ENVIRON D'UN FACTEUR DE 40, POUR ATTEINDRE EN MOYENNE $3,8 \times 10^3$ UFC/ML $\pm 2,2$ DANS LE LAIT DE FABRICATION. LA POPULATION DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE SE TROUVAIT A UN NIVEAU NON DETECTABLE (< 1 UFC/ML) DANS LE LAIT DE FABRICATION. ELLE ETAIT A UN NIVEAU MOYEN DE 400 UFC/ML DANS LE LAIT CRU INITIAL.

ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

LES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES FROMAGES MODELES ONT ETE EFFECTUEES A J+1 (AU DEMOULAGE ET AVANT SAUMURAGE) ET A J+15 (FIN D’AFFINAGE). LES RESULTATS SONT PRESENTES DANS LE TABLEAU XXXV.

TABLEAU XXXV : RESULTATS DES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES FROMAGES MODELES.

Stade	ES* (%)	G/S** (%)	HFD***(%)	Taux de sel dans l'eau (%)
J+1	51,3 ± 0,7	50,3 ± 0,5	65,6 ± 0,7	
J+15	53,6 ± 1,0	49,3 ± 0,4	63,1 ± 0,9	3,1 ± 0,14

* ES : Extrait sec ; ** G/S : Gras/sec ; *** HFD : humidité dans le fromage dégraissé.

LE POURCENTAGE DE GRAS SUR SEC A PEU VARIE ENTRE LE DEBUT ET LA FIN D’AFFINAGE, TANDIS QUE L’EXTRAIT SEC A AUGMENTE LEGEREMENT ET L’HUMIDITE DANS LE FROMAGE DEGRAISSE A BAISSÉ.

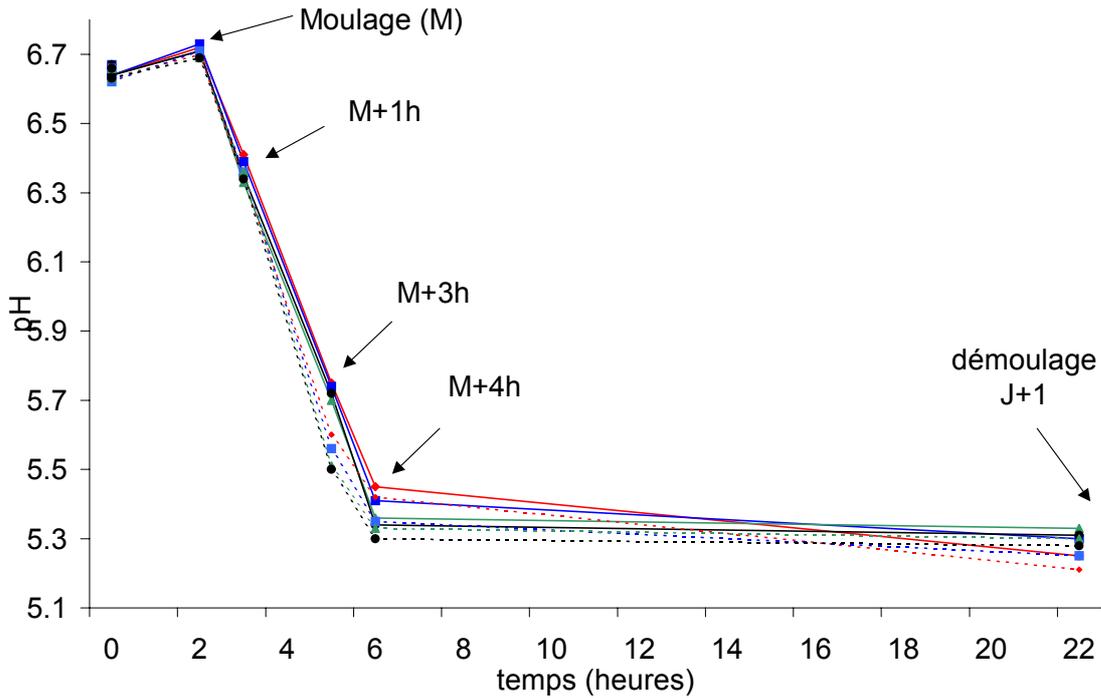


Figure 20 : courbes d'évolution du pH au cours de la fabrication des fromages modèles. Isolat 1 (—◆—); isolat 2 (—■—); isolat 3 (—▲—); isolat 4 (—●—); isolat 5 (---◆---); isolat 6 (---■---); isolat 7 (---▲---); isolat 8 (---●---).

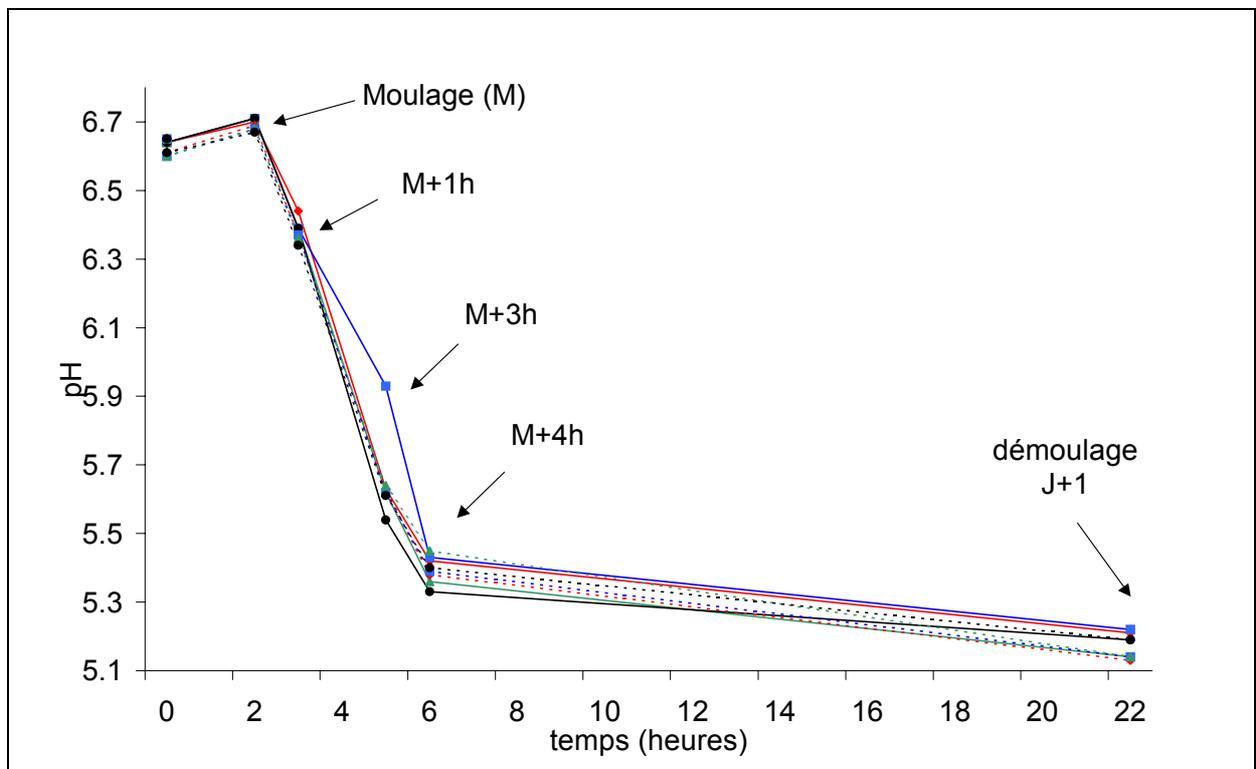


Figure 21 : courbes d'évolution du pH au cours de la fabrication des fromages modèles. Isolat 9 (—◆—); isolat 10 (—■—); isolat 11 (—▲—); isolat 12 (—●—); isolat 13 (---◆---); isolat 14 (---■---); isolat 15 (---▲---); isolat 16 (---●---).

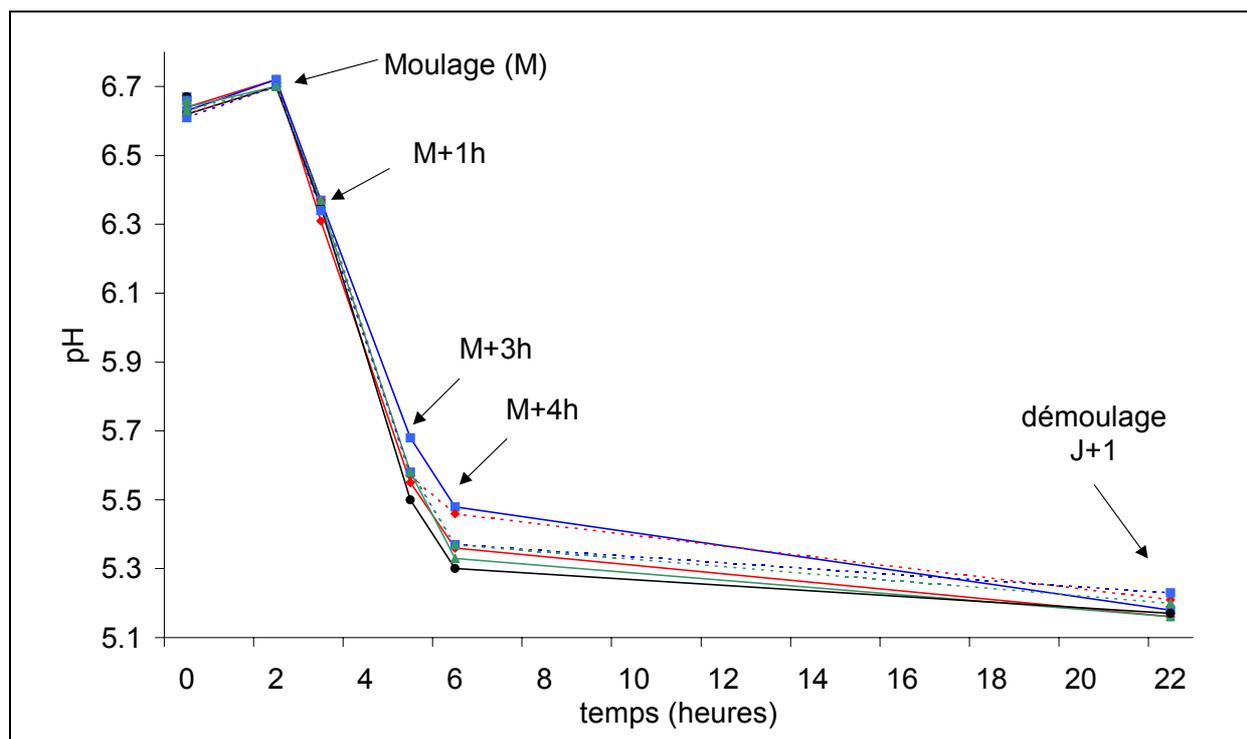


Figure 22 : courbes d'évolution du pH au cours de la fabrication des fromages modèles. Isolat 17

(—◆—) ; isolat 18 (—■—) ; isolat 19 (—▲—) ; isolat 20 (—●—) ; isolat 21 (---◆---) ; isolat 22 (---■---) ; isolat 23 (---▲---).

EVOLUTION DU PH

LES COURBES DE PH OBTENUES SONT PRESENTEES DANS LES FIGURES 20, 21 ET 22. LE PH INITIAL MOYEN DU LAIT DE FABRICATION ETAIT DE $6,66 \pm 0,01$. ENTRE LE LAIT EN CUVE (ENSEMENCE EN LEVAIN ET EN *S. AUREUS*) ET LE SOUTIRAGE DU CAILLE, UNE FAIBLE AUGMENTATION DU PH A $6,70 \pm 0,02$ (MOYENNE DES 23 FABRICATIONS) S'EST PRODUITE (LIEE AU DELACTOSAGE). AU STADE MOULAGE (M) +1 H, LE PH MOYEN DU CAILLE ETAIT DE $6,37 \pm 0,03$, A M+3 H IL ETAIT DE $5,62 \pm 0,10$, A M+4 H DE $5,38 \pm 0,05$ ET A J+1 DE $5,23 \pm 0,04$. LA PENTE D'ACIDIFICATION LA PLUS FORTE SE SITUAIT ENTRE LES STADES M+1 H ET M+3 H, LA PLUS FAIBLE ENTRE LES STADES M+4 H ET J+1. LE PH DES FROMAGES EST RESTE PRESQUE STABLE JUSQU'A FIN AFFINAGE AVEC UNE MOYENNE DE $5,23 \pm 0,04$ (MINIMUM 5,14 ET MAXIMUM 5,28) A J+15. L'ANALYSE STATISTIQUE A PERMIS DE NOTER UN EFFET « JOUR » AUX STADES M+3 H ($P < 0,001$) ET J+1 ($P < 0,001$). C'EST AU PREMIER JOUR DE FABRICATION QUE LE PH A M+3 H ETAIT EN MOYENNE LE PLUS ELEVE, 5,73. A J+1, LES FROMAGES DES DEUX PREMIERS JOURS DE FABRICATION (ENSEMENCES AVEC LES ISOLATS 1 A 8) PRESENTAIENT LES MOYENNES DE PH LES PLUS ELEVEES, 5,30 ET 5,26, RESPECTIVEMENT.

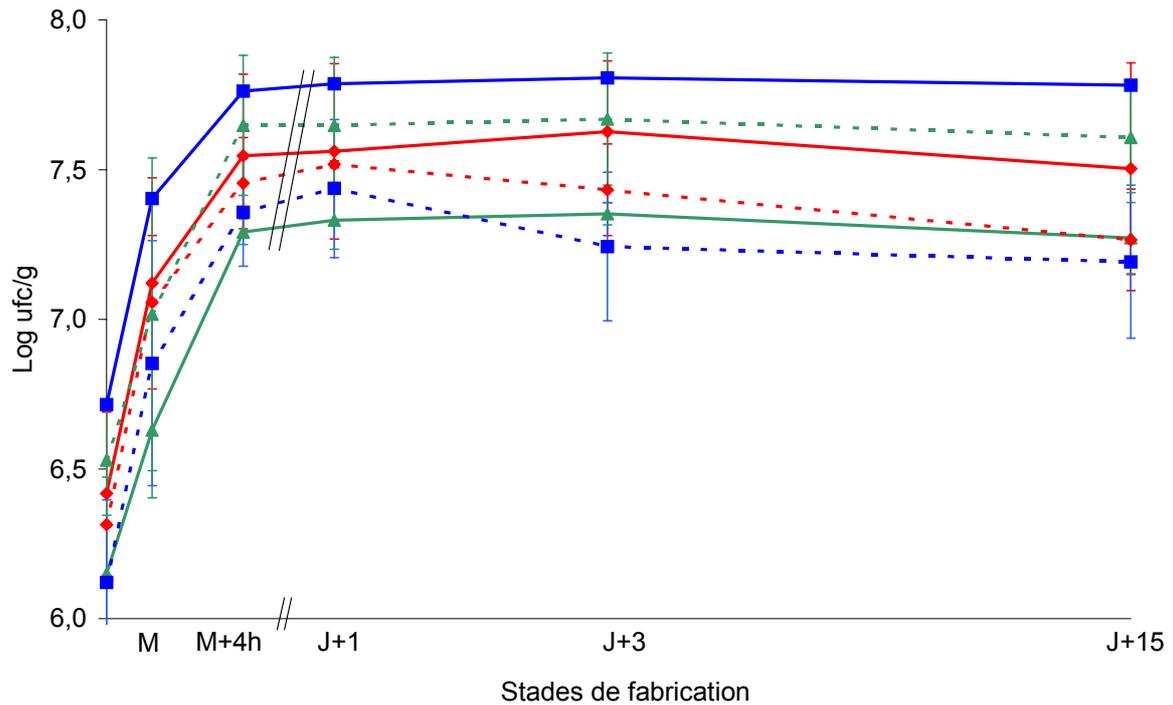


Figure 23 : courbes de croissance (moyennes par biotype) de *S. aureus* au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages modèles. Isolats 2, 5, 7, 9, 10, 11, 19, 21, 23 : biotype A humain (—◆—) ; isolat 16 : biotype B aviaire (—■—) ; isolats 8,12 : biotype C bovin (—▲—) ; isolats 15, 17 : biotype C ovin (—◆—) ; isolats 13, 14, 18 : biotype D lièvre (—■—) ; isolats 1, 3, 4, 6, 20, 22 : biotype inconnu (—▲—). *La population de l'inoculum de départ a été multipliée par 10 (pour s'affranchir du facteur de concentration).*

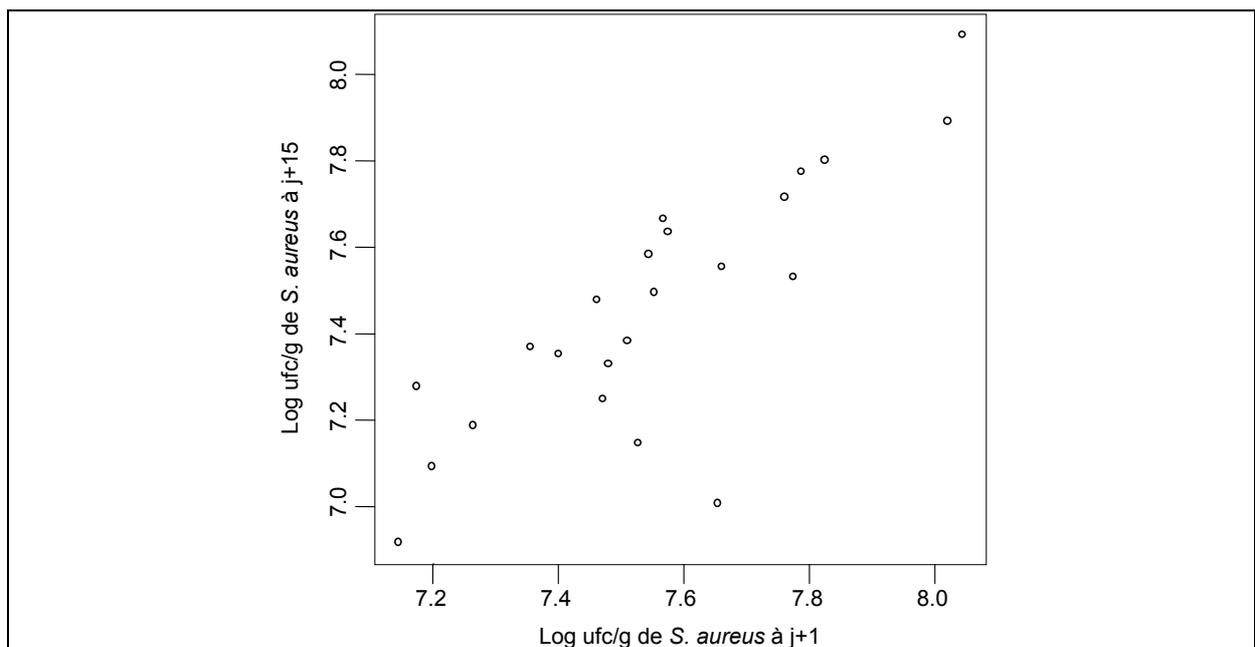


Figure 24 : représentation de la corrélation entre les populations de *S. aureus* aux stades J+1 et J+15 des fabrications des fromages modèles.

EVOLUTION DES POPULATIONS DE *S. AUREUS*

LE NIVEAU D'INOCULATION EN CUVE DES ISOLATS DE *S. AUREUS* A ETE FIXE A 10^5 UFC/ML, AFIN DE FAVORISER LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES. UN ESSAI PREALABLE A ETE CONDUIT POUR EVALUER LE VOLUME DE CULTURE DE *S. AUREUS* A INOCULER DANS LE LAIT DE FABRICATION POUR ATTEINDRE LA POPULATION DESIREE DE 10^5 UFC/ML.

LE NIVEAU INITIAL DES ISOLATS ETAIT DE $2,4 \times 10^5$ UFC/ML ± 2 EN MOYENNE POUR LES 23 FABRICATIONS, NEANMOINS POUR LA PLUPART DES ISOLATS LA POPULATION INITIALE DE *S. AUREUS* ETAIT COMPRISE ENTRE $1,6 \times 10^5$ ET $4,0 \times 10^5$ UFC/ML. CES DIFFERENCES DANS L'INOCULUM DE DEPART SONT LIEES A LA PREPARATION DE L'ISOLAT AINSI QU'A SA CROISSANCE.

L'EVOLUTION DES ISOLATS DE *S. AUREUS* AU COURS DE LA FABRICATION ET DE L'AFFINAGE DU FROMAGE MODELE, EN FONCTION DU BIOTYPE (MOYENNES PAR BIOTYPE) EST PRESENTEE DANS LA FIGURE 23. DES STADES DE FABRICATION EVALUES, LES ISOLATS AVAIENT ATTEINT UNE POPULATION LE PLUS ELEVEE AU STADE M+4 H (FIN PRESSAGE), AVEC UN NIVEAU MOYEN DE $3,4 \times 10^7$ UFC/G $\pm 2,5$, LE MINIMUM POUR L'ISOLAT 19 ETANT DE $1,3 \times 10^7$ UFC/G ET LE MAXIMUM POUR L'ISOLAT 2 DE $1,1 \times 10^8$ UFC/G. LA MAJORITE DES ISOLATS AVAIT ATTEINT UNE POPULATION AUTOUR DE 10^7 UFC/G, 2 H SEULEMENT APRES INOCULATION.

ENTRE LE LAIT EN CUVE ENSEMENCE ET LE CAILLE APRES EGOUTTAGE, IL EXISTE UN FACTEUR DE CONCENTRATION D'ENVIRON DIX DES MICRO-ORGANISMES (10L DE LAIT POUR 1KG DE FROMAGE APPROXIMATIVEMENT). EN GENERAL, LA POPULATION DE LA PLUPART DES ISOLATS, A AUGMENTE DE 1 LOG EN 2 H, EN TENANT COMPTE DU FACTEUR DE CONCENTRATION. NEANMOINS, CERTAINS ISOLATS ONT EU PLUS DE DIFFICULTE A CROITRE, PAR EXEMPLE LE NIVEAU DES POPULATIONS DES ISOLATS 4 ET 12, AVAIT AUGMENTE SEULEMENT DE 0,5 LOG EN 2 H. L'ISOLAT 6, S'EST TRES PEU DEVELOPPE PENDANT LES DEUX PREMIERES HEURES APRES INOCULATION.

IL EXISTE UN EFFET DU PH AU STADE M+3 H SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ($P < 0,001$) (TABLEAU XXXVI). PLUS LE PH ETAIT ELEVE A CE STADE, PLUS LES NIVEAUX DE POPULATIONS DE *S. AUREUS* ETAIENT IMPORTANTS. EN REVANCHE, IL N'EXISTE PAS D'EFFET SIGNIFICATIF DES PH A M+1 H, A M+4 H ET A J+1 SUR LA CROISSANCE DES ISOLATS DE *S. AUREUS*.

LES POPULATIONS DE *S. AUREUS* AUX STADES J+1 ET J+15 SONT TRES FORTEMENT LIES PAR UNE CORRELATION POSITIVE ($P < 0,001$), DONC, PLUS LA POPULATION DE L'ISOLAT EST ELEVEE A J+1, PLUS SA POPULATION EST ELEVEE A J+15. LA CORRELATION ENTRE LES POPULATIONS AUX 2 STADES D'AFFINAGE EST PRESENTEE DANS LA FIGURE 24.

TABLEAU XXXVI : PH A MOULAGE + 3H ET CROISSANCE DE *S. AUREUS* SUR FROMAGE MODELE EN FONCTION DE L'ENTEROTOXINE ET DU BIOTYPE (RESULTATS DE L'ANALYSE DE LA VARIANCE).

Poly(temps,2) pH moulage + 3 h		pente 10.5971 ***	courbure 4.2680 ***						
Entérotoxine pH moulage + 3 h		A 7.3560 NS	AB 7.4897 *	AD 7.5201 NS	B 7.0749 ***	BD 7.5614 ●	C 7.5138 NS	CD 8.3115 NS	D 7.2696 NS
Entérotoxine*poly(temps,2) pH moulage + 3 h	pente	7.3560 NS	6.8926 NS	7.4201 NS	7.4681 ***	7.5127 NS	7.5554 NS	7.4570 NS	7.6688 NS
	courbure	7.3560 NS	7.5742 ●	7.3985 NS	7.5934 NS	7.3769 NS	7.3479 NS	7.0123 NS	7.0274 NS

*** p<0,0001 ; ** p<0,001 ; * p<0,005 ; ● p<0,1 ; NS non significatif

TABLEAU XXXVII : RESULTATS DE L'ANALYSE DE LA VARIANCE DE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* SUR FROMAGE MODELE EN FONCTION DE L'ENTEROTOXINE ET DU BIOTYPE.

Poly(temps,2)		pente 25.4537 ***	courbure -2.2859 ***				
Biotype		A 6.0131 NS	B 6.2621 *	Cb 6.0901 NS	Co 5.5281 ***	D 5.7731 ●	Inconnu 5.7901 NS
Biotype*poly(temps,2)	pente	6.0131 NS	6.7179 NS	6.1458 NS	9.3321 ***	6.8126 NS	7.0291 NS
	courbure	6.0131 NS	7.7501 ●	5.4054 NS	6.6821 NS	6.8614 NS	6.2930 NS

*** p<0,0001 ; ** p<0,001 ; * p<0,005 ; ● p<0,1 ; NS non significatif

EN GENERAL, IL N'Y AVAIT PAS DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LES COURBES DE CROISSANCE MOYENNES DE TOUS LES ISOLATS. CEPENDANT, LA CINETIQUE DE CROISSANCE DE *S. AUREUS* DIFFERAIT EN FONCTION DU BIOTYPE ($P < 0,001$). LES ISOLATS DE BIOTYPE C OVIN AVAIENT DES NIVEAUX DE POPULATIONS INFERIEURS AUX ISOLATS DU BIOTYPE A HUMAIN ($P < 0,001$), MAIS UNE AUGMENTATION DE LEUR POPULATION AU COURS DE LA FABRICATION PLUS IMPORTANTE ($P < 0,001$). PAR AILLEURS, LA CROISSANCE DES ISOLATS DANS LE FROMAGE MODELE NE DIFFERAIT PAS EN FONCTION DU TYPE D'ENTEROTOXINE PRODUITE *IN VITRO* (TABLEAU XXXVII).

EVOLUTION DES ISOLATS DE PULSOTYPE P1 (PRODUCTEURS DE SED)

L'EVOLUTION DES SEPT ISOLATS DE PULSOTYPE P1 AU COURS DE LA FABRICATION ET DE L'AFFINAGE DES FROMAGES MODELES EST PRESENTEE DANS LA FIGURE 25. LES ISOLATS 7 ET 8 SE DEVELOPPAIENT MOINS BIEN AU COURS DES PREMIERES HEURES, AVEC UNE AUGMENTATION DE 0,5 LOG UFC/G, CECI EN TENANT COMPTE DU FACTEUR DE CONCENTRATION DU AU MOULAGE. PAR CONTRE, LES 4 AUTRES ISOLATS AVAIENT UNE POPULATION QUI AUGMENTAIT DE PRESQUE 1 LOG AU COURS DES DEUX PREMIERES HEURES DE FABRICATION. MALGRE UNE DIFFERENCE QUASI CONSTANTE DE NIVEAU DE POPULATIONS, LES ISOLATS 7 ET 9 PRESENTAIENT LES MEMES CINETIQUES DE CROISSANCE, PARTICULIEREMENT, ENTRE LES STADES FIN PRESSAGE ET J+1 OU UNE BAISSSE DES DEUX POPULATIONS A PU ETRE OBSERVEE. POURTANT, L'ISOLAT 9 POSSEDAIT UN PROFIL DIFFERENT EN REP-PCR.

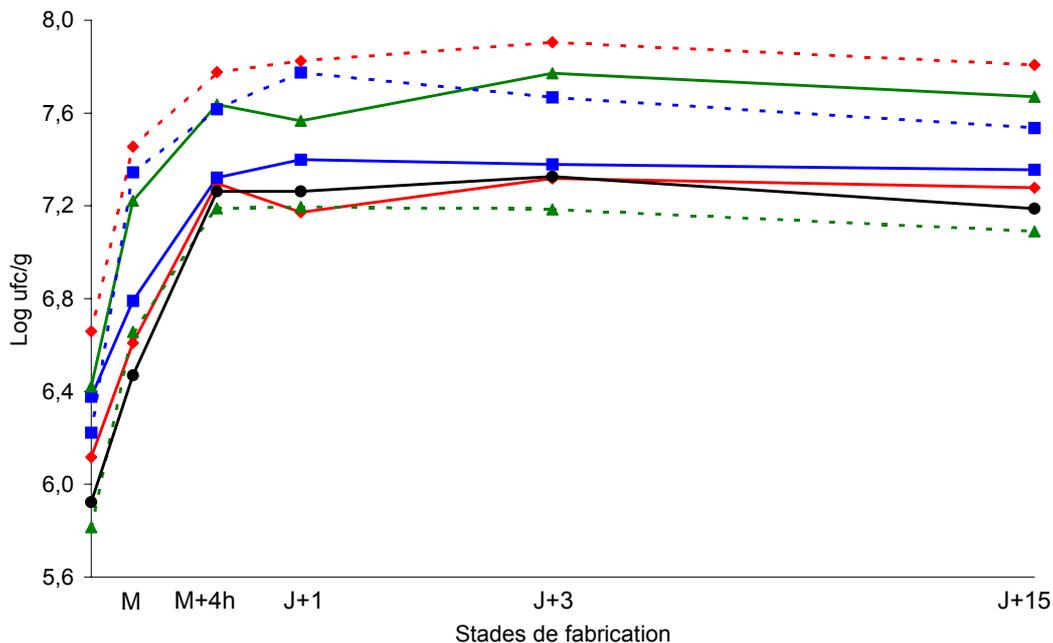


Figure 25 : courbes d'évolution des sept isolats de pulsotype P1 (producteurs de SED) au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages modèles . Isolats 7 (—◆—) ; isolat 8 (—■—) ; isolat 9 (—▲—) ; isolat 10 (---◆---) ; isolat 11 (---■---) ; isolat 12 (—●—) ; isolat 14 (---▲---). *La population de l'inoculum de départ a été multipliée par 10 (pour s'affranchir du facteur de concentration).*

DE MEME, LES ISOLATS 10 ET 14 (DE BIOTYPES DIFFERENTS) AVAIENT UN COMPORTEMENT SIMILAIRE. ILS ONT ETE COLLECTES SUR LE MEME SITE DE FABRICATION A PARTIR L'UN DE LAIT ET L'AUTRE DE FROMAGE.

FINALEMENT, DES DIFFERENCES EXISTAIENT DANS L'EVOLUTION DES SIX ISOLATS DE PULSOTYPE P1, PLUS PARTICULIEREMENT DANS LES DEUX PREMIERES HEURES DE FABRICATION.

COMPARAISON DES CROISSANCES DE *S. AUREUS* SUR LAIT G ET DANS LES FROMAGES MODELES

ON POUVAIT OBSERVER DES COMPORTEMENTS DIFFERENTS POUR LES ISOLATS 1 ET 6 ENTRE LA CROISSANCE SUR LAIT RECONSTITUE (LAIT G) ET CELLE OBSERVEE DANS LE FROMAGE MODELE. AINSI, L'ISOLAT 6 SE DEVELOPPAIT MIEUX DANS LE LAIT G QUE DANS LES PREMIERES HEURES DE FABRICATION DU FROMAGE MODELE, ET INVERSEMENT, L'ISOLAT 1 SE DEVELOPPAIT FAIBLEMENT EN DEBUT DE CULTURE SUR LAIT G, MAIS TRES BIEN DANS LE FROMAGE MODELE. MALGRE LES DIFFERENCES DE CINETIQUE DE CROISSANCE OBSERVEES POUR CES DEUX ISOLATS ENTRE LE LAIT G ET LE FROMAGE, IL N'Y PAS DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LES COURBES MOYENNES DE CROISSANCE DES 23 ISOLATS SUR LE LAIT G ET DANS LE FROMAGE.

LA DIVERSITE OBSERVEE DANS LE LAIT G EST LIEE AU BIOTYPE ET AU TYPE D'ENTEROTOXINE PRODUITE *IN VITRO* ALORS QU'ELLE N'EST LIEE QU'AU BIOTYPE DANS LE FROMAGE MODELE. CE RESULTAT POURRAIT ETRE INTERESSANT D'APPROFONDIR MAIS LE PLAN EXPERIMENTAL, NOTAMMENT AVEC LE FROMAGE MODELE, N'A PAS ETE CONÇU POUR REpondre A CES QUESTIONS.

CROISSANCE DU LEVAIN

LE LEVAIN EST CONSTITUE D'UN MELANGE DE LACTOCOQUES, DE STREPTOCOQUES ET DE LACTOBACILLES THERMOPHILES, QUI ONT ETE SUIVIS, AUX MEME STADES QUE LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE, TOUT AU LONG DE LA FABRICATION ET DE L'AFFINAGE DES FROMAGES MODELES.

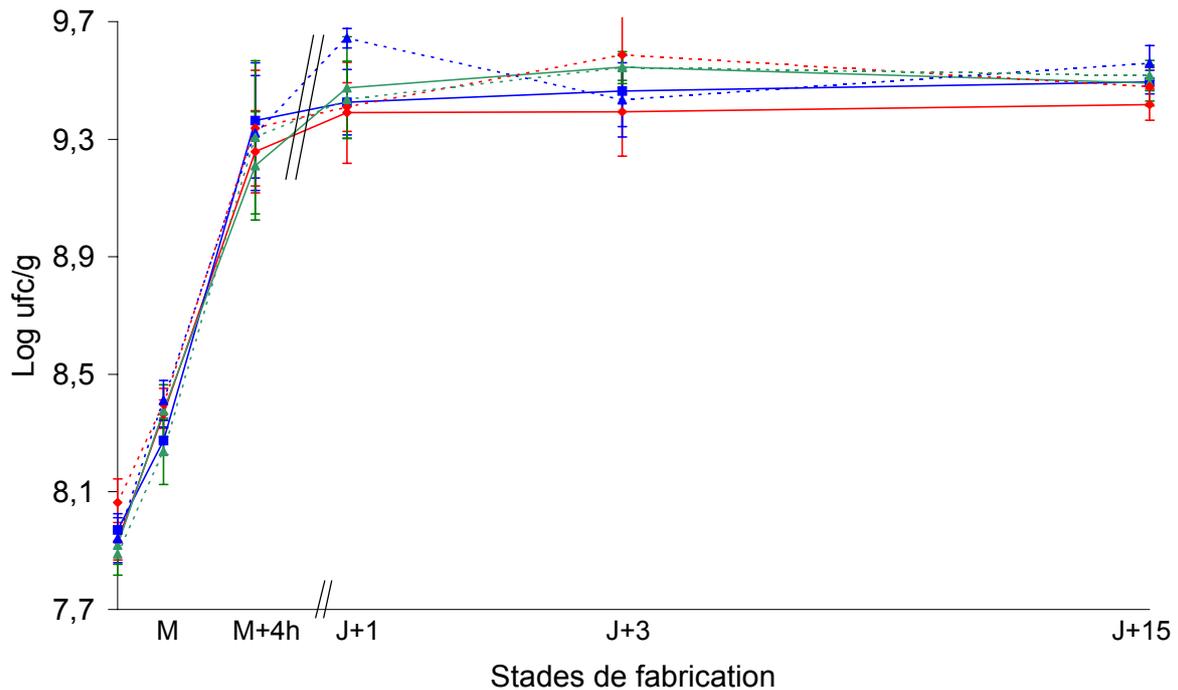


Figure 26 : courbes d'évolution des lactocoques au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages modèles. Courbes moyennes par jour de fabrication. Jour 1 : isolats 1 à 4 (—◆—) ; jour 2 : isolats 5 à 8 (—■—) ; jour 3 : isolats 9 à 12 (—▲—) ; jour 4 : isolats 13 à 16 (---◆---) ; jour 5 : isolats 17 à 20 (---■---) ; jour 6 : isolats 21 à 24 (---▲---). **La population de l'inoculum de départ a été multipliée par 10 (pour s'affranchir du facteur de concentration).**

Lactocoques

LES LACTOCOQUES (FIGURE 26) ONT ÉTÉ ENSEMENCÉS À UN NIVEAU MOYEN DE $9,1 \times 10^6$ UFC/ML AVEC UNE FAIBLE VARIABILITÉ. LES POPULATIONS LES PLUS ÉLEVÉES ONT ÉTÉ OBSERVÉES À J+1, AVEC UNE MOYENNE DE $2,9 \times 10^9$ UFC/G $\pm 1,6$. À PARTIR DE J+1, LA POPULATION SE STABILISAIT JUSQU'À FIN AFFINAGE. LE MAXIMUM DE VARIABILITÉ SE TROUVAIT À 6 H (FIN PRESSAGE) OU LES POPULATIONS VARIAIENT, SELON LE JOUR DE FABRICATION. PAR CONSÉQUENT, LES POPULATIONS VARIAIENT PEU ENTRE LES FABRICATIONS D'UN MÊME JOUR.

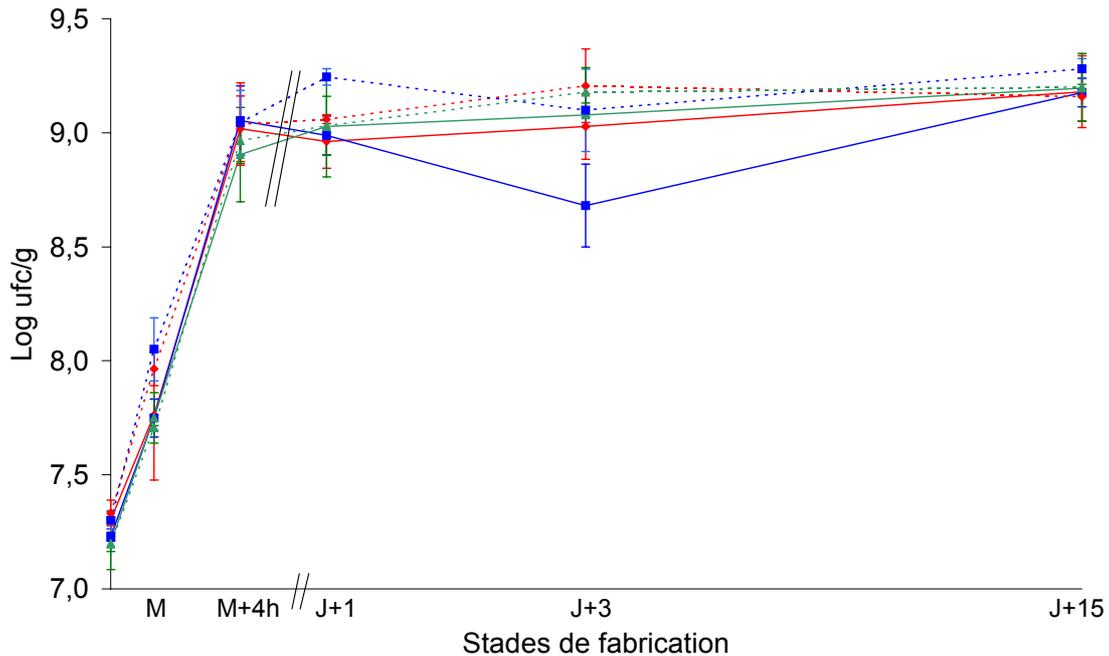


Figure 27 : courbes d'évolution des streptocoques thermophiles au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages modèles. Courbes moyennes par jour de fabrication. Jour 1 : isolats 1 à 4 (—◆—) ; jour 2 : isolats 5 à 8 (—■—) ; jour 3 : isolats 9 à 12 (—▲—) ; jour 4 : isolats 13 à 16 (---◆---) ; jour 5 : isolats 17 à 20 (---■---) ; jour 6 : isolats 21 à 24 (---▲---). **La population de l'inoculum de départ a été multipliée par 10 (pour s'affranchir du facteur de concentration).**

Streptocoques thermophiles

LES STREPTOCOQUES THERMOPHILES (FIGURE 27) ONT ÉTÉ INOCULÉS AVEC UNE POPULATION MOYENNE DE $1,8 \times 10^6$ UFC/ML ET PEU DE VARIABILITÉ INITIALE. LES POPULATIONS LES PLUS ÉLEVÉES ONT ÉTÉ OBSERVÉES À J+1, AVEC UNE MOYENNE DE $1,2 \times 10^9 \pm 4,5$ UFC/G. POUR 2 FROMAGES DU JOUR 2, UNE FAIBLE BAISSÉ DE LA POPULATION A PU ÊTRE OBSERVÉE À J+3, AVEC UNE DIFFÉRENCE DE 0,5 LOG UFC/ML. LA VARIABILITÉ OBSERVÉE ENTRE LES DIFFÉRENTS JOURS DE FABRICATION, EST RESTÉE FAIBLE ($\pm 0,02$ À $\pm 0,28$ LOG UFC/G). À PARTIR DE 24 H LA POPULATION SE STABILISAIT JUSQU'À FIN AFFINAGE. LES STREPTOCOQUES THERMOPHILES ONT PRÉSENTÉ DES CINÉTIQUES DE CROISSANCE COMPARABLES À CELLES DES LACTOCOQUES AVEC UNE VARIABILITÉ UN PEU PLUS IMPORTANTE.

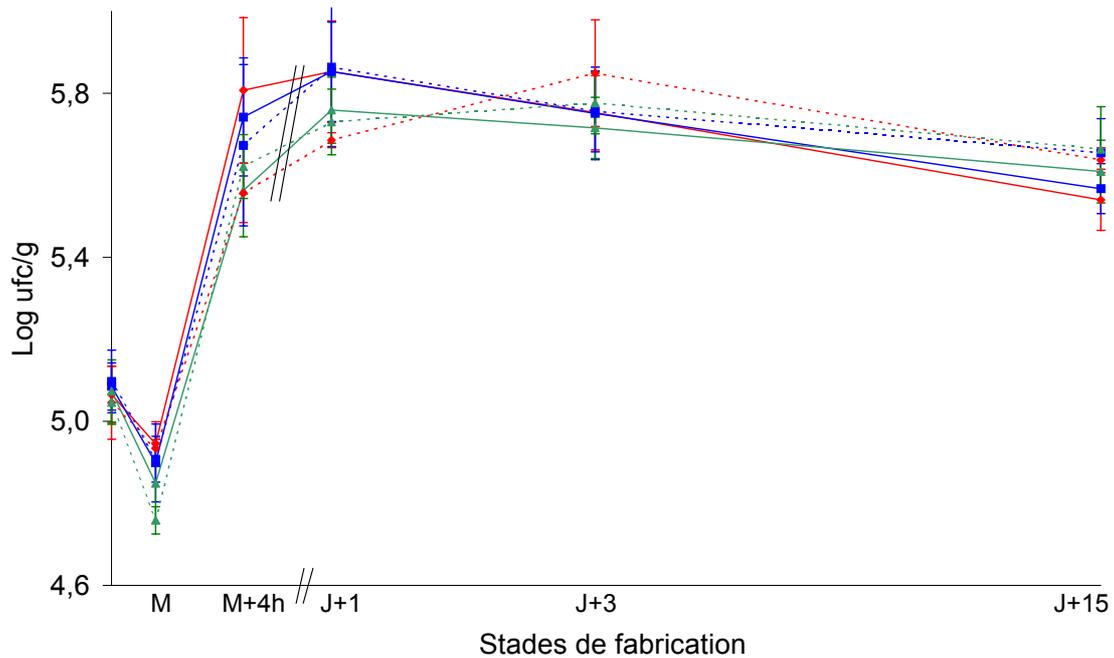


Figure 28 : courbes d'évolution des lactobacilles thermophiles au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages modèles. Courbes moyennes par jour de fabrication. Jour 1 : isolats 1 à 4 (—◆—) ; jour 2 : isolats 5 à 8 (—■—) ; jour 3 : isolats 9 à 12 (—▲—) ; jour 4 : isolats 13 à 16 (---◆---) ; jour 5 : isolats 17 à 20 (---■---) ; jour 6 : isolats 21 à 24 (---▲---). **La population de l'inoculum de départ a été multipliée par 10 (pour s'affranchir du facteur de concentration).**

Lactobacilles thermophiles

LES LACTOBACILLES THERMOPHILES (FIGURE 28) ONT ÉTÉ ENSEMENCÉS À UN NIVEAU MOYEN DE $1,2 \times 10^4$ UFC/ML AVEC PEU DE VARIABILITÉ. LES POPULATIONS LES PLUS ÉLEVÉES OBSERVÉES POUR LES LACTOBACILLES THERMOPHILES ÉTAIENT DE $6,2 \times 10^5 \pm 3$ UFC/G EN MOYENNE À J+1. LA POPULATION A ENSUITE BAISSE JUSQU'À LA FIN D'AFFINAGE. UNE FAIBLE VARIABILITÉ ENTRE LES NIVEAUX DE LACTOBACILLES A ÉTÉ OBSERVÉE AU COURS DES PREMIÈRES HEURES DE FABRICATION. FINALEMENT, LES POPULATIONS VARIAIENT PEU ENTRE LES FABRICATIONS.

TABLEAU XXXVIII : RESULTATS DE LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS LES 23 FROMAGES MODELES.

Fromage	Pulsotype	Isolat	Production d'entérotoxines*	Stade de fabrication				
				M	M+4 h	J+ 1	J+3	J+1 5
11	P16	1	A (++)	-	+/-	+/-	+ (A)	
12	P14	2	AD (++++)	+ (AD)			+ (AD)	
13	P15	3	A (+++)	+ (A)			+ (A)	
14	P21	4	A (++)	+ (A)			+ (A)	
21	P12	5	AD (++++)	+ (AD)			+ (AD)	
22	P39	6	A (+)	+/-	+/-	+/-	+ (A)	
23	P1	7	D (+++)	+ (D)			+ (D)	
24	P1	8	D (++++)	+ (D)			+ (D)	
31	P1	9	D (++++)	+ (D)			+ (D)	
32	P1	10	D (++++)	+ (D)			+ (D)	
33	P1	11	D (++++)	+ (D)			+ (D)	
34	P1	12	D (++)	+ (D)			+ (D)	
41	P4	13	C (+)				-	-
42	P1	14	D (++++)	+ (D)			+ (D)	
43	P9	15	C (++++)				-	-
44	P11	16	C (+++)				-	-
51	P32	17	C (++++)				-	-
52	P41	18	B (++++)				-	-
53	P50	19	B (++)				-	-

54	P13	20	BD (++++)	+ (D)		+ (D)
61	P20	21	AB (++++)	+/-	+ (A)	+ (A)
62	P11	22	CD (++)	+/-	+ (D)	+ (D)
63	P43	23	A (++)	+ (A)		+ (A)

+ = positive avec le kit Transia et le kit Oxoid ; +/- = positive avec le kit Transia et négative avec le kit Oxoid ; - = négative avec les deux kits ; () : entérotoxine(s) produites dans le fromage modèle. M = moulage ; M+4 h (fin pressage) ; J+1 = début d'affinage (avant saumurage) ; J+15 = fin d'affinage. * + = très faiblement producteur ; ++ = faiblement producteur ; +++ = fortement producteur ; ++++ = très fortement producteur. Les niveaux de production d'entérotoxines *in vitro* des isolats ont été choisis arbitrairement en fonction de la densité optique obtenue avec le kit Transia (approche semi-quantitative).

PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS LES FROMAGES MODELES

L'OBJECTIF DE CES FABRICATIONS ETAIT D'EVALUER LE COMPORTEMENT D'UNE SELECTION D'ISOLATS DE LA COLLECTION AQS-SA SELON LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*, AFIN DE SELECTIONNER AU PLUS TROIS ISOLATS PRODUCTEURS DANS LE FROMAGE MODELE.

LES PREMIERES RECHERCHES POUR DES ENTEROTOXINES ONT ETE FAITES A J+3. EN CAS DE PRESENCE D'ENTEROTOXINES A CE STADE, UNE RECHERCHE PLUS EN AMONT A ETE EFFECTUEE AFIN DE VOIR A QUEL STADE A ETE PRODUITE L'ENTEROTOXINE. EN CAS D'ABSENCE D'ENTEROTOXINE A J+3, UNE RECHERCHE A ETE EFFECTUEE A J+15. LES ENTEROTOXINES TOTALES (SEA A SEE) ONT ETE D'ABORD EVALUEES AVEC LE KIT TRANSIA ET EN CAS DE RESULTAT POSITIF, L'ENTEROTOXINE PRODUITE A ETE RECHERCHEE AVEC LE KIT OXOID POUR CONFIRMATION DU TYPE D'ENTEROTOXINE (SEA A SED). LES ENTEROTOXINES ONT ETE EXTRAITES AVEC LA METHODE OFFICIELLE DE DIALYSE/CONCENTRATION ET LES EXTRAITS STOCKES A -30°C EN ATTENDANT LES ANALYSES.

A J+3, 17 DES 23 ISOLATS AVAIENT PRODUIT DES ENTEROTOXINES A UN NIVEAU DETECTABLE AVEC LA METHODE D'EXTRACTION ET LES DEUX KITS DE DETECTION. SEULES SEA ET SED ONT ETE RETROUVEES. POUR LES ISOLATS PRODUCTEURS DE B ET D, A ET B, ET C ET D SEULES A ET D ONT ETE PRODUITES A UN NIVEAU DETECTABLE AVEC LES KITS TRANSIA ET OXOID. DANS LES 17 FROMAGES OU L'ON A DETECTE DES ENTEROTOXINES A J+3, DES RECHERCHES ONT ETE REALISEES A PARTIR DU STADE MOULAGE JUSQU'AU STADE OU LES ENTEROTOXINES ONT ETE PRODUITES A UN NIVEAU DETECTABLE AVEC LES DEUX KITS.

LE TABLEAU XXXVIII RESUME LES RESULTATS DE LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS LES FROMAGES MODELES. AU STADE MOULAGE, DES ENTEROTOXINES ONT ETE DETECTEES DANS 13 DES 17 FROMAGES, AVEC LES DEUX KITS MAIS AUCUNE ENTEROTOXINE N'A PU ETRE DETECTEE DANS LE FROMAGE ENSEMENCE AVEC L'ISOLAT 1 ET UNIQUEMENT AVEC LE KIT TRANSIA DANS LES FROMAGES ENSEMENCES AVEC LES ISOLATS 6, 21 ET 22. CES QUATRE DERNIERS FROMAGES ONT ETE ALORS ANALYSES AU STADE M+4 H. LES FROMAGES ENSEMENCES AVEC LES ISOLATS 21 ET 22 SE SONT ALORS AVERES POSITIFS AVEC LES DEUX KITS ALORS QUE LES ISOLATS 1 ET 6 NE L'ETAIENT QU'AVEC LE KIT TRANSIA. CES DEUX DERNIERS ONT ALORS ETE TESTES AU STADE J+1, STADE AUQUEL LES ECHANTILLONS RESTAIENT POSITIFS AVEC LE KIT TRANSIA ET NEGATIFS AVEC LE KIT OXOID. PAR CONSEQUENT, CES DEUX ISOLATS ONT PRODUIT DES ENTEROTOXINES A UN NIVEAU DETECTABLE, AVEC LES DEUX KITS, APRES PLUS D'UN JOUR DE FABRICATION. LES ISOLATS DE PULSOTYPE P1 (PRODUCTEURS DE SED UNIQUEMENT) NE POUVAIENT PAS ETRE DISTINGUES EN FONCTION DE LEUR CINETIQUE DE PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS LES FROMAGES MODELES.

LA PLUPART DES ISOLATS, PRODUISANT SEA OU SED *IN VITRO*, ONT PRESENTE UNE PRODUCTION D'ENTEROTOXINES PRECOCE (2 H APRES ENSEMENCEMENT) DANS LE FROMAGE MODELE, ET QUELQUES-UNS SEULEMENT APRES 6 H, VOIRE UN JOUR.

SUIVI DES ISOLATS PAR SPECTROSCOPIE IRTF

LES SPECTRES DES ISOLATS DE *S. AUREUS*, COLLECTES A J+1 (FROMAGE AU DEMOULAGE) DES BOITES DE BP-RPF UTILISEES POUR LE DENOMBREMENT, ONT ETE ENREGISTRES ET

IDENTIFIES PAR RAPPORT AU PREMIER MODELE « STAPHYLOCOQUES » DECRIT DANS LA SECTION 5.1 DES RESULTATS ET DISCUSSION PARTIE I. TOUS LES ISOLATS ONT ETE CORRECTEMENT IDENTIFIES COMME ETANT *S. AUREUS*.

SYNTHESE DES RESULTATS

Vingt-neuf isolats de *S. aureus* collectés au cours de cette étude ont été sélectionnés en fonction l'entérotoxine produite *in vitro*, le biotype, le pulsotype et le lieu d'isolement. Les résultats obtenus ont démontré la capacité de tous les isolats choisis, à se développer sur lait G à 32°C (température de l'emprésurage du fromage modèle). L'analyse de la variance a montré que le biotype et l'entérotoxine produite *in vitro* ont un effet significatif sur la croissance des isolats.

Sur les 29 isolats testés dans le lait G, 23 ont été retenus pour évaluer leur capacité à produire des entérotoxines dans des conditions contrôlées de fabrication fromagère. Les isolats ont étéensemencés dans le lait de fabrication à un niveau élevé de 10^5 ufc/ml, pour assurer leur croissance et la production d'entérotoxines.

Pour l'ensemble des 23 fromages modèles, le pourcentage de gras sur sec variait peu entre le début et la fin d'affinage, tandis que l'extrait sec a augmenté légèrement et l'humidité dans le fromage dégraissé a baissé. Quelques variations dans les cinétiques d'acidification ont été observées, cependant toutes ces cinétiques se sont avérées satisfaisantes pour la croissance des différents isolats, et le pH à J+1 est fortement corrélé au pH à J+15. Le pH au stade M+3 h a un effet plus significatif sur la croissance de *S. aureus* ainsi que le biotype de l'isolat. Par contre, la nature de l'entérotoxine produite *in vitro* n'a pas d'influence. Chaque isolat s'est bien développé dans les conditions de fabrication fromagère. Toutefois selon les isolats, ils ont eu plus ou moins de difficultés à se développer au cours des premières heures de fabrication. La population de *S. aureus* à J+1 est fortement corrélée avec la population à J+15.

Les lactocoques, les streptocoques et les lactobacilles thermophiles, utilisés comme levains, se sont bien développés et peu de variations ont pu être observées entre les fabrications.

Les courbes de croissance moyenne des 23 isolats dans le lait G et dans le fromage modèle ne sont pas apparues statistiquement différentes.

Des entérotoxines ont été retrouvées dans 17 des 23 fromages. Seulement SEA, SED ou SEA et SED ont été retrouvées dans les fromages à un niveau détectable avec les deux kits (Transia et Oxoid). La plupart des isolats ont une production précoce mais une certaine diversité existe. De plus, la production ne semble pas être directement liée à la croissance de l'isolat. Aucune SEB ou SEC n'a été retrouvée a un niveau détectable, en utilisant les méthodes d'extraction et de détection disponibles.

NOTRE OBJECTIF AYANT ETE ATTEINT, PARMIS LES 17 ISOLATS PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINE(S) (SEA, SED OU SEA ET SED) DANS LE FROMAGE MODELE, 3 POURRONT ETRE RETENUS POUR LA SUITE DU TRAVAIL, A SAVOIR LEUR EVALUATION A PRODUIRE DES ENTEROTOXINES DANS DES FABRICATIONS SIMULANT TROIS FROMAGES TRADITIONNELS.

B - PRODUCTION D'ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES DANS DES FROMAGES EXPERIMENTAUX SIMULANT TROIS TECHNOLOGIES TRADITIONNELLES

L'objectif de cette étape était d'évaluer l'aptitude de trois isolats à se développer et à produire des entérotoxines dans des fromages expérimentaux simulant trois fabrications traditionnelles : Cantal, Tomme de Savoie, et Reblochon.

CHOIX DES ISOLATS EN VUE DES FABRICATIONS FROMAGERES

TROIS ISOLATS DE *S. AUREUS* ONT ETE SELECTIONNES PARMIS LES ISOLATS PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES DANS LE FROMAGE MODELE. LES ISOLATS ONT ETE RETENUS SELON LES CRITERES SUIVANTS :

- le type d'entérotoxine produite (SEA, SED, et, SEA et SED) dans le fromage modèle,
- la production précoce d'entérotoxines dans le fromage modèle,
- les différences de biotypes : un de biotype A humain, un de biotype C bovin et un de biotype inconnu,
- le pulsotype,
- la cinétique de croissance des isolats observée dans le fromage modèle,
- l'origine des isolats.

Les critères de sélection sont résumés dans le tableau XXXIX.

TABLEAU XXXIX : CHOIX DES TROIS ISOLATS A TESTER DANS LES FROMAGES EXPERIMENTAUX SIMULANT TROIS FABRICATIONS TRADITIONNELLES.

Isolat	SE	Cinétique de production ¹		Pulsotype*	Biotype
		Transia ²	Oxoid ³		
A (5)	AD	M	M	P12	A humain
B (3)	A	M	M	P15	Inconnu
C (8)	D	M	M	P1	C bovin

() numéro de l'isolat dans le fromage modèle ; M : fin de prépressage ; ¹ Stade de production des entérotoxines ; ² Détection des entérotoxines avec le kit Transia ; ³ Détection des entérotoxines avec le kit Oxoid ; * pulsotype obtenu par électrophorèse en champ pulsé.

LES ISOLATS DE *S. AUREUS* ONT ETE ENSEMENCES A DEUX NIVEAUX DE POPULATIONS DANS LE LAIT DE FABRICATION. UN NIVEAU « BAS » A 10^2 UFC/ML DE LAIT QUI CORRESPOND AU NIVEAU RECHERCHE PAR LES PROFESSIONNELS ET UN NIVEAU « HAUT » DE 10^3 A 2×10^3 UFC/ML QUI CORRESPOND AU MAXIMUM ADMIS PAR LA REGLEMENTATION. LES NUMEROS DES FROMAGES SONT PRESENTES DANS LE TABLEAU XXXX. POUR LES JOURS DE FABRICATIONS CF. TABLEAUX XVI ET XVII.

TABLEAU XXXX : CORRESPONDANCES DES NUMEROS DES FROMAGES, LES NIVEAUX D'ENSEMENCEMENT ET LES ISOLATS ENSEMENCES.

Fromage	Isolat	Niveau d'ensemencement
1 à 3	A	Bas
4 à 6	A	Haut
7 à 9	B	Bas
10 à 12	B	Haut
13 à 15	C	Bas
16 à 18	C	Haut

FROMAGES EXPERIMENTAUX DE TYPE CANTAL

LE FROMAGE DE TYPE CANTAL A ETE REALISE A LA FROMAGERIE EXPERIMENTALE DE L'INRA DE POLIGNY. LES FABRICATIONS ONT ETE EFFECTUEES AVEC DU LAIT MICROFILTRE DONT LA CREME A ETE PASTEURISEE, POUR REDUIRE NETTEMENT LA FLORE NATURELLE DU LAIT CRU ET EGALEMENT, LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE PRESENTS DANS LE LAIT INITIAL.

QUALITE MICROBIOLOGIQUE DU LAIT

LA FLORE TOTALE DU LAIT CRU INITIAL ETAIT DE $3,3 \times 10^4$ UFC/ML $\pm 3,8$. APRES MICROFILTRATION DU LAIT ECREME ET PASTEURISATION DE LA CREME, LA FLORE TOTALE A ETE DIVISEE ENVIRON D'UN FACTEUR DE 30, POUR ATTEINDRE EN MOYENNE $9,7 \times 10^2$ UFC/ML $\pm 3,8$ DANS LE LAIT DE FABRICATION. LA POPULATION DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE SE TROUVAIT TOUJOURS A UN NIVEAU NON DETECTABLE (<1 UFC/ML) DANS LE LAIT DE FABRICATION TOUT EN ETANT A UN NIVEAU MOYEN DE $3,0 \times 10^2$ UFC/ML DANS LE LAIT CRU INITIAL.

ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

LES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES ONT ETE EFFECTUEES A J+2 (FROMAGE AU DEMOULAGE, APRES SALAGE) ET A J+90 (FIN AFFINAGE). LES RESULTATS SONT PRESENTES DANS LE TABLEAU XXXXI.

TABLEAU XXXXI : RESULTATS DES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES FROMAGES DE TYPE CANTAL

Stade	ES* (%)	G/S** (%)	Taux de sel dans l'eau (%)
J+2	$58,8 \pm 1,0$	$52,5 \pm 0,6$	$3,7 \pm 0,2$
J+90	$61,4 \pm 1,05$	$52,1 \pm 0,6$	$4,6 \pm 0,27$

* ES : Extrait sec ; ** G/S : Gras/sec.

LES FROMAGES 16, 17 ET 18 A J+2, AVAIENT DES EXTRAITS SEC PLUS FAIBLES, EN MOYENNE DE $56,7\% \pm 0,5$, TANDIS QUE LES FROMAGES 1 A 15 AVAIENT UN EXTRAIT SEC MOYEN DE $59,2\% \pm 0,8$.

DE MEME, LES FROMAGES 16, 17 ET 18 AVAIENT UN EXTRAIT SEC UN PEU MOINS ELEVE A J+90, EN MOYENNE DE $59,5\% \pm 0,2$, TANDIS QUE LES FROMAGES 1 A 15 AVAIENT UN EXTRAIT SEC MOYEN DE $61,8\% \pm 0,7$.

EVOLUTION DU PH

L'EVOLUTION DU PH A ETE SUIVIE EN CONTINU DANS UNE DES QUATRE CUVES CHAQUE JOUR DE FABRICATION. LES COURBES DE PH OBTENUES SONT PRESENTEES DANS LA FIGURE 29. POUR LES AUTRES CUVES LE PH A ETE MESURE A CERTAINS POINTS « CRITIQUES » (CF. FIGURE 6). LE PH AU SOUTIRAGE ETAIT DE $6,49 \pm 0,05$. LES COURBES D'ACIDIFICATION, ENTRE LES 5 FROMAGES SUIVIS EN CONTINU, PRESENTAIENT QUELQUES VARIATIONS. LA CINETIQUE D'ACIDIFICATION DU FROMAGE 10 (ISOLAT A, HAUT NIVEAU D'ENSEMENCEMENT) ETAIT PLUS RAPIDE PENDANT LES PREMIERES HEURES DE FABRICATION (JUSQU'A 12 H). LE SIXIEME FROMAGE N'ETAIT PAS PRESENTE CAR UN PROBLEME AVEC LA SONDE PH A EU LIEU PENDANT LE SUIVI.

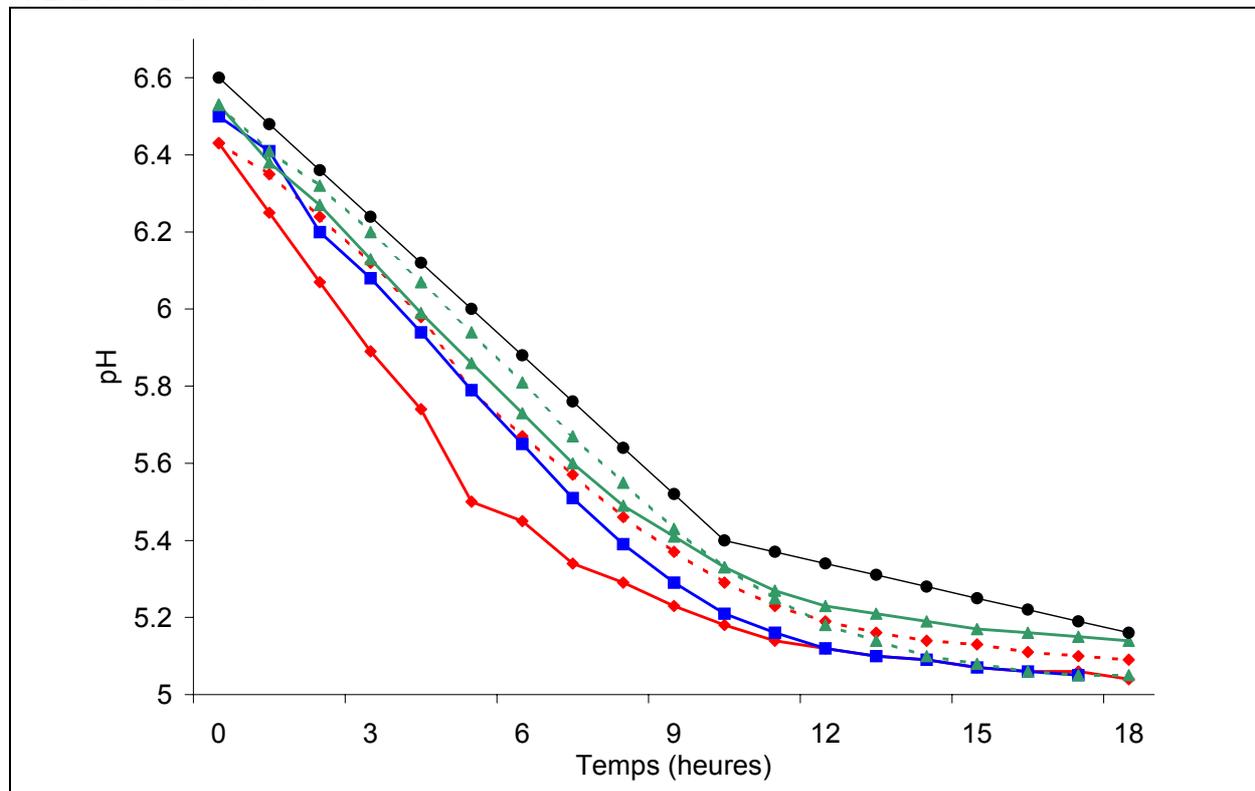


Figure 29 : suivi du pH en continu au cours de la fabrication de cinq fromages modèles de type Cantal.

Niveau d'ensemencement en *S. aureus* haut (—) et bas (-----) ; isolat A (◆) ; isolat B (■) ; isolat C (▲) ; référence (●).

A LA FIN DE LA PHASE D'ACIDIFICATION, VERS 18H DE FABRICATION, LE PH DES FROMAGES ETAIT DE $5,07 \pm 0,05$. A J+2, LE PH MOYEN DES FROMAGES ETAIT DE $5,03 \pm 0,02$ ET EN FIN D'AFFINAGE UNE AUGMENTATION DE PH JUSQU'A $5,32 \pm 0,07$ A ETE OBSERVEE. LES COURBES ETAIENT LEGEREMENT PLUS BASSES QUE CELLE DE REFERENCE.

CROISSANCE DU LEVAIN LACTIQUE

LE LEVAIN LACTIQUE ETAIT CONSTITUE DE LACTOCOQUES ET DE LEUCONOSTOC, DONT LA CROISSANCE A ETE SUIVIE AUX MEMES STADES QUE *S. AUREUS*, TOUT AU LONG DE LA FABRICATION ET DE L’AFFINAGE DES FROMAGES DE TYPE CANTAL. LA FIGURE 30 PRESENTE, POUR LES LACTOCOQUES, LES COURBES D’EVOLUTION, MOYENNES PAR JOUR DE FABRICATION, PAR ISOLAT ET PAR NIVEAU D’ENSEMENCEMENT EN *S. AUREUS*.

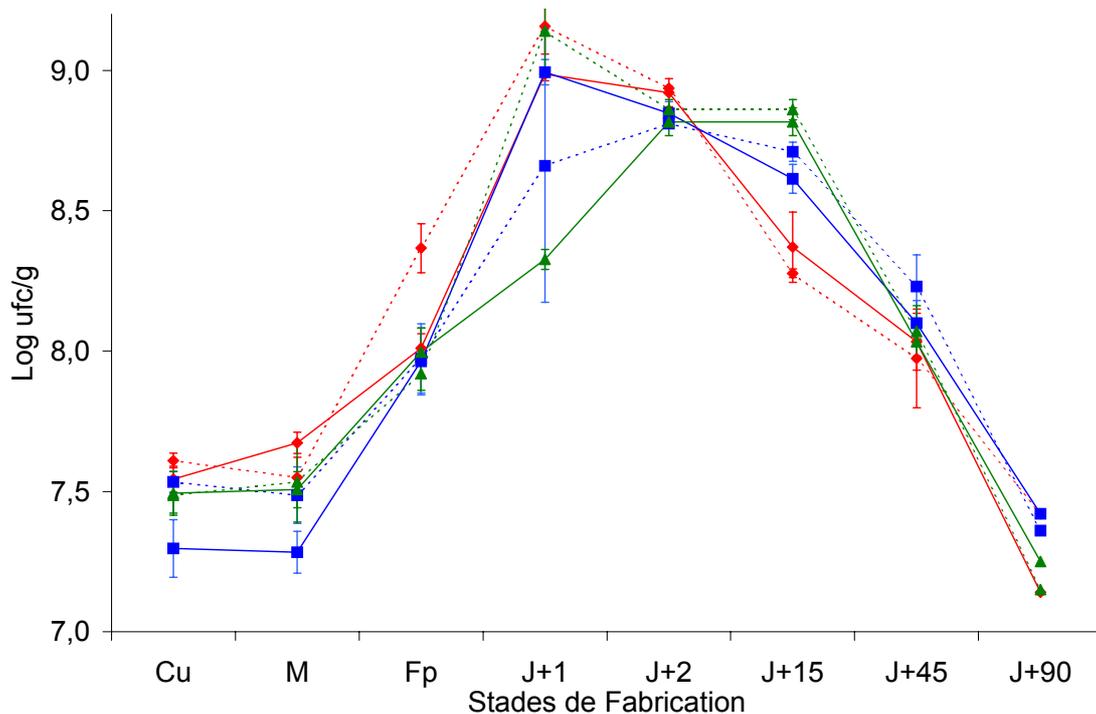


Figure 30 : courbes d’évolution des lactocoques au cours de la fabrication et de l’affinage des fromages de type Cantal (moyennes par jour de fabrication). Niveau d’ensemencement en *S. aureus* haut (—) et bas (-----) ; isolat A (◆) ; isolat B (■) ; isolat C (▲). Cu : lait en cuve ; M : caillé au soutirage ; Fp : caillé sortie presse-tomme. **La population de l’inoculum de départ a été multipliée par 10 (pour s’affranchir du facteur de concentration).**

LES LACTOCOQUES ONT ETE ENSEMENCES A UN NIVEAU MOYEN DE $3,2 \times 10^6$ UFC/ML $\pm 8,7$. LA POPULATION MOYENNE LA PLUS ELEVEE OBSERVEE DANS LA PLUPART DES FROMAGES AU STADE J+1 ETAIT DE $9,55 \times 10^8$ UFC/G ± 5 . DES DIFFERENCES DE CINETIQUE IMPORTANTES ONT PU ETRE OBSERVEES DES LE DEBUT DE FABRICATION, PLUS PARTICULIEREMENT AVEC L’ISOLAT A ENSEMENCE A DES NIVEAUX BAS ET

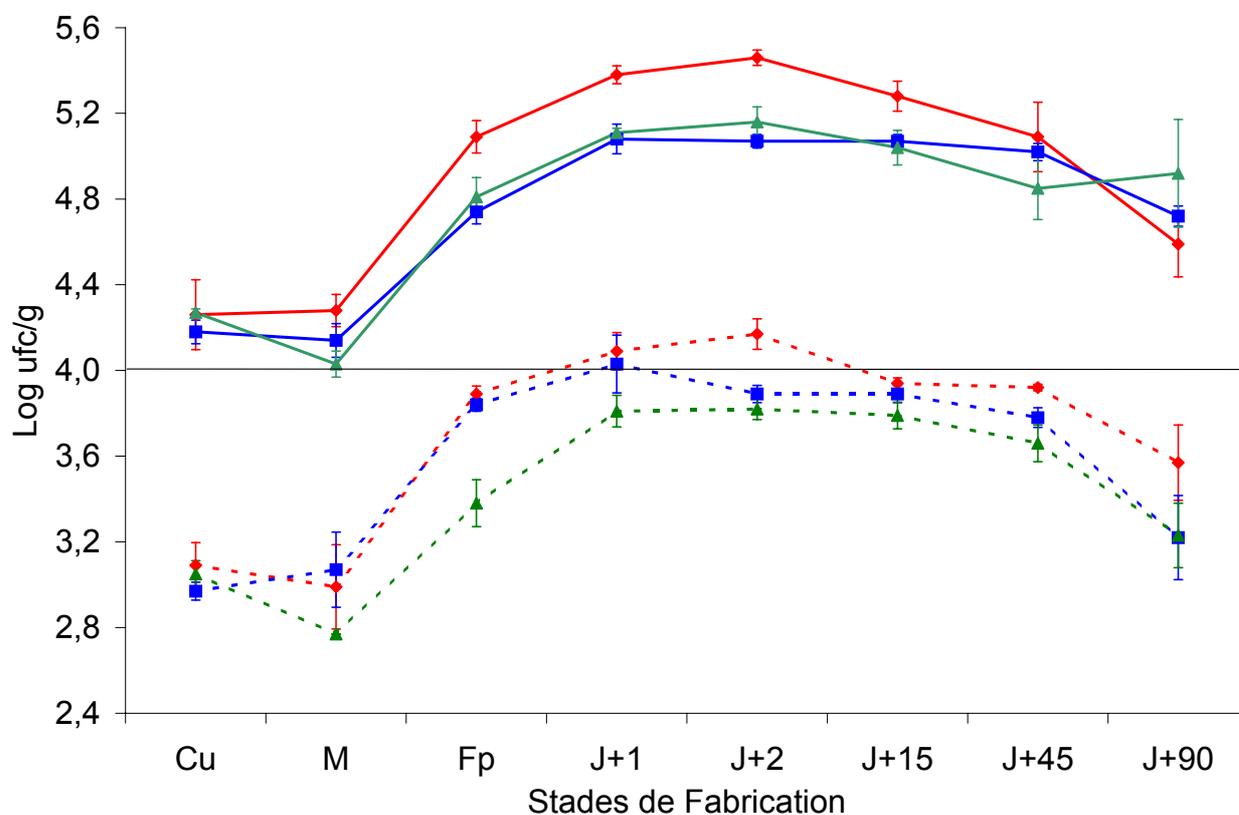


Figure 31 : courbes d'évolution des trois isolats de *S. aureus* au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages de type Cantal (moyennes par isolat). Niveau d'ensemencement en *S. aureus* haut (—) et bas (-----). Isolat A (♦) ; isolat B (■) ; isolat C (▲) ; Cu : lait en cuve ; M : caillé au soutirage ; Fp : caillé sortie presse-tomme. **La population de l'inoculum de départ a été multipliée par 10 (pour s'affranchir du facteur de concentration).**

HAUT, AINSI QU'AVEC L'ISOLAT C ENSEMENCE A UN NIVEAU HAUT. CEPENDANT, LES ECARTS TYPE SONT FAIBLES SAUF, AU STADE J+1, POUR L'ISOLAT B ENSEMENCE A UN NIVEAU BAS.

AU STADE FP (CAILLE SORTIE PRESSE-TOMME), L'ISOLAT A ENSEMENCE A UN NIVEAU BAS AVAIT UNE POPULATION DE 0,5 LOG UFC/G PLUS ELEVEE QUE LES AUTRES FROMAGES. ENTRE L'ENSEMENCEMENT EN CUVE ET LE FROMAGE AU MOULAGE (M), LES LACTOCOQUES DANS LES FROMAGES ENSEMENCES AVEC L'ISOLAT A A UN NIVEAU HAUT SE SONT DEVELOPPES PLUS RAPIDEMENT QUE DANS LES AUTRES FROMAGES. CETTE CROISSANCE EST EGALEMENT LIEE A UNE COURBE D'ACIDIFICATION PLUS RAPIDE (FIGURE 29). A J+15, LES FROMAGES ENSEMENCES AVEC L'ISOLAT A A DES NIVEAUX BAS ET HAUT, AVAIENT UNE POPULATION DE LACTOCOQUES DE 0,25 LOG UFC/G PLUS BASSE.

LES NIVEAUX DE POPULATIONS EN LACTOCOQUES PLUS ELEVES A J+1 SONT LIES A UN PH PLUS BAS EN FIN D'ACIDIFICATION (A J+1).

IL EXISTE UNE DIVERSITE DE CINETIQUES DE CROISSANCE DES LACTOCOQUES DEPUIS L'ENSEMENCEMENT JUSQU'EN FIN D'AFFINAGE, CEPENDANT, IL SEMBLERAIT QUE CES DIFFERENCES NE SOIENT PAS LIEES AU NIVEAU D'ENSEMENCEMENT DES ISOLATS DE *S. AUREUS*, NI MEME A L'ISOLAT LUI-MEME.

EVOLUTION DES POPULATIONS DE *S. AUREUS*

LE NIVEAU INITIAL DES ISOLATS ETAIT DE $1,1 \times 10^2$ UFC/ML $\pm 0,3$ EN MOYENNE POUR LE NIVEAU BAS, ET DE $1,7 \times 10^3$ UFC/ML $\pm 0,6$ EN MOYENNE POUR LE NIVEAU HAUT. POUR LES DEUX NIVEAUX D'ENSEMENCEMENT (FIGURE 31) LE NIVEAU DE POPULATION LE PLUS ELEVE OBSERVE ETAIT SOIT AU STADE J+1 (FROMAGE BROYE, AVANT SALAGE), SOIT AU STADE J+2 (FROMAGE AU DEMOULAGE).

PENDANT LES PREMIERES HEURES DE FABRICATION, ENTRE L'ENSEMENCEMENT EN CUVE ET LE FROMAGE AU MOULAGE (M), LES ISOLATS SE SONT TRES PEU DEVELOPPES OU ONT MEME DIMINUE. CE TEMPS DE LATENCE POURRAIT ETRE EXPLIQUE PAR UN TEMPS D'ADAPTATION AUX CONDITIONS DU MILIEU (LEVAIN, TEMPERATURE, LAIT). LES NIVEAUX DE POPULATIONS, ENTRE LE MOULAGE ET J+1, AVAIENT AUGMENTE DE 1 LOG QUEL QUE SOIT LE NIVEAU D'ENSEMENCEMENT INITIAL.

LA CROISSANCE DES LACTOCOQUES NE SEMBLE PAS GENER LA CROISSANCE DE *S. AUREUS*. SELON LE NIVEAU D'ENSEMENCEMENT INITIAL, LES CINETIQUES INDIVIDUELLES DE CROISSANCE VARIENT. L'ISOLAT A SE DEVELOPPE MIEUX QUE B ET C, DANS LES DEUX CAS. NEANMOINS L'ISOLAT B SEMBLE ETRE MOINS GENE A UN NIVEAU D'ENSEMENCEMENT BAS EN AYANT DES POPULATIONS PROCHES DE CEUX DE L'ISOLAT A AU COURS DES PREMIERES HEURES DE FABRICATION.

LES FROMAGES ENSEMENCES AVEC L'ISOLAT A A UN NIVEAU HAUT, AVAIENT UNE CINETIQUE D'ACIDIFICATION PLUS RAPIDE, POURTANT LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* NE SEMBLE PAS ETRE AFFECTEE PAR CETTE ACIDIFICATION PLUS POUSSEE.

LES TROIS ISOLATS SE SONT TRES PEU DEVELOPPES AU COURS DES DEUX PREMIERES HEURES DE FABRICATION. CEPENDANT, EN FONCTION DU NIVEAU D'ENSEMENCEMENT DE DEPART ET DE L'ISOLAT, LES CINETIQUES DE CROISSANCE VARIENT UN PEU.

AU-DELA DE 10^4 UFC/G DE FROMAGE, LA REGLEMENTATION FRANÇAISE STIPULE UNE RECHERCHE D'ENTEROTOXINES. LES POPULATIONS DES ISOLATS ENSEMENCES A NIVEAU HAUT AVAIENT TOUTES DEPASSE CE SEUIL REGLEMENTAIRE. POUR LES ISOLATS ENSEMENCES A UN NIVEAU BAS, SEULE L'ISOLAT A L'AVAIT DEPASSE.

FROMAGES EXPERIMENTAUX DE TYPE TOMME DE SAVOIE

ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

LES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES FROMAGES DE TYPE TOMME DE SAVOIE ONT ETE EFFECTUEES A J+1, J+4 ET A J+42. LES RESULTATS SONT PRESENTES DANS LE TABLEAU XXXXII.

Tableau XXXXII : résultats des analyses physico-chimiques des fromages de type Tomme de Savoie

Stade	ES* (%)	G/S** (%)	HFD*** (%)	Taux de sel dans l'eau (%)
J+1	49,1 ± 1,3	50,3 ± 0,9	66,2 ± 1,2	
J+4	50,6 ± 1,0	50,1 ± 1,2	65,8 ± 1,0	
J+42	51,3 ± 0,8	50,4 ± 0,6	67,6 ± 1,4	2,3 ± 0,5

* ES : Extrait sec ; ** G/S : Gras/sec ; *** HFD : humidité dans le fromage dégraissé.

IL FAUT NOTER QUE LE FROMAGE 3 (ENSEMENCE AVEC L'ISOLAT A A UN NIVEAU BAS) AVAIT UN EXTRAIT SEC PLUS BAS (45,1%) QUE LES AUTRES FROMAGES A J+1 MAIS QU'IL AVAIT AUGMENTE A J+4 (50,2%). CETTE DIFFERENCE DANS L'EXTRAIT SEC POURRAIT ETRE LIEE A UNE ERREUR DE MANIPULATION AU STADE J+1.

ENTRE LA FIN DE FABRICATION ET LA FIN D'AFFINAGE, L'EXTRAIT SEC DES FROMAGES A, EN MOYENNE, LEGEREMENT AUGMENTE.

TABLEAU XXXXIII : RESULTATS DE L'ANALYSE DE LA VARIANCE DE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* SUR FROMAGE TYPE TOMME DE SAVOIE EN FONCTION DE L'ENTEROTOXINE ET DU BIOTYPE.

Poly(temps,2)	pente		courbure	
		6.5362	-0.5738	
	***	***		
Souche	1	2	3	
	3.2030	2.9423	3.3911	

	NS	•	NS	
Niveau	1	2		
	3.2030	3.7670		
	NS	*		
Souche*niveau	1/2	2/2	3/2	
	3.2030	3.8558	3.5361	
	NS	*	NS	
souche*poly(temps,2)	pente	1	2	3
		3.2030	2.0269	3.1181
		NS	NS	NS
	courbure	1	2	3
		3.2030	4.4219	2.0620
		NS	NS	
niveau*poly(temps,2)	pente	1	2	
		3.2030	3.4044	
		NS	NS	
	courbure	1	2	
		3.2030	4.9082	
		NS	•	

*** p<0,0001 ; ** p<0,001 ; * p<0,005 ; • p<0,1 ; NS non significatif

TABLEAU XXXIV : RESULTATS DE L'ANALYSE DE LA VARIANCE DE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* SUR FROMAGE TYPE TOMME DE SAVOIE EN FONCTION DE L'ENTEROTOXINE ET DU BIOTYPE PAR RAPPORT AU PH A STADE MOULAGE + 4H (M+4H).

Poly(temps,2)	pente	courbure	
	2,098	-9,0545	
	NS	NS	
Souche	1	2	3
	3,15867	1,06694	-3,0306
	NS	NS	•
Niveau	1	2	
	3,15867	-4,32684	
	NS	•	
pH m+4h *souche	1/2	2/2	3/2
	3,15867	3,51323	4,33899
	NS	NS	•
pH m+4h *niveau	1	2	
	3,15867	4,66429	
	NS	•	

*** p<0,0001 ; ** p<0,001 ; * p<0,005 ; • p<0,1 ; NS non significatif

EVOLUTION DU PH

LES COURBES MOYENNES DE PH DES FROMAGES CLASSES PAR ISOLAT ET PAR NIVEAU D'ENSEMENCEMENT SONT PRESENTEES DANS LA FIGURE 32. LE PH MOYEN DU LAIT A L'EMPRESURAGE ETAIT DE $6,56 \pm 0,02$. ENTRE L'EMPRESURAGE ET LE M+4 H, LE PH AVAIT BAISSÉ EN MOYENNE DE $1,25 \pm 0,06$, PUIS DE $0,20 \pm 0,04$ ENTRE 4 H ET 6 H APRES MOULAGE, AVANT DE SE STABILISER. LE PH MOYEN A J+1 ET A J+4 ETAIT DE $5,1 \pm 0,1$. LE PH EN FIN D'AFFINAGE ETAIT DE $5,16 \pm 0,05$. LE PH RESTE DONC TRES STABLE TOUT AU LONG DE L'AFFINAGE.

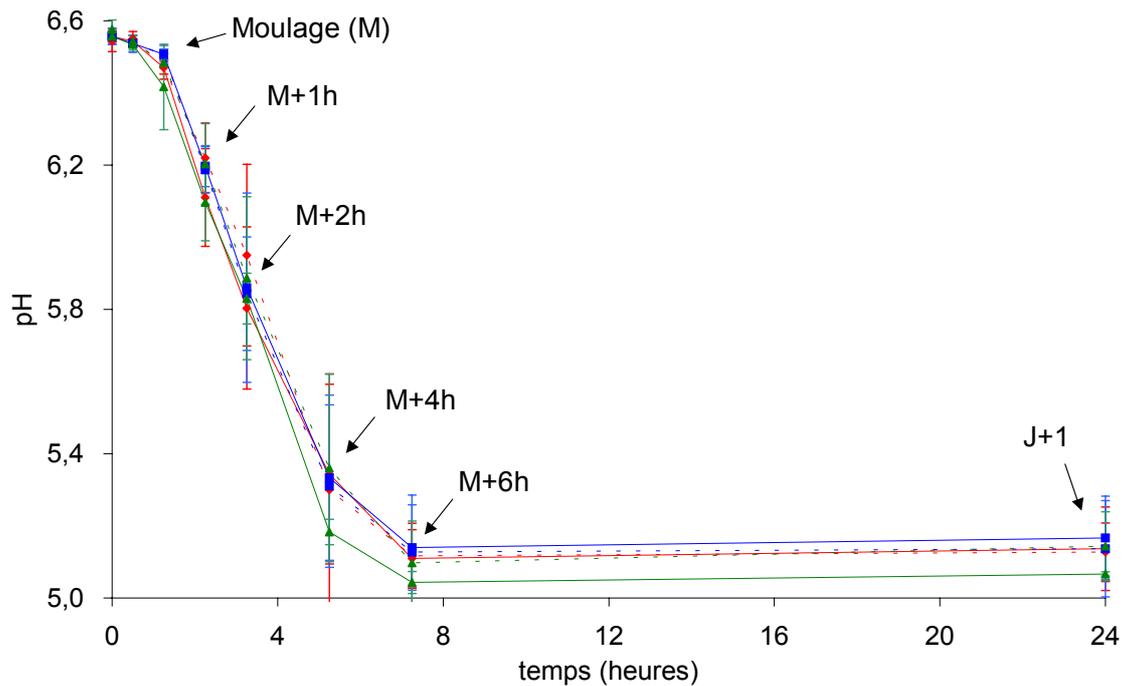


Figure 32 : évolution du pH au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages de type Tomme de Savoie (moyennes par isolat). Niveaux d'ensemencement en *S. aureus* haut (—) et bas (-----). Isolats A (◆) ; isolat B (■) ; isolat C (▲).

QUELQUES VARIATIONS DANS LES CINETIQUES D'ACIDIFICATION ONT PU ETRE OBSERVEES. EN DEBUT DE FABRICATION, LA CINETIQUE DES FROMAGES 4 A 6 ET 13 A 15 ETAIT PLUS RAPIDE, AVEC UN PH FINAL PLUS BAS POUR LES FROMAGES 13 A 15.

EVOLUTION DES SUCRES : LACTOSE ET GALACTOSE

LA FIGURE 33 PRESENTE L'EVOLUTION DES SUCRES (LACTOSE ET GALACTOSE) AU COURS DE L'AFFINAGE DES FROMAGES DE TYPE TOMME DE SAVOIE, EVALUES AUX STADES J+1, J+4, J+15 ET J+42. UNE CONSOMMATION IMPORTANTE DE GALACTOSE A ETE OBSERVEE ENTRE J+1 ET J+15. UNE CONSOMMATION CONCOMITANTE DU LACTOSE A ETE CONSTATEE PENDANT LA PREMIERE PHASE D'AFFINAGE, ENTRE J+1 ET J+15. LA CONSOMMATION DE LACTOSE ETAIT ENSUITE QUASIMENT NULLE EN DEUXIEME PHASE D'AFFINAGE (J+15 A J+42), ALORS QUE LE GALACTOSE RESIDUEL ETAIT CONSOMME ENTRE J+15 ET J+42.

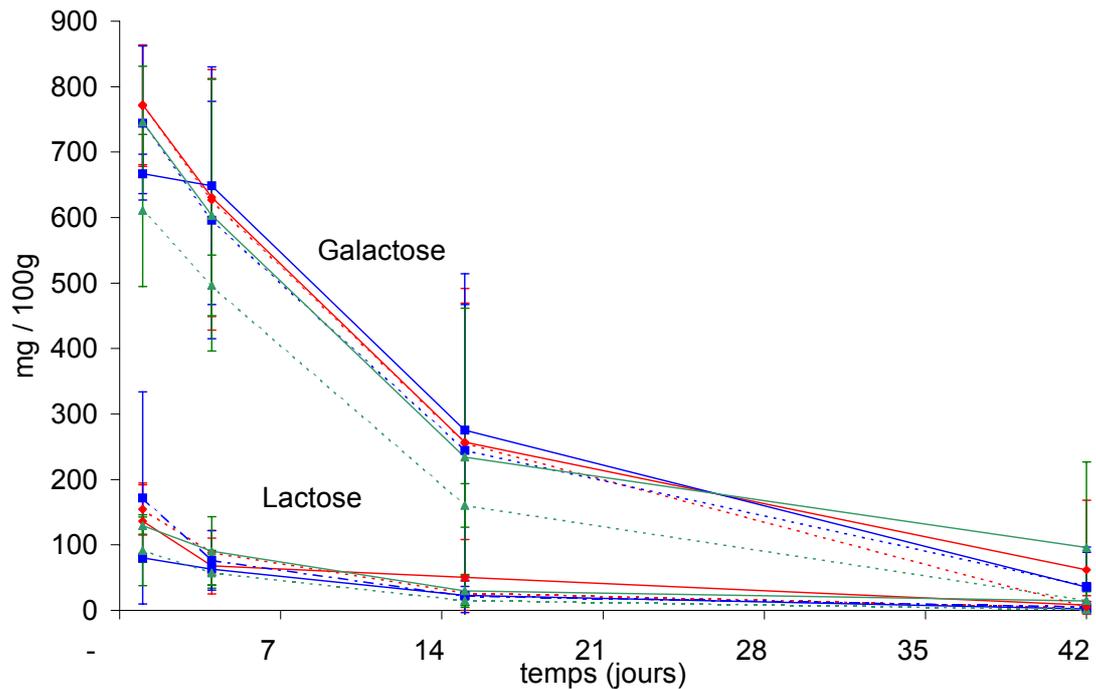


Figure 33 : évolution des sucres au cours de l'affinage des fromages de type Tomme de Savoie (moyennes des trois essais). Niveaux d'ensemencement en *S. aureus* haut (—) et bas (-----) ; isolat A (◆) ; isolat B (■) ; isolat C (▲).

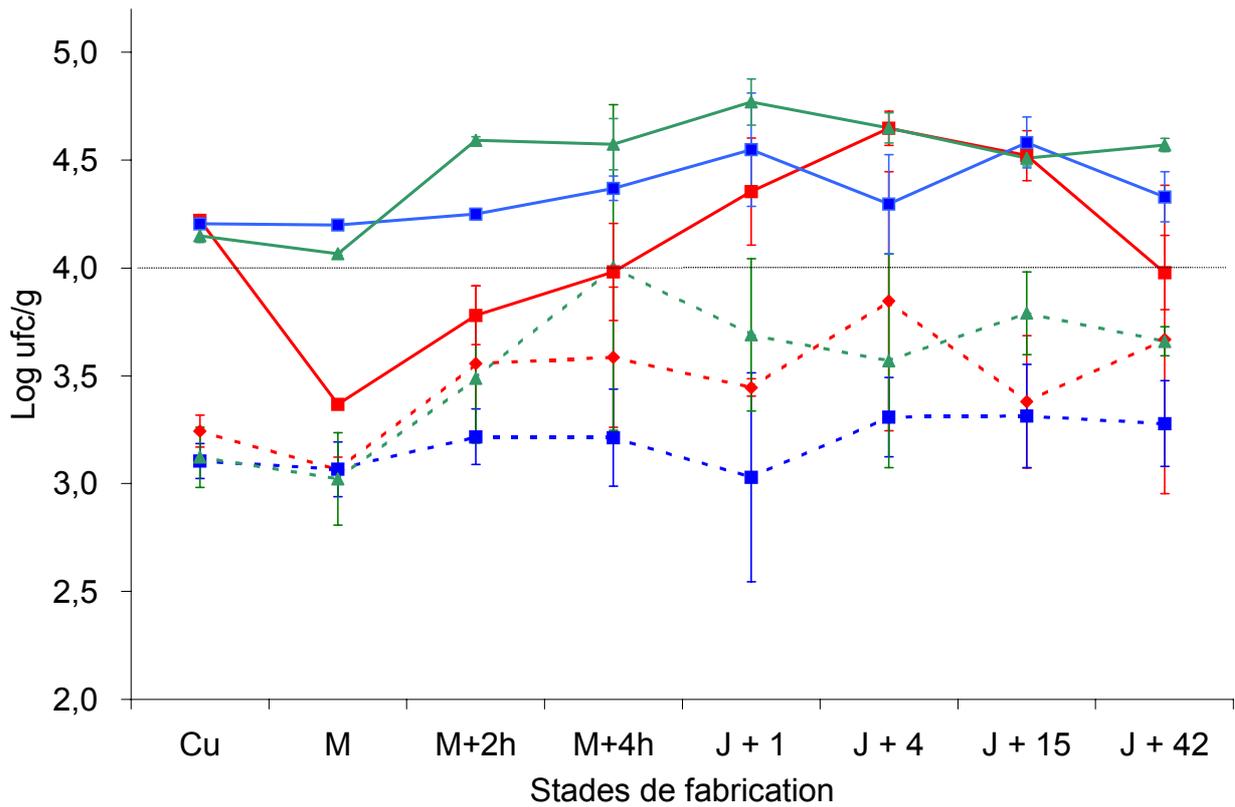


Figure 34 : évolution de la population de *S. aureus* au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages de type Tomme de Savoie (moyennes par isolat). Niveau d'ensemencement en *S. aureus* haut (—) et bas (-----). Isolat A (◆) ; isolat B (■) ; isolat C (▲) ; Cu : lait en cuve ; M : moulage. **La population de l'inoculum de départ a été multipliée par 10 (pour s'affranchir du facteur de concentration).**

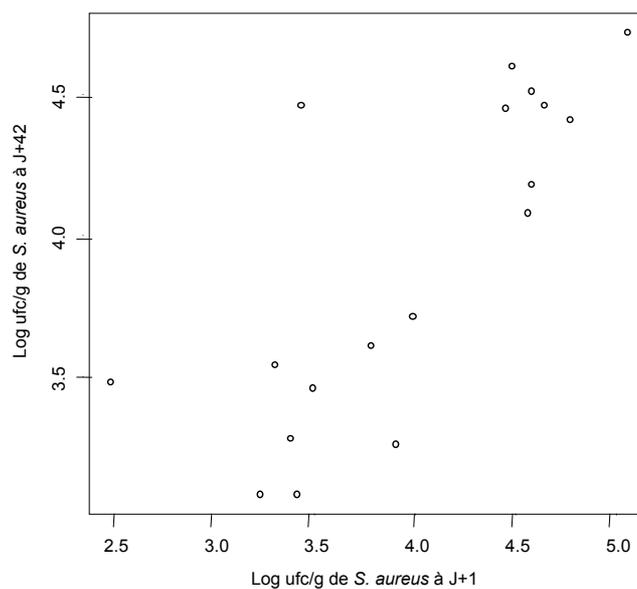


Figure 35 : représentation de la corrélation entre les populations des isolats de *S. aureus* aux stades J+1 et J+42 des fabrications des fromages de type Tomme de Savoie.

EVOLUTION DES POPULATIONS DE *S. AUREUS*

LES ISOLATS ONT ETE INOCULES A DEUX NIVEAUX DE POPULATIONS AVEC UNE MOYENNE DE $1,5 \times 10^2$ UFC/ML $\pm 0,5$ AU NIVEAU BAS ET AVEC UNE MOYENNE DE $1,6 \times 10^3$ UFC/ML $\pm 0,3$ AU NIVEAU HAUT. LES COURBES DE CROISSANCE MOYENNES SONT PRESENTEES DANS LA FIGURE 34. POUR L'ISOLAT A, LA POPULATION LA PLUS ELEVEE ETAIT OBSERVEE A J+4 AU NIVEAU HAUT, AINSI QU'AU NIVEAU BAS, ET POUR LES ISOLATS B ET C ENTRE LE STADE M+4 H ET J+4. CEPENDANT, UNE FORTE VARIABILITE ENTRE LES ESSAIS AVEC UN MEME ISOLAT A ETE OBSERVEE ET NE PERMET PAS VRAIMENT DE CONCLURE.

DE FAÇON GENERALE, LES ISOLATS N'ONT PAS EU LA CROISSANCE ESCOMPTEE DANS LES FABRICATIONS. PENDANT LES PREMIERES HEURES DE FABRICATION, ENTRE L'ENSEMENCEMENT EN CUVE ET LE FROMAGE AU MOULAGE, LES ISOLATS SE SONT TRES PEU DEVELOPPES OU ONT MEME DIMINUE. ENTRE LE MOULAGE ET J+4 LA POPULATION DE L'ISOLAT A A AUGMENTE AVANT DE BAISSER EN FIN D'AFFINAGE, ELLE A AUGMENTE UN PEU A NIVEAU BAS ENTRE J+15 ET J+21.

L'ISOLAT B A EU UNE TRES FAIBLE CROISSANCE, AVANT DE SE STABILISER AU COURS DE L'AFFINAGE. AU DEUX NIVEAUX D'ENSEMENCEMENT, LA POPULATION A M+4 H EST EGALE A LA POPULATION A J+42. L'ISOLAT C AVAIT UNE CROISSANCE PLUS IMPORTANTE JUSQU'A M+4 H A UN NIVEAU D'ENSEMENCEMENT HAUT ET JUSQU'A J+1 A UN NIVEAU D'ENSEMENCEMENT BAS. LES POPULATIONS DIMINUENT LEGEREMENT OU SE STABILISENT ENSUITE AU COURS DE L'AFFINAGE.

LA CINETIQUE D'ACIDIFICATION PLUS RAPIDE EN DEBUT DE FABRICATION (ENTRE MOULAGE ET M+4 H) POUR LES FROMAGES ENSEMENCES AVEC L'ISOLAT A A UN NIVEAU HAUT ET L'ISOLAT C A UN NIVEAU BAS NE SEMBLE PAS GENERER LA CROISSANCE CES ISOLATS. CEPENDANT, LE PH AU STADE M+4 H AVAIT UN EFFET SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS*, EFFET VARIABLE SELON LE NIVEAU D'ENSEMENCEMENT ($P < 0,001$) ET L'ISOLAT ($P < 0,1$). PLUS LE PH ETAIT ELEVE A CE STADE, PLUS LES NIVEAUX DE POPULATIONS DE *S. AUREUS* ETAIENT IMPORTANTS.

IL N'EXISTE AUCUNE CORRELATION ENTRE LES POPULATIONS DE *S. AUREUS* A J+1 OU A J+4 ET LES CONCENTRATIONS EN LACTOSE ET GALACTOSE. CES CONCENTRATIONS SONT SUREMENT PLUS LIEES AUX POPULATIONS DES BACTERIES LACTIQUES. EN REVANCHE, LES POPULATIONS DE *S. AUREUS* A J+1 ET A J+42 ETAIENT FORTEMENT CORRELEES POSITIVEMENT ($P < 0,001$). PLUS LA POPULATION ETAIT IMPORTANTE A J+1, PLUS ELLE ETAIT ELEVEE A J+42 (FIGURE 35).

A L'EXCEPTION DE DEUX ESSAIS AVEC L'ISOLAT C ET D'UN ESSAI AVEC L'ISOLAT A LES ISOLATS ENSEMENCES A UN NIVEAU BAS N'ONT PAS DEPASSE LE SEUIL DE 10^4 UFC/G, A PARTIR DUQUEL LES NORMES EXIGENT UNE RECHERCHE D'ENTEROTOXINES. L'ISOLAT C SE DEVELOPPAIT MIEUX QUE L'ISOLAT A TANDIS QUE L'ISOLAT B ETAIT CELUI QUI SE DEVELOPPAIT LE MOINS BIEN ($P < 0,1$) DANS CE TYPE DE TECHNOLOGIE. CEPENDANT LES POPULATIONS DE *S. AUREUS* ONT PEU EVOLUE AU COURS DE LA FABRICATION ET DE L'AFFINAGE.

TABLEAU XXXV : RESULTATS DE L'ANALYSE DE LA VARIANCE DE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* SUR FROMAGE TYPE REBLOCHON EN FONCTION DE L'ENTEROTOXINE ET DU BIOTYPE.

Poly(temps,2)	pen	courbure			
	6.2360 ***	6.3622 ***			
Souche	1	2	3		
	2.9062 ***	2.7605 ***	3.0212 ***		
Niveau	1	2			
	2.9062 ***	3.8103 ***			
Souche*niveau	1/2	2/2	3/2		
	2.9062 ***	2.8599 NS	2.7235 *		
souche*poly(temps,2)	pen	1	2	3	
		2.9062 NS	2.0213 NS	2.1870 NS	
	courbure	1	2	3	
		2.9062 NS	3.6564 NS	2.0435 NS	
niveau*poly(temps,2)	pen	1	2		
		2.9062 NS	1.6050 NS		
	courbure	1	2		
		2.9062 NS	2.7518 NS		

*** p<0,0001 ; ** p<0,001 ; * p<0,005 ; • p<0,1 ; NS non significatif

TABLEAU XXXVI : RESULTATS DE L'ANALYSE DE LA VARIANCE DE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* SUR FROMAGE TYPE REBLOCHON EN FONCTION DE L'ENTEROTOXINE ET DU BIOTYPE PAR RAPPORT AU pH A STADE J+1

Poly(temps,2)	pen	courbure		
	-41,2644 NS	-33,6613 NS		
Souche	1	2	3	
	6,5731 NS	8,7974 NS	-16,2869 **	
Niveau	1	2		
	6,5731 NS	-19,6456 ***		
pH*souche	1/2	2/2	3/2	
	2,8503 NS	1,7557 NS	6,37811 **	
pH*niveau	1	2		
	2,8503 NS	7,163 **		

*** p<0,0001 ; ** p<0,001 ; * p<0,005 ; • p<0,1 ; NS non significatif

FROMAGES EXPERIMENTAUX DE TYPE REBLOCHON

ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

LES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES FROMAGES DE TYPE REBLOCHON ONT ETE EFFECTUEES AUX STADES J+1 ET J+21. LES RESULTATS SONT PRESENTES DANS LE TABLEAU XXXXVII.

TABLEAU XXXXVII : RESULTATS DES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES FROMAGES DE TYPE REBLOCHON

Stade	ES* (%)	G/S** (%)	HFD*** (%)	Taux de sel dans l'eau (%)
J+1	40,9 ± 1,6	51,4 ± 2,4	74,8 ± 1,8	
J+21	45,1 ± 1,3	53,6 ± 2,6	72,7 ± 1,7	3,1 ± 1,0

* ES : Extrait sec ; ** G/S : Gras/sec ; *** HFD : humidité dans le fromage dégraissé.

UNE AUGMENTATION DE L'EXTRAIT SEC ET DU G/S AU COURS DE L'AFFINAGE A PU ETRE OBSERVEE.

EVOLUTION DU PH

Les courbes moyennes de pH classées par isolat et par niveau d'ensemencement, sont présentées dans la figure 36. Le pH moyen du lait à l'emprésurage était de $6,54 \pm 0,06$. Entre l'emprésurage et le M+6 h, le pH a baissé de $0,85 \pm 0,05$ et s'est stabilisé ensuite, avec seulement une faible baisse jusqu'à 24 h. Au cours de l'affinage le pH a continué à baisser, avec un pH minimum à J+4 de $5,09 \pm 0,01$, puis a augmenté ensuite jusqu'à la fin de l'affinage pour atteindre $5,45 \pm 0,11$. Cependant, quelques différences entre les fromages à 6 h et à 24 h ont pu être observées. Ainsi, les fromages ensemencés avec l'isolat C aux deux niveaux ont eu tendance à acidifier plus rapidement pendant toute la fabrication. Alors que les fromages ensemencés avec l'isolat B ont eu tendance à acidifier plus lentement.

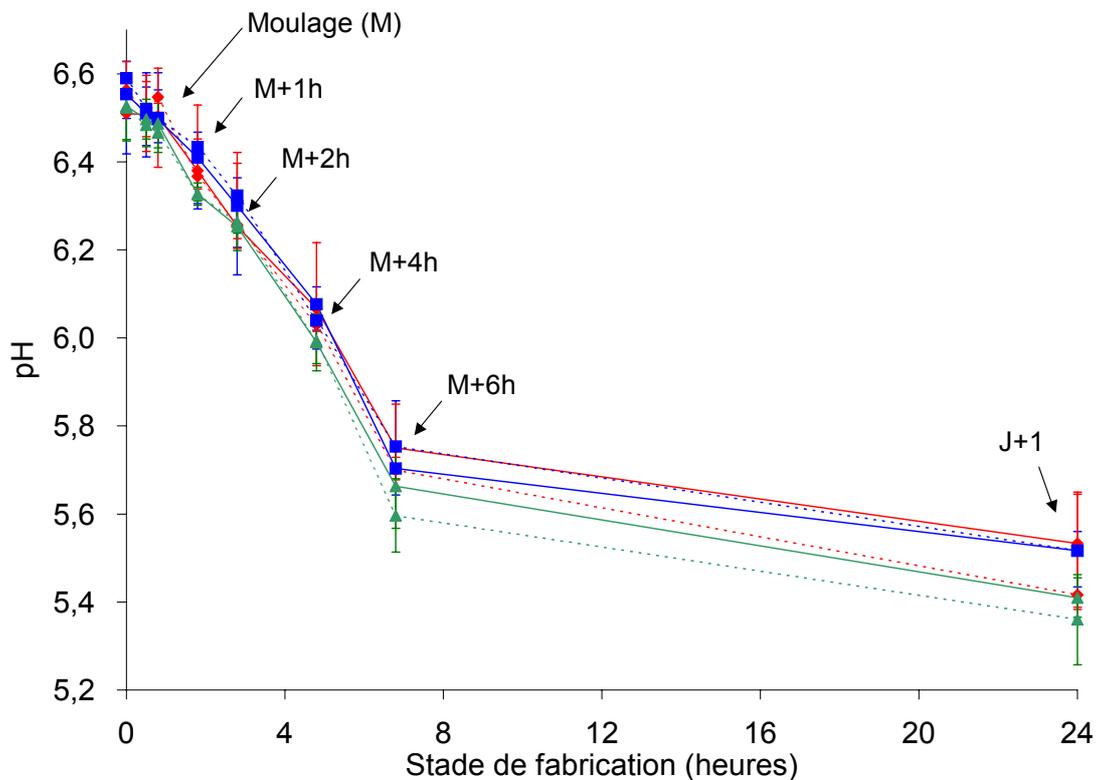


Figure 36 : évolution du pH au cours de la fabrication des fromages de type Reblochon (moyennes par isolat). Niveau d'ensemencement en *S. aureus* haut (—) et bas (-----). Isolot A (◆) ; isolot B (■) ; isolot C (▲).

EVOLUTION DES SUCRES : LACTOSE ET GALACTOSE

LA FIGURE 37 PRESENTE L'EVOLUTION DES SUCRES (LACTOSE ET GALACTOSE) AU COURS DE L'AFFINAGE DES FROMAGES DE TYPE REBLOCHON EVALUES A J+1, J+4, J+15 ET J+21. TOUT D'ABORD IL EST IMPORTANT DE NOTER QU'IL RESTAIT BEAUCOUP DE LACTOSE EN DEBUT D'AFFINAGE. LA MAJORITE DU LACTOSE A ETE CONSOMMEE AU COURS DE LA PREMIERE PHASE D'AFFINAGE, ENTRE J+1 ET J+4, AVEC UNE ACCUMULATION DE GALACTOSE POUR CERTAINS FROMAGES. LA CONSOMMATION DE LACTOSE A ENSUITE ETE QUASIMENT NULLE ENTRE J+4 ET J+21. LE GALACTOSE A ETE CONSOMME ASSEZ RAPIDEMENT ENTRE J+4 ET J+15, ENSUITE LE GALACTOSE RESTANT A ETE CONSOMME AU COURS DE LA DERNIERE PHASE D'AFFINAGE. LE PH A J+1 ETAIT FORTEMENT CORRELE AVEC LA CONCENTRATION EN GALACTOSE ($P < 0,001$). PLUS LE PH ETAIT ELEVE A J+1, PLUS LA CONCENTRATION EN GALACTOSE ETAIT FAIBLE.

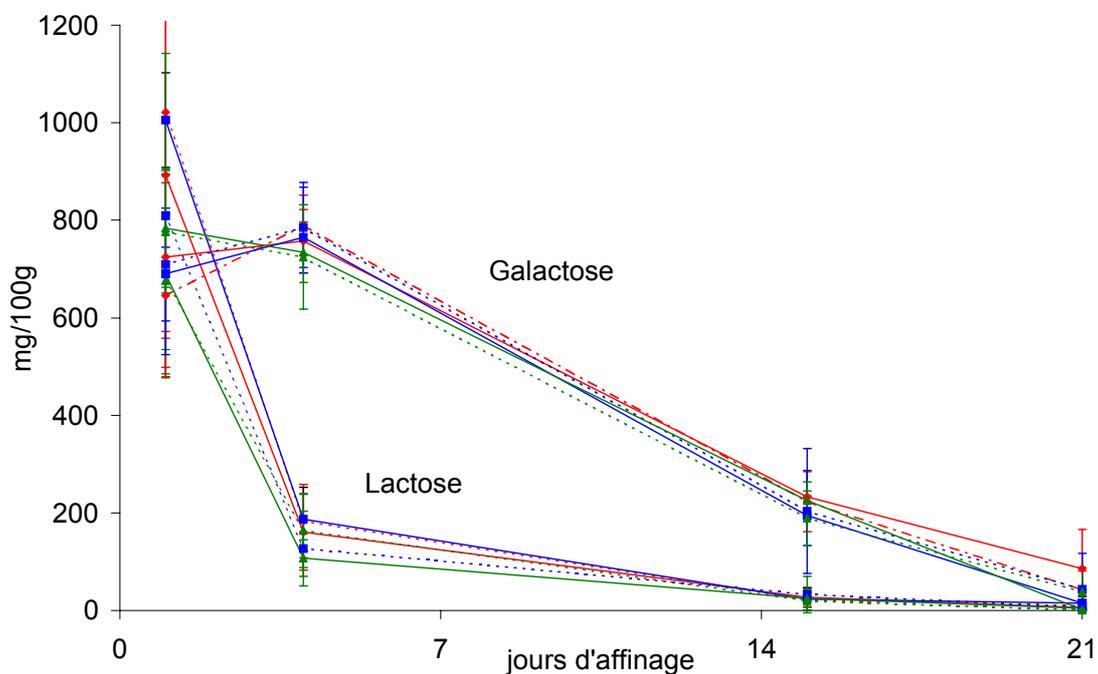


Figure 37 : évolution des sucres au cours de l'affinage des fromages modèles de type Reblochon (moyennes par isolat). Niveau d'ensemencement en *S. aureus* haut (—) et bas (-----). Isolat A (◆) ; isolat B (■) ; isolat C (▲).

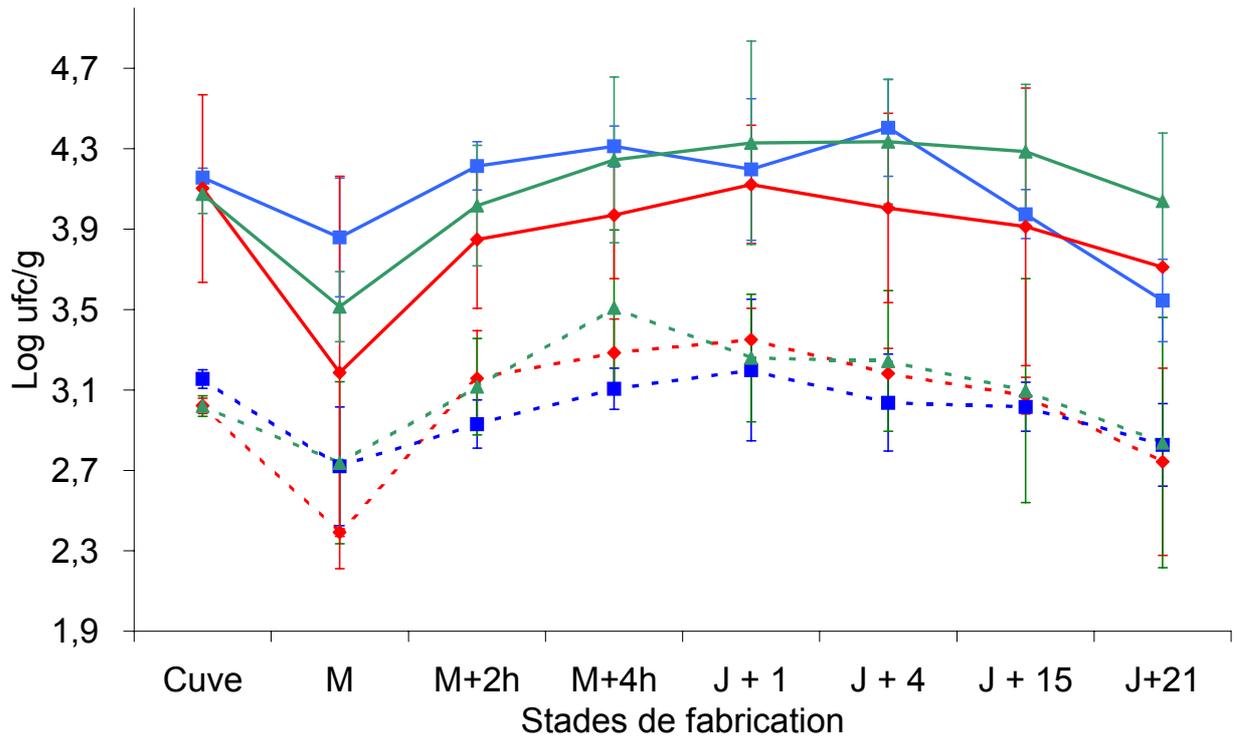


Figure 38 : évolution de la population de *S. aureus* au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages de type Reblochon (moyennes par isolat). Niveau d'ensemencement en *S. aureus* haut (—) et bas (-----). Isolat A (◆) ; isolat B (■) ; isolat C (▲). **La population de l'inoculum de départ a été multipliée par 10 (pour s'affranchir du facteur de concentration).**

EVOLUTION DES POPULATIONS DE *S. AUREUS*

LES ISOLATS DE *S. AUREUS* ONT ETE INOCULES A DEUX NIVEAUX, $1,2 \times 10^2$ UFC/ML \pm 30 EN MOYENNE AU NIVEAU BAS, ET DE $1,3 \times 10^3 \pm 0,3$ UFC/ML EN MOYENNE AU NIVEAU HAUT. LES COURBES D'EVOLUTION DES TROIS ISOLATS ENSEMENCES A DEUX NIVEAUX SONT PRESENTEES DANS LA FIGURE 38.

UNE FORTE VARIABILITE ENTRE LES ESSAIS AVEC UN MEME ISOLAT A ETE OBSERVEE. LES TROIS ISOLATS ONT PRESENTE UNE DECROISSANCE DES NIVEAUX DE POPULATIONS JUSQU'AU MOULAGE. CETTE DECROISSANCE VARIE EN FONCTION DES ISOLATS ET DES NIVEAUX D'ENSEMENCEMENT.

ENTRE MOULAGE ET M+4 H, VOIRE J+1, TOUS LES ISOLATS, QUEL QUE SOIT LE NIVEAU D'ENSEMENCEMENT, ONT MONTRE UNE AUGMENTATION DE LEUR POPULATION JUSQU'A UN MAXIMUM. L'ISOLAT C A PRESENTE L'AUGMENTATION DE POPULATION LA PLUS IMPORTANTE PENDANT CE STADE. LA CINETIQUE D'ACIDIFICATION PLUS RAPIDE ENTRE LE MOULAGE ET M+4 H DANS CES FROMAGES (13 A 18) NE SEMBLE DONC PAS GENERER LA CROISSANCE DE L'ISOLAT C. CEPENDANT, ENTRE M+4 H ET J+1, LE PH DES FROMAGES 13 A 15 EST PLUS BAS QUE LES AUTRES ET UN DECROISSEMENT DE LA POPULATION DE L'ISOLAT C A PU ETRE OBSERVEE. APRES J+1, OU J+4 POUR L'ISOLAT A NIVEAU HAUT, TOUS LES NIVEAUX DE POPULATIONS ONT DIMINUE JUSQU'EN FIN D'AFFINAGE. L'ISOLAT C SE DEVELOPPAIT LE MIEUX ($P < 0,01$) ET L'ISOLAT B LE MOINS BIEN ($P < 0,001$), L'ISOLAT A SE SITUAIT ENTRE LES DEUX DANS CETTE TECHNOLOGIE FROMAGERE.

IL EXISTE UN EFFET DU PH AU STADE J+1 SUR LA POPULATION DE *S. AUREUS* ($P < 0,05$). PLUS LE PH ETAIT ELEVE A CE STADE, PLUS LES NIVEAUX DE POPULATIONS DE *S. AUREUS* ETAIT IMPORTANTE, PLUS PARTICULIEREMENT POUR LES ISOLATS ENSEMENCES A NIVEAU HAUT ($P < 0,001$). CET EFFET N'ETAIT PAS PRESENT AUX STADES DE M+2 H ET DE M+3 H.

AUCUN EFFET STATISTIQUE DE LA CONCENTRATION DE LACTOSE SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* N'A ETE MIS EN EVIDENCE, MAIS IL EXISTAIT UNE TENDANCE ENTRE LA CONCENTRATION EN GALACTOSE ET LA POPULATION DE *S. AUREUS*. A UNE CONCENTRATION MOINS IMPORTANTE EN GALACTOSE CORRESPONDAIT UNE POPULATION PLUS IMPORTANTE DE *S. AUREUS*.

TABLEAU XXXXVIII : PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS LES FROMAGES MODELES SIMULANT TROIS FABRICATIONS TRADITIONNELLES.

Souche	Fromage Niveau d'ensemencement	Type Cantal		Type Tomme de Savoie		Type Reblochon	
		J+2	J+45	J+4	J+42	J+4	J+21
A (AD)	Bas	-	-	- / + (-)*	-	-	-
	haut	-	-	+ (-)*	- (-)*	-	-
B (A)	Bas	-	-	- / + (-)*	-	-	-
	haut	-	-	- / + (-)*	-	- / + (-)*	-
C (D)	Bas	-	-	-	-	-	-
	haut	-	-	- / + (-)*	-	+ (+)*	- (traces)*

() entérotoxines produites par la souche *in vitro*. - : pas de production d'entérotoxines à un niveau détectable avec le kit Transia ; -/+ : échantillons parfois positifs avec le kit Transia ; + : échantillons positifs avec le kit Transia ; (*) résultats obtenus par l'AFSSA.

PRODUCTION D'ENTEROTOXINES

LA RECHERCHE DES ENTEROTOXINES A ETE EFFECTUEE A J+2 POUR LE CANTAL ET A J+4 POUR LA TOMME DE SAVOIE ET LE REBLOCHON. EN CAS D'ABSENCE, UNE RECHERCHE A ETE EFFECTUEE AUX STADES J+21, J+42 ET J+45 POUR LE REBLOCHON, LA TOMME DE SAVOIE ET LE CANTAL, RESPECTIVEMENT. L'ENSEMBLE DES RESULTATS OBTENUS AVEC LE KIT TRANSIA EST PRESENTE DANS LE TABLEAU XXXXVIII.

FROMAGE DE TYPE CANTAL

A J+2, AUCUNE ENTEROTOXINE N'A ETE DETECTEE AVEC LE KIT TRANSIA. LES FROMAGES ONT ETE ENSUITE TESTES AUX STADES J+15 ET J+45. LA ENCORE, AUCUNE ENTEROTOXINE N'A ETE DETECTEE. DEUX TESTS INDIVIDUELS ONT ETE EFFECTUES PAR ECHANTILLON.

FROMAGE DE TYPE TOMME DE SAVOIE

LES ENTEROTOXINES ONT ETE RECHERCHEES DANS LES FROMAGES A J+4. QUATRE TESTS INDIVIDUELS PAR ECHANTILLON ONT ETE EFFECTUES AVEC LE KIT TRANSIA. POUR LES FROMAGES ENSEMENCES AVEC LES ISOLATS A (NIVEAU BAS), B (NIVEAUX BAS ET HAUT) ET C (NIVEAU HAUT), PLUS DE LA MOITIE DES ECHANTILLONS ETAIENT POSITIFS. POUR LES FROMAGES ENSEMENCES AVEC L'ISOLAT A A NIVEAU HAUT, LES TESTS ETAIENT FAIBLEMENT POSITIFS, AVEC DES RESULTATS TRES PROCHES DES SEUILS DE POSITIVITE. LES FROMAGES A J+42 ONT DONC ETE ENSUITE TESTES POUR LA PRESENCE D'ENTEROTOXINES AVEC DES RESULTATS NEGATIFS. AUCUN ECHANTILLON POSITIF AVEC LE KIT TRANSIA N'ETAIT POSITIF AVEC LE KIT OXOID.

FROMAGE DE TYPE REBLOCHON

LES ENTEROTOXINES ONT ETE RECHERCHEES DANS LES FROMAGES A J+4. QUATRE TESTS INDIVIDUELS PAR ECHANTILLON ONT ETE EFFECTUES AVEC LE KIT TRANSIA. LE FROMAGE ENSEMENCE A NIVEAU HAUT AVEC L'ISOLAT B PRESENTAIT PLUS DE LA MOITIE D'ECHANTILLONS POSITIFS. DE MEME AVEC LE FROMAGE ENSEMENCE AVEC L'ISOLAT C A NIVEAU D'ENSEMENCEMENT HAUT, LES TESTS ETAIENT FAIBLEMENT POSITIFS, TRES PROCHES DES SEUILS DE POSITIVITE. CES FROMAGES ONT DONC ETE ANALYSES A J+21 POUR LA PRESENCE D'ENTEROTOXINES ET SE SONT AVERES NEGATIFS. AUCUN ECHANTILLON POSITIF AVEC LE KIT TRANSIA N'ETAIT POSITIF AVEC LE KIT OXOID.

RECHERCHE DES ENTEROTOXINES : METHODE OFFICIELLE DE L'AFSSA

LES ECHANTILLONS POSITIFS, MAIS NEANMOINS DOUTEUX, ET LES ECHANTILLONS EN FIN D'AFFINAGE NEGATIFS, ONT ETE ENVOYES A L'AFSSA (ECHANTILLONS INDiques PAR UN * DANS LE TABLEAU XXXXVIII) POUR UNE RECHERCHE DES ENTEROTOXINES AVEC LA METHODE OFFICIELLE ELISA. CETTE METHODE UTILISE DES ANTICORPS SPECIFIQUES MONOCLONAUX ET QUANTIFIE LES ENTEROTOXINES. UNE RECHERCHE A ETE EFFECTUEE POUR LES ENTEROTOXINES A, B, C ET D UNIQUEMENT. LES ECHANTILLONS ENVOYES

N'ÉTAIENT PAS LES MEMES QUE CEUX UTILISES POUR LA RECHERCHE DES ENTEROTOXINES A L'INRA DE POLIGNY, MAIS PROVENAIENT DES MEMES LOTS DE FROMAGES.

Aucune entérotoxine n'a été retrouvée dans les échantillons de Tomme de Savoie, ni dans l'échantillon de Reblochon au stade J+21. Seulement 0,208 ng/g de fromage de l'entérotoxine SED ont été retrouvés dans l'échantillon de Reblochon à J+4,ensemencé avec l'isolat C (producteur d'entérotoxine D). De manière surprenante, des traces de SEA, non quantifiables, dans les fromages à J+4 et à J+21 ont été également détectées dans ces mêmes fromages.

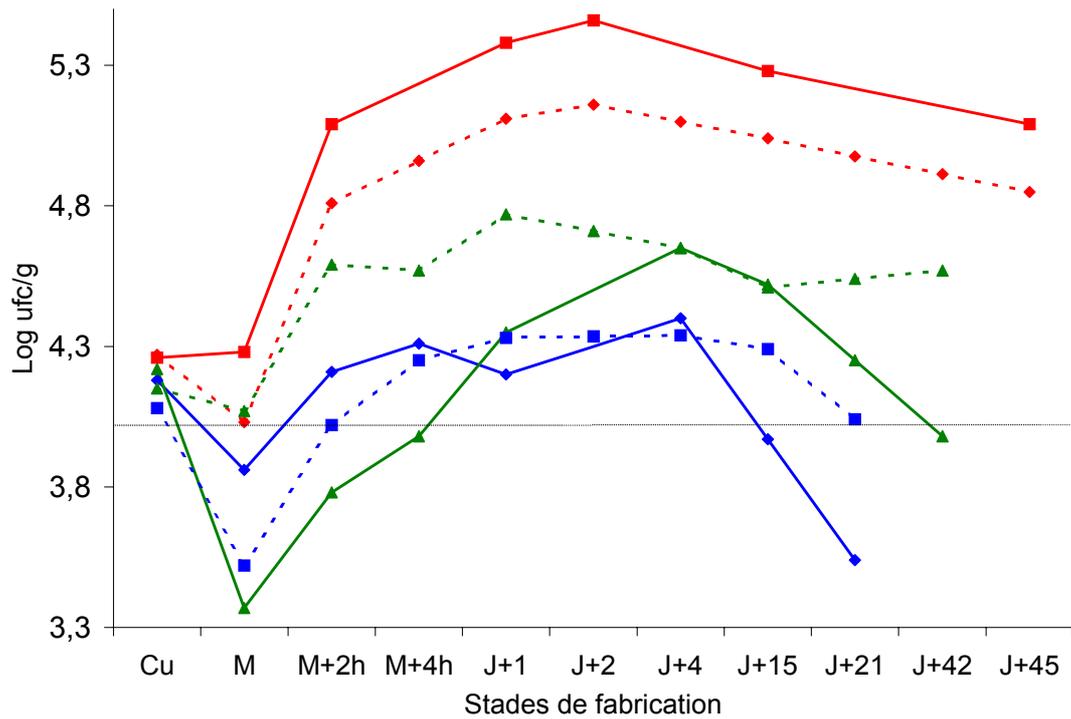


Figure 39 : évolution de la population de *S. aureus* au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages (moyennes par isolat) des trois technologies. Isolot A (—) et isolot C (-----). Cantal (◆) ; Reblochon (■) ; Tomme de Savoie (▲). **La population de l'inoculum de départ a été multipliée par 10 (pour s'affranchir du facteur de concentration).**

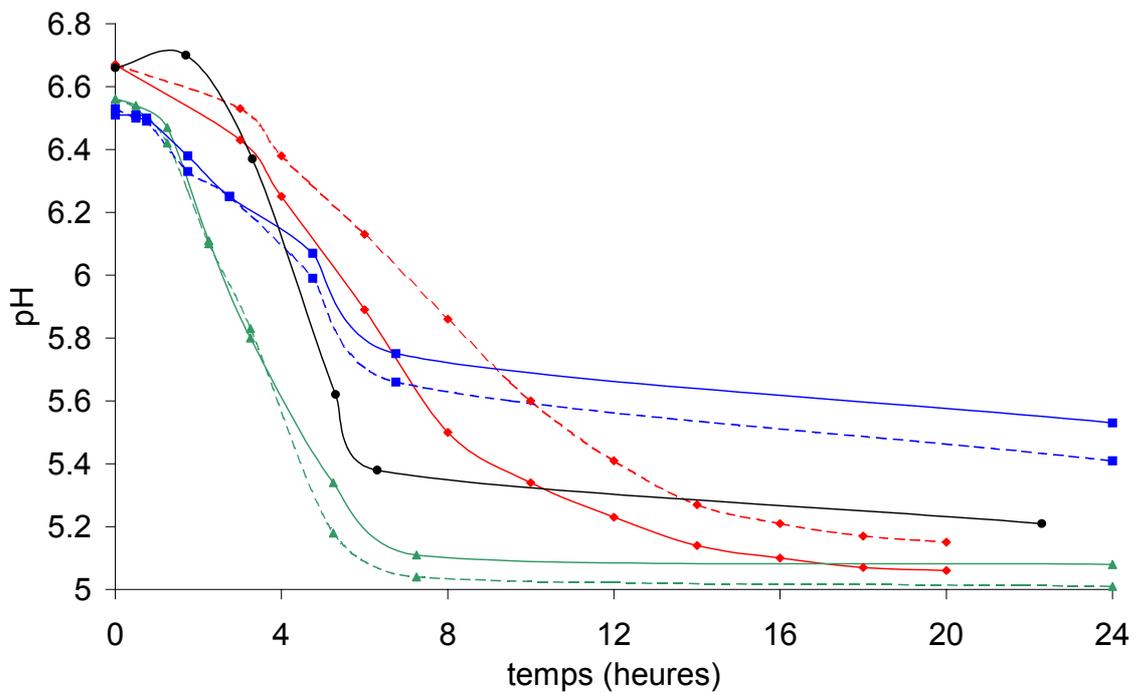


Figure 40 : évolution du pH au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages (moyennes par isolat) des trois technologies. Isolat A (—) ; isolat C (-----). Cantal (◆) ; Reblochon (■) ; Tomme de Savoie (▲) ; fromage modèle (●).

COMPARAISON DE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* DANS LES TROIS TECHNOLOGIES

LES TROIS ISOLATS SE SONT MIEUX DEVELOPPES DANS LE CANTAL QUE DANS LES FROMAGES DE TYPE TOMME DE SAVOIE ET REBLOCHON. LES ISOLATS A ET C SONT PRESENTES DANS LA FIGURE 39. NEANMOINS, CHAQUE ISOLAT N'A PAS LA MEME CAPACITE A SE DEVELOPPER SELON LA TECHNOLOGIE. DES TROIS ISOLATS TESTES, C'EST L'ISOLAT A QUI SE DEVELOPPE LE MIEUX DANS LE FROMAGE DE TYPE CANTAL, ALORS QUE C'EST L'ISOLAT C QUI SE DEVELOPPE LE MIEUX DANS LES FROMAGES DE TYPE TOMME DE SAVOIE ET REBLOCHON.

LES CINETIQUES D'ACIDIFICATION DES TROIS TECHNOLOGIES VARIENT NETTEMENT (FIGURE 40). ENTRE 1 H ET 5 H DE FABRICATION, LE PH DIMINUE DE 0,83 DANS LE CANTAL, DE 1,26 DANS LA TOMME DE SAVOIE ET DE 0,54 DANS LE REBLOCHON. QUE CE SOIT UNE CINETIQUE RAPIDE COMME CELLE DU FROMAGE TYPE TOMME DE SAVOIE OU UNE MOINS RAPIDE COMME CELLE DU FROMAGE DE TYPE REBLOCHON, L'ISOLAT C NE SEMBLE PAS ETRE GENE. L'ISOLAT A, PAR CONTRE, SEMBLE SOUFFRIR DES CINETIQUES D'ACIDIFICATION RAPIDE PENDANT LA FABRICATION, MAIS LES PH BAS N'EMPECHAIENT PAS SON DEVELOPPEMENT PENDANT L'AFFINAGE. DE PLUS, LA CINETIQUE D'ACIDIFICATION MOYENNE LA PLUS RAPIDE RESTE CELLE DU FROMAGE MODELE. DANS CE FROMAGE, LES ISOLATS SE SONT BIEN DEVELOPPES ET DES ENTEROTOXINES ONT ETE DETECTEES, AVEC UN NIVEAU D'INOCULATION CEPENDANT PLUS ELEVE.

CES RESULTATS MONTRENT QUE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET SA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS LE FROMAGE VARIENT EN FONCTION DE LA TECHNOLOGIE ET EN PARTICULIER DE LA CINETIQUE D'ACIDIFICATION. LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* DANS LE FROMAGE EST EGALEMENT VARIABLE EN FONCTION DE L'ISOLAT.

SYNTHESE DES RESULTATS

L'APTITUDE DE TROIS ISOLATS DE LA COLLECTION AQS-SA, PRODUCTEURS DE SEA, SED, ET SEA ET SED, A PRODUIRE DES ENTEROTOXINES DANS DES FROMAGES EXPERIMENTAUX SIMULANT TROIS TECHNOLOGIES TRADITIONNELLES : CANTAL, TOMME DE SAVOIE ET REBLOCHON, A ETE EVALUEE. LES ISOLATS ONT ETE ENSEMENCES A DEUX NIVEAUX : « BAS » (10^2 UFC/ML DE LAIT) ; « HAUT » (10^3 A $2 \cdot 10^3$ UFC/ML). LES FROMAGES ONT ETE FABRIQUES AVEC DU LAIT ECREME MICROFILTRE DONT LA CREME A ETE PASTEURISEE, POUR S'AFFRANCHIR EN MAJEURE PARTIE DE LA FLORE NATURELLE DU LAIT. LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE DANS LE LAIT DE FABRICATION SE TROUVAIENT A UN NIVEAU NON DETECTABLE.

LE CANTAL : DES VARIATIONS DANS LES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES ET DANS L'EVOLUTION DU PH ONT ETE OBSERVEES. DES DIFFERENCES DE COMPORTEMENT ENTRE ISOLATS ONT PU ETRE OBSERVEES. QUEL QUE SOIT LE NIVEAU D'ENSEMENCEMENT, L'ISOLAT A ETAIT CELUI QUI SE DEVELOPPAIT LE MIEUX, L'ISOLAT B LE MOINS BIEN ET L'ISOLAT C SE DEVELOPPAIT MIEUX A NIVEAU BAS D'ENSEMENCEMENT. AU NIVEAU HAUT LES TROIS ISOLATS AVAIENT DEPASSE 10^4 UFC/G ET AU NIVEAU BAS, UNIQUEMENT L'ISOLAT A A EXCEDE CE SEUIL. AUCUNE PRODUCTION D'ENTEROTOXINES N'A ETE DETECTEE DANS LES FROMAGES DE TYPE CANTAL

LA TOMME DE SAVOIE : QUELQUES VARIATIONS DANS LES CINETIQUES D'ACIDIFICATION ONT PU ETRE OBSERVEES. LES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES MONTRAIENT UNE BONNE HOMOGENEITE ENTRE LES FABRICATIONS. LE PH AU STADE M+4 H A EU UN EFFET SUR LES NIVEAUX DE POPULATIONS DE *S. AUREUS* (UN PH PLUS ELEVE A CE STADE EST LIE A UN NIVEAU DE POPULATION DE *S. AUREUS* PLUS ELEVE). LA CINETIQUE DE CROISSANCE VARIAIT EN FONCTION DU NIVEAU D'ENSEMENCEMENT ET DE L'ISOLAT, MAIS EN GENERAL L'ISOLAT C S'EST MIEUX DEVELOPPE. LES TROIS ISOLATS ENSEMENCES AU NIVEAU HAUT ONT DEPASSE LE SEUIL DE 10^4 UFC/G, MAIS UNIQUEMENT L'ISOLAT C AU NIVEAU BAS. LA METHODE AFSSA N'A DEMONTRE AUCUNE PRESENCE D'ENTEROTOXINES DANS LES FROMAGES DE TYPE TOMME DE SAVOIE.

LE REBLOCHON : UNE AUGMENTATION DE L'EXTRAIT SEC ET DU GRAS SUR SEC A ETE OBSERVEE AU COURS DE L'AFFINAGE. QUELQUES VARIATIONS DANS LES CINETIQUES D'ACIDIFICATION ONT PU ETRE OBSERVEES. LE PH A J+1 EST CORRELE NEGATIVEMENT AVEC LA CONCENTRATION DE GALACTOSE DANS LE FROMAGE. LE PH DES FROMAGES A J+1 A UN EFFET SUR LA CROISSANCE GLOBALE DE *S. AUREUS*. LES ISOLATS SE SONT PEU DEVELOPPES AU COURS DE LA FABRICATION, TOUTEFOIS L'ISOLAT C AVAIT UNE MEILLEURE CROISSANCE. LES TROIS ISOLATS A NIVEAU HAUT ONT DEPASSE 10^4 UFC/G, MAIS AUCUN ISOLAT A NIVEAU BAS. DE MANIERE SURPRENANTE, LA METHODE AFSSA A DEMONTRE LA PRESENCE D'UNE TRES FAIBLE QUANTITE DE SED, ET DES TRACES DE SEA NON QUANTIFIABLES DANS LE FROMAGE A J+4 DE TYPE REBLOCHON ENSEMENCE AVEC L'ISOLAT C A NIVEAU HAUT. DES TRACES DE SEA ONT ETE DETECTEES A J+21, MAIS SED N'AS PAS ETE DETECTEE.

C - DISCUSSION

UN FROMAGE MODELE, DE TYPE PATE PRESSEE NON CUITE, A ETE CHOISI POUR EVALUER L'APTITUDE DE 23 ISOLATS DE *S. AUREUS* DE LA COLLECTION AQS-SA A PRODUIRE DES ENTEROTOXINES DANS DES CONDITIONS DE FABRICATION FROMAGERE POUR *IN FINE*, SELECTIONNER TROIS ISOLATS A TESTER DANS DES FABRICATIONS EXPERIMENTALES SIMULANT TROIS TECHNOLOGIES TRADITIONNELLES. LES FROMAGES DE TYPE PATE PRESSEE NON CUITE POSSEDENT UNE ACIDIFICATION « RELATIVEMENT LENTE » FAVORISANT LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET PAR CONSEQUENT LA PRODUCTION POTENTIELLE D'ENTEROTOXINES (MEYRAND ET VERNOZY-ROZAND, 1999 ; DE BUYSER *ET AL.*, 2001). LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE SONT SOUVENT RETROUVES DANS CES TYPES DE FROMAGE, ET PEUVENT ATTEINDRE DES NIVEAUX ASSEZ ELEVES, DE L'ORDRE DE 10^6 - 10^7 UFC/G (SESQUES, 1994 ; OFFNER, 1995 ; SESQUES ET BALLOT, 1998). CEPENDANT, DES ENTEROTOXINES SONT RAREMENT DETECTEES. IL ETAIT ALORS IMPORTANT DE CONNAITRE QUELS FACTEURS ETAIENT SUSCEPTIBLES D'INFLUENCER LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS DES FROMAGES A PATE PRESSEE NON CUITE.

LES FABRICATIONS ONT ETE REALISEES A PARTIR DE LAIT MICROFILTRÉ DONT LA CREME A ETE PASTEURISEE. CETTE « REDUCTION MICROBIENNE » A DEJA ETE UTILISEE AVEC SUCCES DANS D'AUTRES EXPERIMENTATIONS POUR ELIMINER EN GRANDE PARTIE LA FLORE NATIVE DU LAIT CRU (DEMARIGNY *ET AL.*, 1996 ; BEUVIER *ET AL.*, 1997), EGALEMENT SUSCEPTIBLE D'AGIR SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* (SESQUES ET BALLOT, 1998). DANS NOTRE ETUDE, LA MICROFILTRATION DU LAIT ECREME, ALLIEE A LA PASTEURISATION DE LA CREME, A PERMIS DE REDUIRE LA FLORE INITIALE DU LAIT DE 1 A 2 LOG, RESULTATS EN ACCORD AVEC CEUX OBSERVES PAR LES AUTEURS CITES CI-DESSUS. PAR AILLEURS, ELLE A PERMIS DE REDUIRE A UN NIVEAU NON DETECTABLE LA POPULATION DE *S. AUREUS* INDIGENE SUSCEPTIBLE DE NOUS GENERER DANS L'INTERPRETATION DES RESULTATS.

LES ISOLATS DE LA COLLECTION AQS-SA RETENUS ONT ETE COLLECTES DU LAIT ET DU FROMAGE, MAIS CECI N'IMPLIQUE PAS QU'ILS SOIENT CAPABLES DE PROLIFERER DANS CES MILIEUX. LES RESULTATS DE CROISSANCE DES ISOLATS SUR LAIT G A 32°C (TEMPERATURE D'EMPRESURAGE DU FROMAGE MODELE) ONT PERMIS DE CONSTATER QU'ILS POUSSAIENT CORRECTEMENT DANS LE LAIT. PAR AILLEURS, DES DIFFERENCES DE CROISSANCE EN FONCTION DES BIOTYPES ET DU TYPE D'ENTEROTOXINE PRODUITE *IN VITRO* ONT PU ETRE OBSERVEES. CES RESULTATS SONT ORIGINAUX PUISQU'ILS N'AVAIENT JAMAIS ETE DEMONTRES, A NOTRE CONNAISSANCE, DANS LA LITTERATURE.

AFIN DE FAVORISER L'ADAPTATION DES ISOLATS DE *S. AUREUS* AU MILIEU LAIT, ILS ONT ETE CULTIVES AU PREALABLE DANS DU MILIEU SYNTHETIQUE (BOUILLON CŒUR CERVELLE) ADDITIONNE DE 1% DE LAIT, INCUBE A 37°C PENDANT 20 H. CE PROTOCOLE A DEJA ETE UTILISE AVEC SUCCES PAR GOMEZ-LUCIA *ET AL.* (1992). EN EFFET, LA MODE DE PREPARATION DE LA CULTURE DE *S. AUREUS* AVANT ENSEMENCEMENT DANS LE LAIT EST SUSCEPTIBLE D'INFLUENCER LA CROISSANCE, VOIRE LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES. DANS L'ETUDE DE DENGREMONT-TITECA *ET AL.* (1997) MENEES DANS LE CADRE D'UN PROGRAMME ARILAIT - RECHERCHES, LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES N'A PAS PU ETRE MISE EN EVIDENCE MALGRE L'UTILISATION D'UN MODELE DE FROMAGE A PATE PRESSEE NON CUITE AVEC DELACTOSAGE. LA PRECULTURE DE *S. AUREUS* SUR UN MILIEU SYNTHETIQUE (MILIEU TRYPTONE-SOJA) SANS LAIT POURRAIT EXPLIQUER CETTE ABSENCE DE PRODUCTION D'ENTEROTOXINES.

GLOBALEMENT, LES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DES 23 FROMAGES ETAIENT HOMOGENES. UNE ACIDIFICATION LENTE POUR ATTEINDRE UN PH NE DESCENDANT PAS EN DESSOUS DE 5,0 DANS LES FROMAGES MODELES ETAIT UN PREALABLE INDISPENSABLE A LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET DONC LA PRODUCTION POTENTIELLE D'ENTEROTOXINES (MEYRAND ET VERNOZY-ROZAND, 1999 ; DE BUYSER *ET AL.*, 2001). LES LACTOCOQUES ET LES STREPTOCOQUES THERMOPHILES ONT ATTEINT DES NIVEAUX DE 10^9 UFC/G DANS LES FROMAGES A J+1, NIVEAUX DE POPULATIONS NORMALEMENT RENCONTRES DANS LES FROMAGES DE TYPE PATE PRESSEE NON CUITE (BEUVIER, 1990 ; BUCHIN *ET AL.*, 1998).

DANS LE CANTAL, LA MATIERE GRASSE DOIT ETRE AU MINIMUM DE 25,6 G/100 G, LE GRAS SUR SEC DE 45% ET L'EXTRAIT SEC D'AU MOINS 57% DANS LE FROMAGE AFFINE (SESQUES ET BALLOT, 1998). L'EXTRAIT SEC DANS LE FROMAGE DE TYPE CANTAL ETAIT AUTOUR DE 60% ET LE GRAS SUR SEC AUTOUR DE 52%. LES CINETIQUES D'ACIDIFICATION ETAIENT EGALEMENT PROCHES DE LA REFERENCE DANS CE TYPE DE FABRICATION (SESQUES ET BALLOT, 1998 ; SESQUES, 2002). DE MEME, LA CINETIQUE DE CROISSANCE DES TROIS ISOLATS ETUDIES ETAIT PROCHE DES CINETIQUES OBSERVEES DANS LE CANTAL AU LAIT CRU (SESQUES ET BALLOT, 1998 ; SESQUES, 2002). LES FROMAGES EXPERIMENTAUX AVAIENT UN POIDS DE 4 KG EN COMPARAISON DES 10 KG POUR UN PETIT CANTAL COMMERCIAL OU DES 40 KG POUR UN CANTAL DE TAILLE NORMALE. NEANMOINS, LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES REALISEES ONT MONTRE QUE NOS FROMAGES EXPERIMENTAUX REPRESENTAIENT UNE SIMULATION SATISFAISANTE DE LA TECHNOLOGIE CANTAL.

Dans la Tomme de Savoie, un gras sur sec de 20 à 45% est autorisé. Pour les fromages expérimentaux fabriqués à l'ITFF de la Roche-sur-Foron, ce paramètre était légèrement plus élevé, avec un gras sur sec autour de 50%. Les isolats de *S. aureus* ne se sont pas très bien développés dans ce fromage, même si, ensemencés à niveau haut, ils avaient toutefois dépassé le seuil de 10^4 ufc/g de fromage. Ce fromage est propice au développement de cette espèce, pourtant peu de données sont disponibles sur ce sujet (rapport interne, ITFF, 1998). Le levain ensemencé dans le fromage de type Tomme de Savoie était constitué de lactocoques, de streptocoques thermophiles et de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Certaines souches de ces trois espèces sont capables de consommer du lactose au cours de la fabrication. Une croissance rapide des levains lactiques implique une consommation rapide du lactose, avec une acidification concomitante rapide. Notre étude a montré une faible quantité de lactose a J+1 dans les fromages de type Tomme de Savoie, impliquant une bonne croissance du levain. La forte quantité de galactose présent dans les fromages à J+1, a probablement été produite par les streptocoques comme cela a déjà été démontré dans les fromages à pâte pressée cuite (Turner *et al.*, 1983). *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, ne fermentant pas le galactose, peut également être producteur de galactose dans ces fabrications expérimentales. Le lactose épuisé, le galactose est ensuite consommé même s'il n'est pas un substrat privilégié. Seuls les lactocoques et *S. aureus* semblent capables de le consommer. Le séquençage du génome de *S. aureus* a mis en évidence la présence de gènes, identiques à ceux des lactocoques, pour l'utilisation de lactose et de galactose (Kuroda *et al.*, 2001).

Dans le Reblochon, l'extrait sec doit être d'au moins 45%, avec un gras sur sec de 45%. En fin d'affinage, les fromages de type Reblochon réalisés à l'ITFF,

avaient un extrait sec de 45%, mais un gras sur sec plus élevé voisin de 55%. La cinétique d'acidification dans les fromages modèles de type Reblochon était beaucoup plus lente que ce que l'on peut rencontrer généralement dans des fabrications réalisées en fromageries (Reblochon laitier). Par contre, la cinétique d'acidification observée dans le fromage modèle est proche des cinétiques rencontrées dans les fabrications réalisées à la ferme (Reblochon fermier) (Bruno Mathieu, communication personnelle). Ce fromage peut présenter des risques liés à une contamination par *S. aureus*. Ainsi, avec une contamination initiale de 200 ufc/ml, la population peut dépasser 10^4 ufc/g de fromage (Sesques, 1994 ; Offner, 1995). Cependant, le niveau de contamination initiale du lait n'est pas forcément corrélé avec le niveau de population de *S. aureus* atteint, à J+20, en cours d'affinage du fromage de Reblochon (Offner, 1995). Les isolats, avec une population initiale de 10^3 à 2×10^3 ufc/ml, ne se sont pas bien développés dans le fromage modèle de type Reblochon, même s'ils ont dépassé le seuil de 10^4 ufc/g de fromage. Le levainensemencé dans ces fromages était constitué de streptocoques thermophiles et de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. La forte quantité de lactose à J+1 dans les fromages de type Reblochon, indique une faible croissance de ces espèces et par conséquent une acidification moins complète. D'ailleurs, les levains lactiques semblent continuer leur développement les premiers jours d'affinage en consommant le lactose dans sa quasi-totalité et en produisant du galactose de façon concomitante. Le galactose est ensuite, peut-être, consommé par *S. aureus*.

AFIN DE FACILITER LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS LE FROMAGE MODELE, LES ISOLATS DE *S. AUREUS* ONT ETE ENSEMENCES DANS LE LAIT DE FABRICATION A UN NIVEAU AUTOUR DE 10^5 UFC/ML, AFIN D'ATTEINDRE UN NIVEAU DE POPULATION DE 10^6 - 10^7 UFC/G NECESSAIRE A UNE PRODUCTION POTENTIELLE D'ENTEROTOXINES DANS LE FROMAGE (MEYRAND ET VERNZOY-ROZAND, 1999). DANS LE CADRE DE NOTRE ETUDE, LES ISOLATS ONT ATTEINT DES NIVEAUX DE POPULATIONS COMPRIS ENTRE 10^7 ET 10^8 UFC/G. DES NIVEAUX DE POPULATIONS IDENTIQUES ONT ETE OBTENUS DANS DES ETUDES PRECEDENTES CONCERNANT DES FROMAGES MODELES ET DES FROMAGES TRADITIONNELS AVEC DES ENSEMENCEMENTS EN *S. AUREUS* DANS LE LAIT SIMILAIRES A CEUX QUE NOUS AVONS UTILISES (TODD ET AL., 1981 ; SESQUES, 1994). DANS D'AUTRES ETUDES, LES POPULATIONS DE *S. AUREUS* N'ONT PAS DEPASSE 10^6 UFC/G (GOMEZ-LUCIA ET AL., 1992 ; RODRIGUES ET AL., 2000). ON PEUT DONC ESTIMER QUE LES ISOLATS QUE NOUS AVONS TESTES SE SONT BIEN DEVELOPPES DANS LE FROMAGE MODELE.

LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE SE TROUVENT DANS LE LAIT A DES NIVEAUX DE POPULATIONS VARIABLES SELON L'ETAT DU TROUPEAU PAR EXEMPLE OU DES CONTAMINATIONS DUES A L'HOMME OU AUX ANIMAUX DE FERME (NORTHOLT, 1984 ; CAPURRO ET AL., 1999). AINSI, POUR L'EVALUATION DES TROIS SOUCHES DANS LES TROIS TECHNOLOGIES, DEUX NIVEAUX D'ENSEMENCEMENT ONT ETE RETENUS : UN NIVEAU « BAS » A 10^2 UFC/ML DE LAIT QUI CORRESPOND AUX NIVEAUX RECHERCHES PAR LES PROFESSIONNELS, ET UN NIVEAU « HAUT » DE 10^3 A 2×10^3 UFC/ML QUI CORRESPOND AU MAXIMUM ADMIS PAR LA REGLEMENTATION. ACTUELLEMENT, AU NIVEAU DE LA REGLEMENTATION, LA VALEUR SEUIL DANS LE LAIT CRU EST DE 500 UFC/ML AVEC UN MAXIMUM DE 2000 UFC/ML (ANONYME, 2001A). UN LOT EST NON CONFORME SI LA POPULATION D'AU MOINS TROIS ECHANTILLONS SUR CINQ EST ENTRE 500 ET 2000 UFC/ML DE LAIT.

Des études sur milieu synthétique et sur le fromage type Manchego ont montré que *S. aureus* était plus ou moins affecté par le levain (Gomez-Lucia *et al.*, 1992 ; Gonzalez-Fandos *et al.*, 1994), *S. aureus* n'étant pas un bon compétiteur (Mossel et Van Netten, 1990). Les résultats au cours de cette étude n'ont pas permis de mettre en évidence une influence du levain sur la croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxines puisque la nature du levain n'a pas varié dans le plan expérimental avec le fromage modèle à pâte pressée non cuite. Les résultats sur la croissance de *S. aureus* dans ce fromage modèle ont montré un « facteur clé » pour son développement : le pH au stade M+3 heures (minimum : 5,50 ; maximum : 5,93). Plus le pH était faible, plus la croissance de *S. aureus* était ralentie. Une étude d'Offner (1995) a également mis en évidence l'influence du pH dans le caillé pressé avant saumurage sur l'évolution de la population des staphylocoques à coagulase positive au cours de la fabrication du Reblochon. Dans les fromages de type Tomme de Savoie, le pH à M+4 h avait un effet sur la croissance globale des isolats de *S. aureus*. Egalement, nos fabrications de type Reblochon ont mis en évidence un effet du pH à J+1 sur la population de *S. aureus*. Le pH minimal de croissance de *S. aureus* est de 4,0 sur milieu synthétique (Piard et Desmazeaud, 1991). Cependant, la croissance de *S. aureus*, et par conséquent la production d'entérotoxines, sont fortement dépendantes du milieu (disponibilité de nutriments, sel, activité de l'eau, température) (Onoue et Mori, 1997 ; Su et Wong, 1998 ; Meyrand et Vernozy-Rozand, 1999). La complexité du milieu « fromage » pourrait être un élément qui augmente le pH minimum de croissance de *S. aureus*. Dans notre fromage modèle et dans nos fabrications expérimentales type Tomme de Savoie et Reblochon, les valeurs de pH influençant la croissance de *S. aureus* aux stades « clés », respectivement M+3 h, M+4 h et J+1, se situaient entre 5,4 et 6,0.

LES CONDITIONS DU MILIEU NE SEMBLANT PAS ETRE LE SEUL FACTEUR INFLUENÇANT LA CROISSANCE DE *S. AUREUS*. EN EFFET, NOS RESULTATS ONT MIS EN EVIDENCE UN EFFET DU BIOTYPE DE L'ISOLAT SUR LA CINETIQUE DE CROISSANCE DANS LE FROMAGE MODELE, TOUT COMME DANS LE LAIT G. LA ENCORE, AUCUNE ETUDE A CE JOUR, A NOTRE CONNAISSANCE, N'AVAIT DEMONTRE CETTE RELATION.

S. aureus est capable de produire des entérotoxines en moins de deux heures en milieu synthétique (Belay et Rasooly, 2002). Dans notre fromage modèle, la plupart des isolats producteurs d'entérotoxines l'ont confirmé en produisant dans les deux heures suivant l'inoculation dans le lait. Les résultats obtenus concernant la production d'entérotoxines dans le fromage modèle, sont globalement en accord avec les données de la littérature (Gomez-Lucia *et al.*, 1992 ; Otero *et al.*, 1993). Seules SEA et SED ont été produites à des niveaux détectables, avec les méthodes d'extraction et de détection utilisées, aucune production de SEB ou de SEC n'ayant été détectée. SEA et SED, sont les plus fréquentes dans des aliments impliqués dans des TIAC. Elles sont plus facilement produites que SEB et SEC, car leur production est moins affectée par les conditions de croissance que ces dernières (Evenson *et al.*, 1988 ; Wieneke *et al.*, 1993 ; Meyrand *et al.*, 1998 ; Lapeyre, 1999 ; Meyrand *et al.*, 1999b). SEC a pourtant été retrouvée dans du fromage de type Jben, un fromage frais Marocain. Cependant, le lait avait été inoculé à la fois avec le

levain et *S. aureus*, puis laissé 20 h entre 18 et 22°C (Hamama *et al.*, 2002), pouvant expliquer, en partie, la présence de SEC. Par ailleurs, des fragments d'ADN du gène codant pour SEC ont été retrouvés dans un autre fromage frais. Toutefois, la présence de fragments d'ADN n'implique pas nécessairement une production d'entérotoxines (Mäntynen *et al.*, 1997). SEC a également été retrouvée dans des échantillons contaminés de fromage de type suisse (Todd *et al.*, 1981), mais ceci est un phénomène très rare, particulièrement dans ce type de fabrication (pâte pressée cuite). On peut suspecter dans ce cas, des problèmes encourus lors de la fabrication ou une contamination ayant eu lieu après la fabrication elle-même. En accord avec nos résultats, Otero *et al.* (1993) n'ont observé aucune production de SEC même à des niveaux de populations de *S. aureus* au dessus de 10^6 ufc/g. Contrairement à Sesques (1994), aucune production de SEB n'a été détectée avec notre modèle ni à J+3, ni à J+15, même à des niveaux de *S. aureus* de 10^7 à 10^8 ufc/g. Cependant, dans l'étude de Sesques (1994), seules des traces (<0,1 ng/g de fromage) de SEB avaient été détectées en utilisant la technique ELISA de l'AFSSA.

Une population de staphylocoques à coagulase positive au-dessus de 10^4 ufc/g dans le fromage implique automatiquement une recherche d'entérotoxines, selon la réglementation (Anonyme, 2001a). Notre étude n'a démontré aucune présence d'entérotoxines même quand les populations avaient dépassé 10^4 ufc/g dans les fromages de type Cantal et Tomme de Savoie. L'absence d'entérotoxines dans le fromage de type Cantal est en accord avec les résultats observés sur le « terrain » (Sesques, 2002). Ainsi, dans le Cantal, la technologie semble être un obstacle à la production d'entérotoxines par *S. aureus*, le salage dans la masse à J+1, lié au pH bas pourrait être un élément d'explication. Mais d'autres travaux seront nécessaires pour pouvoir expliquer cette non production d'entérotoxines dans la technologie de type Cantal.

Dans notre fromage de type Reblochon, une très faible quantité de SED a été détectée à J+4 (pas en fin d'affinage), tandis que seule SEA, à l'état de traces non quantifiables, a été détectée à J+4 ainsi qu'en fin d'affinage (J+21). La population de *S. aureus* dans le fromage était alors légèrement supérieure à 10^4 ufc/g. Cet isolat possède les gènes codant SEC, SED, SEG, SEH, SEI, SEJ et TSST-1. Une étude récente de Letertre *et al.* (2003b) a montré la présence de variants du gène codant SEA. Ces variants ont produit des réponses négatives par PCR, avec les amorces spécifiques du gène codant SEA. Des résultats négatifs ont déjà été observés avec le kit Oxoid pour des isolats producteurs d'un variant de SEA (Hennekinne, communication personnelle). Par ailleurs, cette détection de SEA pourrait être liée à un croisement des anticorps spécifiques de SEA avec d'autres entérotoxines telle que SEJ, qui possède 66% d'homologie avec SEA. En effet, SEJ n'avait pas encore été mise en évidence lors de la mise au point des anticorps spécifiques de SEA par l'AFSSA. Ces éléments peuvent expliquer en partie, l'absence du gène codant SEA ainsi que l'absence de production *in vitro* de cette entérotoxine. L'absence de SED à J+21 pourrait être dû à un problème d'échantillonnage, car les bactéries ne sont pas nécessairement distribuées de façon homogène dans le fromage (Sesques et Ballot, 1998 ; Fitzsimons *et al.*, 2001).

La détection d'entérotoxines dans le modèle expérimental type Reblochon, même à une faible teneur, est surprenante, car en règle générale, une production d'entérotoxines ne peut avoir lieu que lorsque la population de *S.*

***aureus* dépasse 10^6 ufc/g de fromage (Meyrand et Vernozy-Rozand, 1999; Lapeyre, 2000). Ainsi, dans du St. Nectaire expérimental, des entérotoxines ont été détectées uniquement quand la population de *S. aureus* avait atteint un niveau de 10^7 ufc/g, avec un inoculum de départ de 10^4 ufc/ml de lait (Sesques, 1994). Toutefois, des entérotoxines ont déjà été retrouvées dans des échantillons contenant seulement 10^3 ufc/g de fromage de *S. aureus* (Park et al., 1994 ; Lapeyre, 1997a ; Meyrand et al., 1998).**

L'UTILISATION DU FROMAGE MODELE A SOULIGNE LA PRODUCTION DE SEA ET SED EN CONDITIONS FROMAGERES ET AUCUNE PRESENCE DE SEB OU SEC A DES NIVEAUX DETECTABLES. CES RESULTATS OBTENUS SONT GLOBALEMENT EN ACCORD AVEC CEUX DE LA LITTERATURE ET LES RESULTATS EPIDEMIOLOGIQUES CONCERNANT LES CAUSES DE TIAC. AINSI, L'EVALUATION DE 23 ISOLATS, PRODUCTEURS DE DIFFERENTES ENTEROTOXINES *IN VITRO*, A PRODUIRE CES ENTEROTOXINES DANS UN FROMAGE MODELE A PERMIS, D'UNE PART, DE CONNAITRE PRECISEMENT LE TYPE D'ENTEROTOXINE SUSCEPTIBLE D'ETRE PRODUITE DANS UN FROMAGE DE TYPE PATE PRESSEE NON CUITE, ET D'AUTRE PART, DE METTRE EN EVIDENCE L'IMPORTANCE DE L'ACIDIFICATION ET DU BIOTYPE DE L'ISOLAT SUR LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES.

L'étude de la croissance et de l'entérotoxino-génèse de trois isolats de *S. aureus* dans trois fabrications simulant des fabrications traditionnelles, a montré que dans les types Cantal et Tomme de Savoie, à des niveaux d'inoculum de départ autour de 1000 à 2000 ufc/ml, et avec des populations dépassant 10^4 ufc/g, niveau à partir duquel une recherche d'entérotoxines est exigée, aucune entérotoxine n'a été détectée avec des isolats qui étaient capables d'en produire dans le fromage modèle. Cependant, de très faibles quantités ont été retrouvées dans un des trois essais du modèle fromage de type Reblochon, mais ceci peut être expliqué par une acidification très lente. La valeur de pH optimale pour la croissance de *S. aureus* en condition fromagère, et notamment le stade auquel ce pH est atteint, semble être une étape « clé » de la maîtrise de la croissance de *S. aureus* dans le fromage et par conséquent de production d'entérotoxines. Malgré tout, des travaux complémentaires nous semblent nécessaires pour confirmer ou infirmer ce résultat.

La production d'entérotoxines dans le fromage semble liée aux conditions de fabrication (levain, pH, température, etc.), mais également à la souche elle-même.

Résultats et Discussion – Partie III

EFFET DU POTENTIEL D'OXYDOREDUCTION
SUR LA CROISSANCE DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES SUR BHI ET SUR LAIT

CHOIX DES ISOLATS

L'OBJECTIF ETAIT D'ÉVALUER L'EFFET DU POTENTIEL D'OXYDORÉDUCTION, OU POTENTIEL REDOX, SUR LA CROISSANCE D'UNE SÉLECTION D'ISOLATS DE *S. AUREUS*, ET PLUS PARTICULIÈREMENT SUR LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES, DANS UN MILIEU SYNTHÉTIQUE (BHI) ET DANS LE LAIT.

DEUX ISOLATS PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES *IN VITRO* ET UN ISOLAT NON PRODUCTEUR, DIT « ATOXIQUE », ONT ÉTÉ CHOISIS, POUR ÊTRE TESTÉS DANS LE BHI.

- **Isolat 1A** : biotype inconnu et fortement producteur de SEA *in vitro*.
- **Isolat 3C** : biotype C ovin et fortement producteur de SEC *in vitro*.
- **Isolat 5N** : biotype C bovin et ne produit aucune entérotoxine *in vitro* à des niveaux détectables avec les deux kits utilisés (Transia et Oxoid).

SEUL L'ISOLAT 1A A ÉTÉ TESTÉ DANS LE LAIT.

L'ISOLAT 1A, PRODUCTEUR DE SEA, A ÉTÉ RETENU CAR CETTE ENTEROTOXINE EST LA PLUS FRÉQUEMMENT IMPLIQUÉE DANS DES TIAC. DE PLUS, CET ISOLAT CHOISI A PRODUIT SEA DANS LE FROMAGE MODÈLE. L'ISOLAT 3C, PRODUCTEUR DE SEC *IN VITRO*, A ÉGALEMENT ÉTÉ RETENU CAR CETTE ENTEROTOXINE EST PEU IMPLIQUÉE DANS DES TIAC, ET AUCUNE SEC N'A ÉTÉ DÉTECTÉE DANS LES FROMAGES MODÈLES. CES DEUX ISOLATS ÉTAIENT FORTEMENT PRODUCTEURS DE SEA ET DE SEC *IN VITRO*, AFIN D'OBSERVER AU MIEUX UN EFFET ÉVENTUEL DU POTENTIEL REDOX. UN ISOLAT NON PRODUCTEUR D'ENTEROTOXINES *IN VITRO* A ÉTÉ INCLUS EN TANT QUE TÉMOIN NÉGATIF POUR LA DÉTECTION DES ENTEROTOXINES.

COMPARAISON DE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* SUR BHI ET SUR LAIT

UNE PREMIÈRE EXPÉRIENCE A ÉTÉ RÉALISÉE POUR ÉVALUER LES POSSIBLES DIFFÉRENCES DE CROISSANCE DE *S. AUREUS* SUR BHI ET SUR LAIT AVEC DEUX NIVEAUX D'INOCULUM INITIAUX. UNE PRÉ-CULTURE (20 H À 37°C) DES ISOLATS A ÉTÉ D'ABORD RÉALISÉE SUR BHI (POUR LA CROISSANCE SUR BHI) ET SUR BHI AVEC 1% DE LAIT AJOUTÉ (POUR LA CROISSANCE SUR LAIT). DU LAIT UHT ÉCREME A ÉTÉ UTILISÉ POUR S'AFFRANCHIR DES PROBLÈMES D'INTERACTIONS POSSIBLES ENTRE LA FLORE INDIGÈNE DU LAIT ET LES ISOLATS DE *S. AUREUS* ET POUR AVOIR UN LAIT IDENTIQUE CHAQUE JOUR D'EXPÉRImentation. CE TYPE DE LAIT A DÉJÀ ÉTÉ UTILISÉ AVEC SUCCÈS POUR ÉTUDIER LE POTENTIEL REDOX AVEC D'AUTRES ESPÈCES BACTÉRIENNES (CACHON *ET AL.*, 2002).

L'ÉVOLUTION DE LA CROISSANCE DE L'ISOLAT 1A, SELON L'INOCULUM INITIAL SUR BHI ET SUR LAIT, EST PRÉSENTÉE DANS LA FIGURE 41.

LES ENSEMENCEMENTS INITIAUX ÉTAIENT DE $3,9 \times 10^3$ ET $9,3 \times 10^4$ UFC/ML DE BHI ET DE $1,4 \times 10^4$ ET $1,1 \times 10^5$ UFC/ML DE LAIT POUR LES NIVEAUX 10^4 ET 10^5 , RESPECTIVEMENT. LES POPULATIONS FINALES À 24 H ÉTAIENT DE $6,8 \times 10^8$, ET DE $3,4 \times 10^8$ UFC/ML DE BHI ET DE $3,9 \times 10^8$, ET DE $1,3 \times 10^8$ UFC/ML DE LAIT.

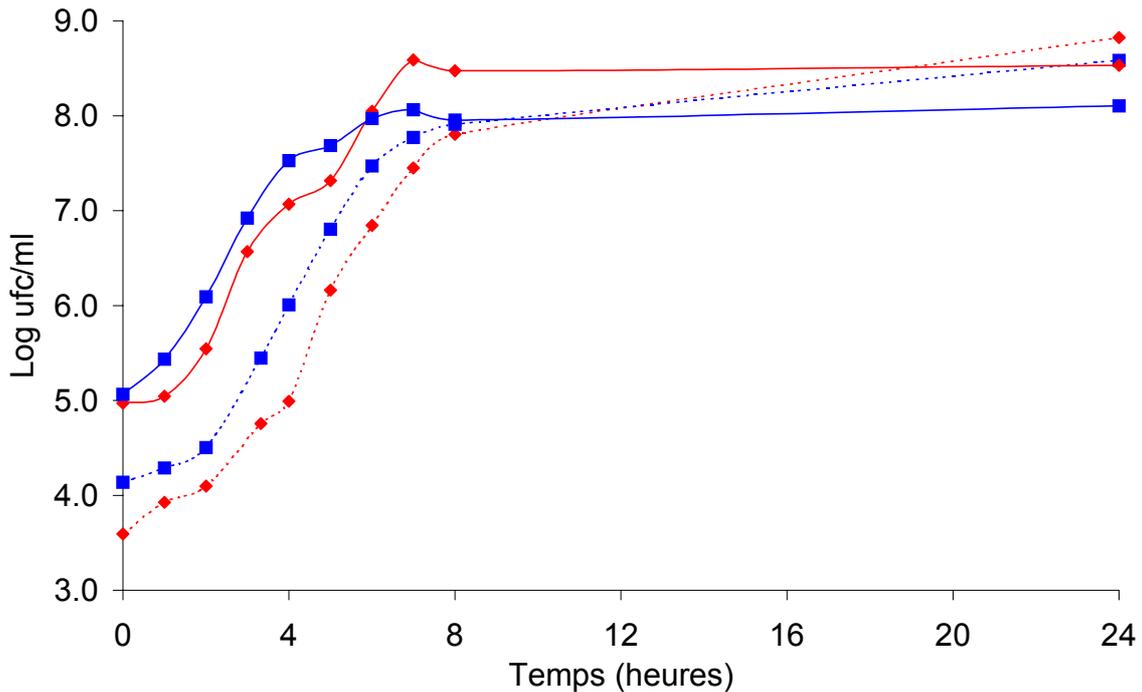


Figure 41 : courbes de croissance de l'isolat 1A, sur BHI et sur lait à 37°C, avec deux niveaux d'inoculum initiaux. BHI ensemencé à 10⁴ ufc/ml (---◆---) ; lait ensemencé à 10⁴ ufc/ml (---■---) ; BHI ensemencé à 10⁵ ufc/ml (—◆—) ; lait ensemencé à 10⁵ ufc/ml (—■—).

L'ISOLAT 1A AVAIT UNE CROISSANCE PLUS RAPIDE AU DEBUT SUR LAIT QUE SUR BHI, MAIS AVEC UN EPUISEMENT PLUS PRECOCE. CETTE TENDANCE SUR LAIT ET SUR BHI A ETE OBSERVEE POUR LES TROIS ISOLATS ETUDIES. CE RALENTISSEMENT DE CROISSANCE EST PEUT-ETRE LIE A UN EPUISEMENT DES NUTRIMENTS PLUS RAPIDE DANS LE LAIT QUE DANS LE BHI. *S. AUREUS* EST UNE ESPECE AYANT DES EXIGENCES NUTRITIONNELLES PARTICULIERES, EN AZOTE ORGANIQUE, EN VITAMINES ET EN ACIDES AMINES (TAYLOR ET HOLLAND, 1989 ; KURODA ET AL., 2001).

STRATEGIE SCIENTIFIQUE DEVELOPPEE POUR APPREHENDER L'EFFET DU POTENTIEL REDOX SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

LES CHANGEMENTS DU POTENTIEL REDOX DE L'ENVIRONNEMENT (MILIEU SYNTHETIQUE, LAIT, FROMAGE) ONT UN GRAND IMPACT SUR LA CELLULE VIVANTE (BESPALOV ET AL., 1996 ; AUBERT ET AL., 2002). L'OBJECTIF DE CE TRAVAIL ETAIT DONC D'EXPLORER L'EFFET DE CE PARAMETRE ENVIRONNEMENTAL (CONDITIONS REDUITES, OXYDEES ET STANDARDS) SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET SA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*. A NOTRE CONNAISSANCE, CET ASPECT N'A JAMAIS ETE ETUDIE. LA PLUPART DES ETUDES SONT CENTREES SUR LES BACTERIES LACTIQUES (AUBERT ET AL., 2002 ; CACHON ET AL., 2002) ET *ESCHERICHIA COLI* (BESPALOV ET AL., 1996 ; RIONDET ET AL., 1999).

CETTE TECHNIQUE EST UNE APPROCHE NOUVELLE DANS LA COMPREHENSION DE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET DE SA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS.

STRATEGIE METHODOLOGIQUE

AFIN D'ÉVALUER L'EFFET D'UN MILIEU REDUIT ET D'UN MILIEU OXYDE SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET SA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES PAR RAPPORT A UN TEMOIN (BHI OU LAIT), DEUX MOLECULES ONT ÉTÉ RETENUES, UNE OXYDANTE (HEXACYANOFERRATE DE POTASSIUM, $K_3[Fe(CN)_6]$) ET UNE REDUCTRICE (DITHIOTHREITOL, DTT), POUR REGLER LE POTENTIEL REDOX INITIAL DU MILIEU. CES MOLECULES ONT DÉJÀ ÉTÉ UTILISÉES DANS D'AUTRES ÉTUDES POUR LE REGLAGE DU POTENTIEL REDOX (BESPALOV *ET AL.*, 1996 ; RIONDET *ET AL.*, 1999 ; RIONDET *ET AL.*, 2000). AUCUNE TOXICITÉ ENVERS LES ESPÈCES CONCERNÉES N'AVAIT ÉTÉ CONSTATÉE POUR L'HEXACYANOFERRATE DE POTASSIUM. RIONDET *ET AL.* (1999) ONT MONTRÉ QUE LE DTT N'ÉTAIT QUÉ FAIBLEMENT TOXIQUÉ ENVERS *E. COLI* A UN NIVEAU DE 0,5% W/V.

AFIN DE VÉRIFIER LA TOXICITÉ ÉVENTUELLE DE CES MOLECULES ENVERS *S. AUREUS*, LE SUIVI DE LA POPULATION DES ISOLATS, AVEC OU SANS AJOUT DE CES MOLECULES, A ÉTÉ RÉALISÉ PENDANT UNE PÉRIODE DE 24 HEURES. L'HEXACYANOFERRATE DE POTASSIUM ET LE DTT ONT ÉTÉ AJUSTÉS A UNE CONCENTRATION FINALE DONNÉE. PUIS, LE POTENTIEL REDOX STANDARD DU BHI A ÉTÉ ATTEINT EN AJOUTANT DU DTT A L'HEXACYANOFERRATE DE POTASSIUM, ET INVERSEMENT.

- « Neutralisation » de l'hexacyanoferrate de potassium :
 - 2 ml de $K_3[Fe(CN)_6]$ à 200 mg/l + 10,8 ml d'une solution de DTT à 0,5 g/l
- « Neutralisation » du DTT :
 - 2 ml de DTT à 50 g/l + 2,4 ml d'une solution de $K_3[Fe(CN)_6]$ à 200 g/l

POUR PARVENIR A DES CONDITIONS INITIALES REDUCTRICE ET OXYDANTE, LES DEUX MILIEUX, BHI ET LAIT, ONT ÉTÉ ALORS AJUSTÉS AVEC L'UNE OU L'AUTRE DE CES MOLECULES. LE PH, LE REDOX ET L'ÉVOLUTION DES POPULATIONS DE *S. AUREUS* AINSI QUE LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES ONT DONC ÉTÉ ÉVALUÉS DANS CES DEUX CONDITIONS PAR RAPPORT A UN TEMOIN (BHI OU LAIT SANS AJOUT).

RESULTATS - DISCUSSION

PROBLEMES RENCONTRES

CERTAINS PROBLEMES TECHNIQUES ET EXPERIMENTAUX SONT SURVENUS AU COURS DE CE TRAVAIL, LE REDOX ETANT UN PARAMETRE TRES DIFFICILE A ETUDIER.

POUR « NEUTRALISER » LE BHI, A PARTIR D'UN CERTAIN SEUIL, UNE TRES FAIBLE QUANTITE DE SOLUTION (UNE GOUTTE) FAIT AUGMENTER OU CHUTER BRUSQUEMENT LE POTENTIEL REDOX. PAR CONSEQUENT, IL ETAIT TRES DIFFICILE DE STABILISER LE POTENTIEL REDOX DU BHI AU NIVEAU INITIAL APRES REDUCTION PAR LE DTT OU OXYDATION PAR L'HEXACYANOFERRATE DE POTASSIUM. CES PROBLEMES DE NEUTRALISATION N'ONT PAS PERMIS DE VALIDER LA NON-TOXICITE DES MOLECULES REDOX SUR L'ISOLAT 3C. DE PLUS, DES PROBLEMES DE CONTAMINATION ONT ETE RENCONTRES POUR L'ISOLAT 5N AU COURS DE CETTE EXPERIENCE, LA TOXICITE DES DEUX MOLECULES ENVERS CET ISOLAT N'A PAS PU ETRE EVALUEE. CEPENDANT, AUCUN PROBLEME N'A ETE RENCONTRE LORS DE LA NEUTRALISATION DES MILIEUX POUR L'ISOLAT A. EN EFFET, LES MILIEUX AVAIENT DES POTENTIELS REDOX INITIAUX DE +220 mV POUR LE BHI TEMOIN, +175 mV POUR LE BHI REDUIT « NEUTRALISE » ET +160 mV POUR LE BHI OXYDE « NEUTRALISE ». LES DIFFERENCES DE CROISSANCE, BIEN QUE FAIBLES, TENDENT A MONTRER QUE LE DTT (MILIEU REDUIT « NEUTRALISE ») RALENTIT LEGEREMENT LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* EN DEBUT DE CULTURE. LES POPULATIONS FINALES ATTEINTES SONT CEPENDANT IDENTIQUES. D'AUTRES ESSAIS SERAIENT NECESSAIRES POUR CONFIRMER CETTE TENDANCE.

DES PROBLEMES ONT EGALEMENT ETE RENCONTRES AVEC LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES *IN VITRO* POUR L'ISOLAT 1A, PUISQUE AUCUNE ENTEROTOXINE N'A ETE DETECTEE DANS LE TEMOIN. CEPENDANT NOUS PENSONS INTERESSANT DE PRESENTER LES RESULTATS OBTENUS AVEC CET ISOLAT SUR LE BHI ET SUR LE LAIT.

4.2 Evolution de *S. aureus* sur BHI

LES RESULTATS OBTENUS AVEC L'ISOLAT 1A DANS LE BHI SONT PRESENTES DANS LES FIGURES 42 ET 43. LE POTENTIEL REDOX A ETE SUIVI EN CONTINU ET LES VALEURS REDOX RELEVees ONT ETE CORRIGees PAR RAPPORT A LA TEMPERATURE ET AU PH DU MILIEU.

L'INOCULUM INITIAL DE L'ISOLAT 1A ETAIT DE $7,20 \times 10^4 \pm 0,5$ UFC/ML ET SA POPULATION FINALE A 24 H ETAIT DE $5,2 \times 10^8 \pm 0,9$ UFC/ML.

LE REDOX INITIAL ETAIT DE +215 mV POUR LE TEMOIN, DE +419 mV POUR LE MILIEU OXYDE ET DE -202 mV POUR LE MILIEU REDUIT.

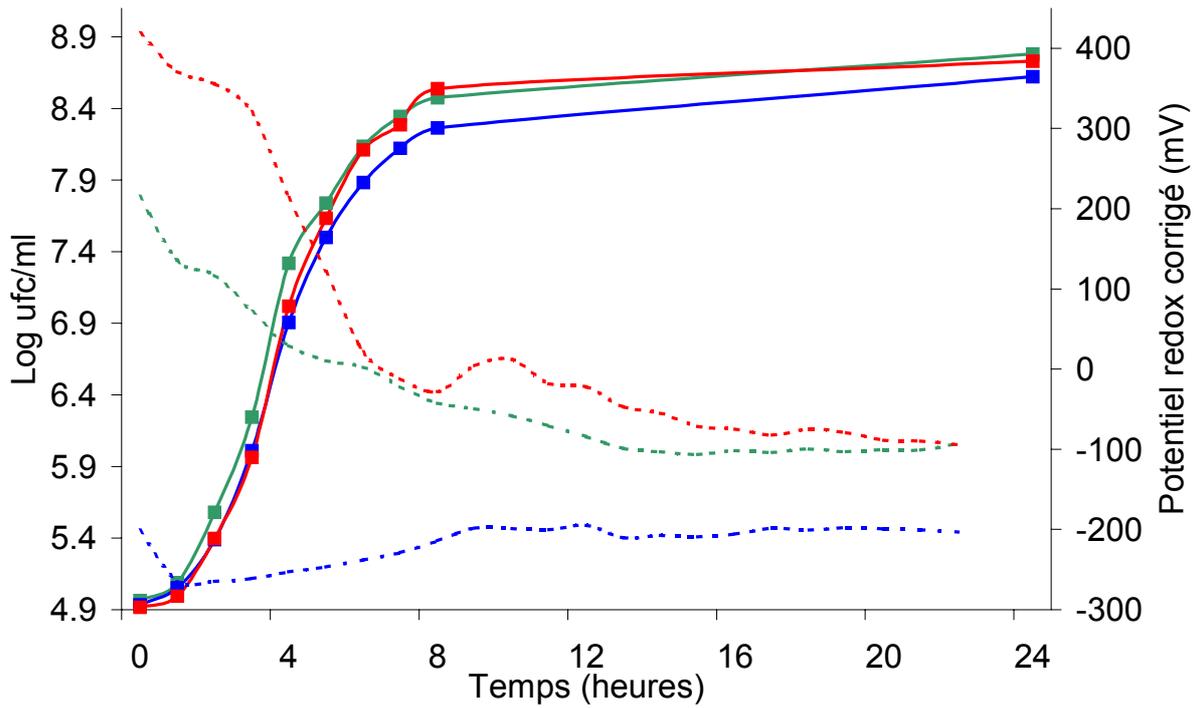


Figure 42 : évolution de la population de l'isolat 1A et du potentiel redox au cours de 24 h d'incubation à 37°C dans du BHI. Courbes moyennes des trois essais. Oxydé (—◆—) ; réduit (—■—) ; témoin (—▲—). Potentiel redox milieu : oxydé (---◆---) réduit (---■---) et témoin (---▲---).

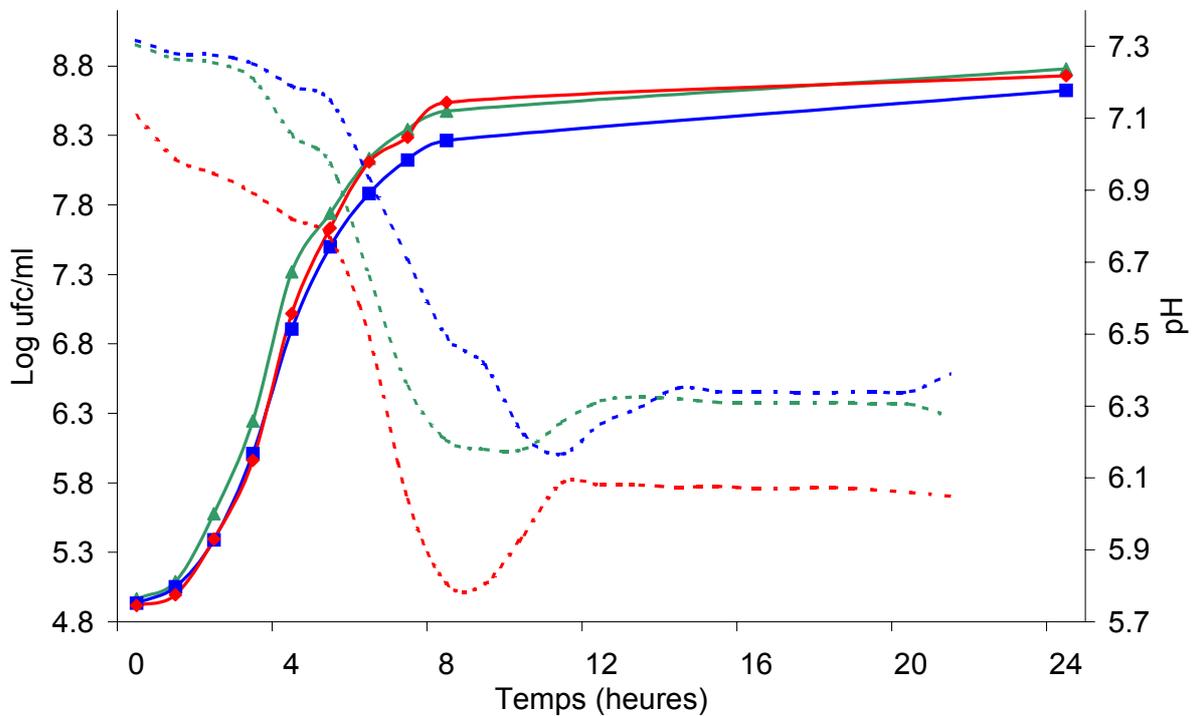


Figure 43 : évolution de la population de l'isolat 1A par rapport à la cinétique d'acidification au cours de 24 h d'incubation à 37°C dans du BHI. Courbes moyennes des trois essais. Oxydé (—◆—) ; réduit (—■—) ; témoin (—▲—). pH milieux : oxydé (---) réduit (---) et témoin (---).

DANS LES MILIEUX TEMOIN ET OXYDE, LE POTENTIEL REDOX BAISSA FORTEMENT JUSQU'À 6 H DE CULTURE. LE MILIEU OXYDE EST FORTEMENT REDUIT PENDANT CETTE PHASE ET REJOINT LA VALEUR DE REDOX DU MILIEU TEMOIN. APRES STABILISATION, LE POTENTIEL REDOX DU MILIEU REDUIT AUGMENTE LEGEREMENT ET REGULIEREMENT JUSQU'EN FIN DE CULTURE. AU BOUT DE 16 H D'INCUBATION, LE POTENTIEL REDOX AVAIT ATTEINT -100 mV POUR LE TEMOIN ET L'OXYDANT ET -200 mV POUR LE REDUCTEUR. LES TROIS ISOLATS SE COMPORTEAIENT DE FAÇON SIMILAIRE DANS LES TROIS CONDITIONS REDOX INITIAUX, AVEC UNE CROISSANCE LEGEREMENT PLUS RAPIDE DES LE DEBUT POUR LE MILIEU TEMOIN ET UN NIVEAU DE POPULATION EN FIN DE PHASE EXPONENTIELLE UN PEU INFERIEUR EN MILIEU REDUIT. LA CROISSANCE PLUS LENTE EN MILIEU REDUIT (AVEC DTT) CONCORDE AVEC LA CROISSANCE OBSERVEE DANS LE MILIEU REDUIT « NEUTRALISE » ET POURRAIT ETRE DUE A L'EFFET LEGEREMENT TOXIQUE DU DTT. CEPENDANT, LA DIFFERENCE DE NIVEAU DE POPULATION EN FIN DE PHASE EXPONENTIELLE ET EN FIN DE CULTURE N'AVAIT PAS ETE OBSERVEE DANS LE MILIEU REDUIT « NEUTRALISE » ET POURRAIT ETRE DUE AUX CONDITIONS REDUCTRICES DU MILIEU.

L'EVOLUTION DU PH DANS LE MILIEU BHI, SELON LE REDOX INITIAL DU MILIEU, EST PRESENTEE DANS LA FIGURE 43. AU DEPART, LE PH MOYEN ETAIT DE 7,1 DANS LE MILIEU OXYDE, ET AUTOUR DE 7,3 DANS LES MILIEUX TEMOIN ET REDUIT. QUEL QUE SOIT LE REDOX INITIAL DU MILIEU, UNE BAISSA RAPIDE DU PH ETAIT OBSERVEE A PARTIR DE 6 H DE CROISSANCE. CETTE BAISSA DU PH ETAIT MOINS RAPIDE DANS LE MILIEU REDUIT. LE PH MINIMAL A ETE ATTEINT APRES 10 H DANS LES MILIEUX TEMOIN ET OXYDE ET APRES 12 H DANS LE MILIEU REDUIT. ENSUITE UNE REMONTEE DU PH ETAIT OBSERVEE. APRES CETTE REMONTEE, LE PH SE STABILISAIT A UNE VALEUR DE 6,05 EN CONDITION OXYDANTE INITIALE, DE 6,3-6,4 DANS LES MILIEUX TEMOIN ET REDUIT, CE QUI RETABLISAIT LA DIFFERENCE INITIALE DE PH ENTRE LES MILIEUX.

MALHEUREUSEMENT, AUCUNE ENTEROTOXINE N'A PU ETRE DETECTEE DANS CES CULTURES SUR BHI DANS LE MILIEU TEMOIN. NOUS N'AVONS AUCUNE EXPLICATION A CELA ET NOUS LE DEPLORONS N'AYANT AINSI PAS PU APPREHENDER L'EFFET DU POTENTIEL REDOX SUR LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*, LE MANQUE DE TEMPS NE NOUS A PAS PERMIS DE REPRODUIRE CETTE EXPERIMENTATION.

4.3 *Evolution de S. aureus sur lait*

L'EFFET DU POTENTIEL REDOX INITIAL SUR LA CROISSANCE ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES A ETE EGALEMENT OBSERVE DANS LE LAIT. LES VALEURS REDOX RELEVees ONT ETE CORRIGees SELON LA TEMPERATURE ET LE PH DU MILIEU. LES RESULTATS SONT PRESENTES SUR LES FIGURES 44 ET 45.

LA CROISSANCE EXPONENTIELLE DE L'ISOLAT 1A EST PLUS RAPIDE SUR LE LAIT TEMOIN ET DONC LE NIVEAU DE POPULATION ATTEINT EN FIN DE PHASE EXPONENTIELLE EST PLUS ELEVE. LA CROISSANCE EST LEGEREMENT PLUS LENTE SUR LE LAIT REDUIT (POTENTIELLEMENT L'EFFET DE TOXICITE DU DTT) ET LE NIVEAU DE POPULATION ATTEINT EN FIN DE PHASE EXPONENTIELLE EST INFERIEUR (EFFET REDUCTEUR DU MILIEU). CES RESULTATS SONT EN ACCORD AVEC CEUX OBSERVES SUR BHI.

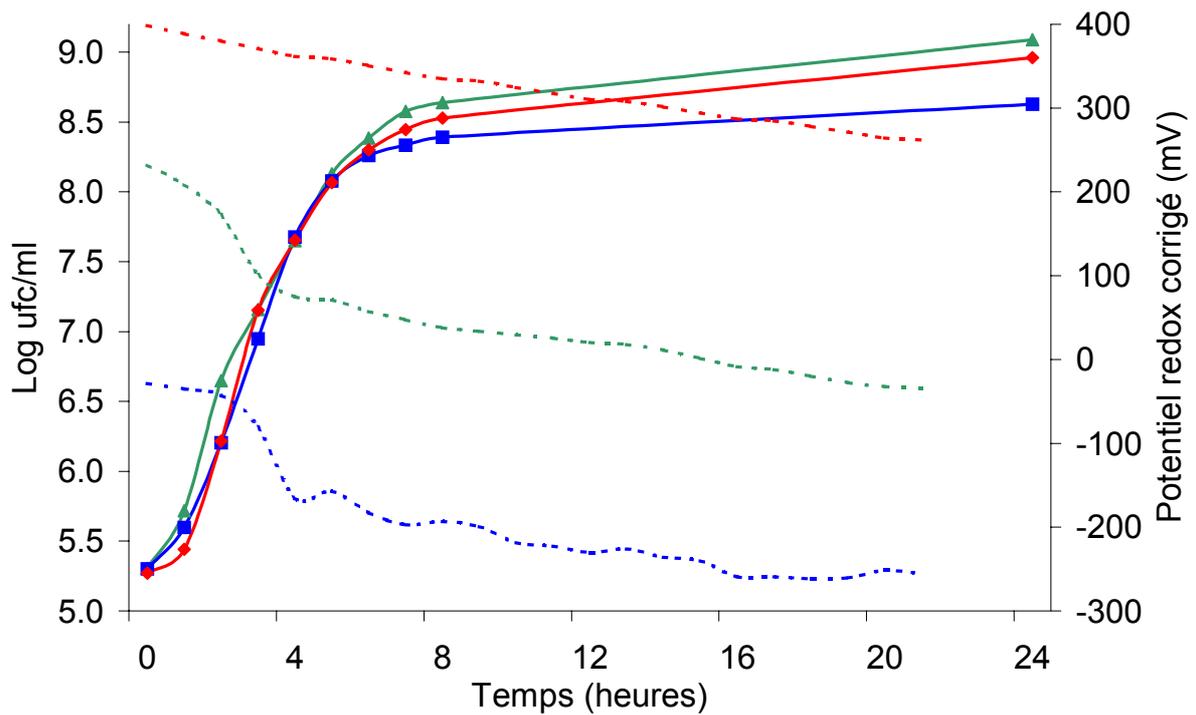


Figure 44 : évolution de *S. aureus* (isolat 1A) et du potentiel redox dans le lait durant une période de 24 h à 37°C. Courbes moyennes des trois essais. Oxydé (—◆—) ; réduit (—■—) ; témoin (—▲—).
Potentiel redox milieu : oxydé (---) réduit (---) et témoin (---).

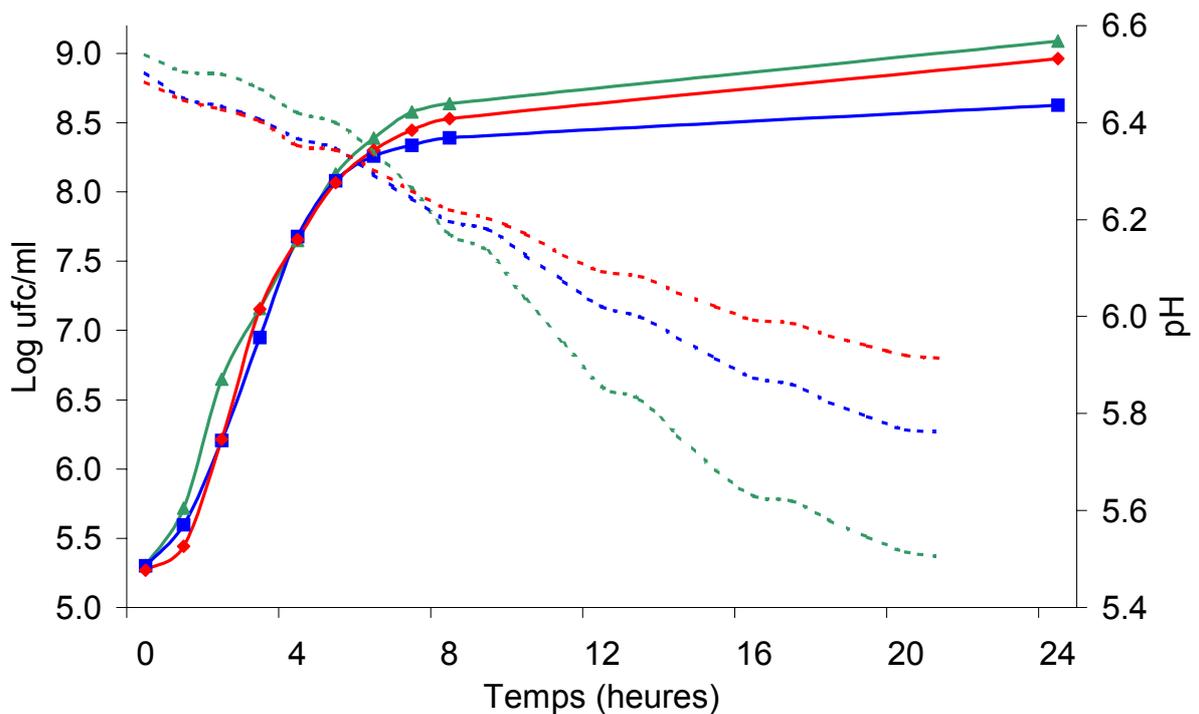


Figure 45 : évolution de *S. aureus* (isolat 1A) par rapport à la cinétique d'acidification au cours de 24 h d'incubation à 37°C dans le lait. Courbes moyennes des trois essais. Oxydé (—◆—) ; réduit (—■—) ; témoin (—▲—). pH milieux oxydé (---) réduit (---) et témoin (---).

LE POTENTIEL REDOX INITIAL MOYEN ETAIT DE +400 mV APRES AJOUT DE L'OXYDANT, DE -30 mV APRES AJOUT DU REDUCTEUR ET DE +230 mV DANS LE TEMOIN.

DANS LE MILIEU LAIT TEMOIN, LE POTENTIEL REDOX A BAISSÉ FORTEMENT DES LE DÉBUT DE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET CE, JUSQU'À 5 HEURES D'INCUBATION. PUIS, LE POTENTIEL REDOX A DIMINUÉ RÉGULIÈREMENT POUR ATTEINDRE UNE VALEUR MOYENNE DE -40 mV. LA CINÉTIQUE EST SIMILAIRE AU DÉPART À CELLE OBSERVÉE DANS LE BHI EN PARTANT D'UNE MÊME VALEUR DE POTENTIEL REDOX INITIAL, MAIS L'ISOLAT N'A PAS PU RÉDUIRE LE LAIT AUTANT QUE LE BHI.

DANS LE MILIEU LAIT OXYDE, LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* A ENTRAÎNÉ UNE BAISSÉ FAIBLE MAIS RÉGULIÈRE DU POTENTIEL REDOX D'ENVIRON 150 mV POUR ARRIVER À UNE VALEUR FINALE DE 260 mV EN MOYENNE. L'ISOLAT AVAIT PLUS DE FACILITÉ À RÉDUIRE LE MILIEU BHI OXYDE QUE LE LAIT OXYDE.

DANS LE MILIEU LAIT RÉDUIT, LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* OCCASIONNAIT UNE CINÉTIQUE DE BAISSÉ DU REDOX SIMILAIRE À CELLE OBSERVÉE DANS LE MILIEU LAIT TEMOIN POUR ATTEINDRE UNE VALEUR MOYENNE DE -260 mV. LE POTENTIEL REDOX DU LAIT RÉDUIT ÉTANT PLUS ÉLEVÉ QUE CELUI DU BHI, L'ISOLAT A RÉDUIT LE LAIT RAPIDEMENT JUSQU'À LA VALEUR DE -150 mV (VALEUR ENCORE SUPÉRIEURE À LA VALEUR FINALE DU BHI RÉDUIT).

GLOBALEMENT, LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* A ENTRAÎNÉ UNE BAISSÉ DE REDOX PLUS IMPORTANTE (-200 mV) DANS LES MILIEUX TEMOIN ET RÉDUIT QUE DANS LE MILIEU OXYDE (-150 mV).

AVEC LES TROIS CONDITIONS REDOX, LE pH INITIAL DU LAIT ÉTAIT EN MOYENNE DE pH 6,50. QUEL QUE SOIT LE POTENTIEL REDOX INITIAL, LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* A ENTRAÎNÉ UNE BAISSÉ DE pH DE 0,3 UNITÉS, ET CE JUSQU'À 6 HEURES D'INCUBATION.

À PARTIR DE 6 HEURES D'INCUBATION, CORRESPONDANT À LA FIN DE LA PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE, L'ACIDIFICATION DU LAIT SE POURSUIVAIT AVEC, CEPENDANT, UNE PENTE PLUS IMPORTANTE DANS LE LAIT TEMOIN PAR RAPPORT À CELLE OBSERVÉE DANS LE LAIT RÉDUIT, CETTE DERNIÈRE ÉTANT PLUS FORTE QUE CELLE OBSERVÉE DANS LE LAIT OXYDE. LES pH FINAUX ÉTAIENT DE 5,90, 5,74 ET 5,48 RESPECTIVEMENT POUR LE LAIT OXYDE, RÉDUIT INITIALEMENT ET TEMOIN.

DANS LE LAIT, LA FORTE BAISSÉ DU pH OBSERVÉE DANS LE BHI N'A PAS EU LIEU. LE LAIT EST UN MILIEU BEAUCOUP PLUS COMPLEXE AVEC DE NOMBREUX COUPLES OXYDO-REDUCTEURS ET ACIDE-BASE POUVANT AVOIR UN EFFET TAMPON SUR LE REDOX ET LE pH.

LES ISOLATS DE *S. AUREUS* ÉTUDIÉS ONT TENDANCE À AVOIR UN COMPORTEMENT SIMILAIRE À CELUI QU'ONT LES LACTOCOQUES DANS LE LAIT (CACHON *ET AL.*, 2002). EN EFFET, SUR LE BHI, L'ISOLAT A A NETTEMENT ACCÉLÉRÉ L'ACIDIFICATION DU MILIEU APRES AVOIR TERMINÉ LA MAJEURE PARTIE DE LA RÉDUCTION DES MILIEUX TEMOIN ET OXYDE. ÉTANT DONNÉ L'HOMOLOGIE GÉNÉTIQUE DES LACTOCOQUES ET *S. AUREUS* (KURODA *ET AL.*, 2001), ON PEUT SE DEMANDER SI ILS N'AURAIENT PAS DES SIMILITUDES DANS LA RÉGULATION DE CERTAINES DE LEURS ACTIVITÉS ENZYMATIQUES. BIEN SUR, CES RÉSULTATS DEMANDENT À ÊTRE RÉPÉTÉS UN GRAND NOMBRE DE FOIS AVANT DE GÉNÉRALISER CES CONCLUSIONS ET AFIN D'APPROFONDIR CES HYPOTHÈSES.

4.4 Production d'entérotoxines

LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES SELON LES CONDITIONS DE REDOX INITIAL A ETE EVALUEE, DANS LE BHI ET DANS LE LAIT, AVEC LE KIT TRANSIA. IL EST IMPORTANT DE NOTER QUE LES RESULTATS OBTENUS AVEC LE KIT TRANSIA SONT UNIQUEMENT SEMI-QUANTITATIFS, POUR DONNER UNE IDEE DE LA QUANTITE D'ENTEROTOXINES PRODUITES. LES RESULTATS SONT LES MOYENNES DES TROIS ESSAIS POUR CHACUNE DES 2 CONDITIONS ET SEULEMENT DEUX ESSAIS AVEC LES TEMOINS.

DANS LE BHI, L'ISOLAT 1A (PRODUCTEUR DE SEA *IN VITRO*), DANS LES CONDITIONS REDUITES, A PRODUIT UNE TRES FORTE QUANTITE D'ENTEROTOXINES ENTRE 8 ET 24 H DE CROISSANCE. CET ISOLAT AVAIT PRODUIT PLUS D'ENTEROTOXINES DANS LE MILIEU OXYDE QUE DANS LE MILIEU REDUIT. PAR CONTRE, AUCUNE ENTEROTOXINE N'A ETE DETECTEE DANS LE MILIEU TEMOIN.

DANS LE LAIT, LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES ETAIT TRES PRECOCE, DES 2 H DE CROISSANCE. APRES 4 H, UNE FORTE QUANTITE D'ENTEROTOXINES A ETE DETECTEE DANS LE TEMOIN ET LE LAIT OXYDE, TANDIS QU'UNE QUANTITE PLUS FAIBLE A ETE DETECTEE DANS LE LAIT REDUIT. APRES 8 H, DES FORTES QUANTITES D'ENTEROTOXINES ONT ETE DETECTEES DANS LES TROIS CONDITIONS. LA PRODUCTION DE SEA SEMBLE RETARDEE DANS LE MILIEU LAIT REDUIT INITIALEMENT. LA MEME TENDANCE A ETE OBSERVEE POUR LA PRODUCTION DE SEC DANS LE BHI.

UNE ETUDE SUR *E. COLI* (RIONDET *ET AL.*, 1999) A MONTRE QUE LA FORCE PROTOMOTRICE ETAIT DEPENDANTE DE LA VALEUR DU POTENTIEL REDOX. DANS DES CONDITIONS REDUCTRICES, ET PLUS PARTICULIEREMENT DANS DES CONDITIONS ACIDES, UNE REDUCTION DE LA FORCE PROTOMOTRICE EST MISE EN EVIDENCE. DES ETUDES ONT EGALEMENT ETE EFFECTUEES SUR L'EXCRETION DE SEA ET SEB (TWETEN ET IANDOLO, 1983 ; CHRISTIANSON *ET AL.*, 1985). LE PRECURSEUR DE SEB A BESOIN DE METHIONINE POUR PRODUIRE UNE SEB MATURE. CETTE UTILISATION DE METHIONINE EST INHIBEE PAR UNE FORCE PROTOMOTRICE DIMINUEE. CERTAINES MOLECULES PEUVENT ARRETER LE PROCESSUS DE PRODUCTION DE SEA MATURE, PROVOQUANT ALORS UNE ACCUMULATION DU PRECURSEUR DE SEA, COMME POUR SEB (TWETEN ET IANDOLO, 1983). TOUS CES ELEMENTS MONTRENT QU'UN MILIEU REDUIT PEUT AFFECTER LE NIVEAU D'EXCRETION DES ENTEROTOXINES DU A UN ENSEMBLE DE FACTEURS AFFECTES PAR LE POTENTIEL REDOX.

DANS LES FROMAGES, DES VALEURS FORTEMENT REDUCTRICES PEUVENT ETRE RENCONTREES. CES VALEURS SONT VARIABLES EN FONCTION DES VARIETES DE FROMAGE (AUBERT *ET AL.*, 2002). ON PEUT IMAGINER ALORS QUE LES CONDITIONS REDUCTRICES DU FROMAGE POURRAIENT EN PARTIE ETRE RESPONSABLES DE LA TRES FAIBLE IMPLICATION DE SOUCHES DE *S. AUREUS*, PLUS PARTICULIEREMENT CELLES PRODUCTRICES DE SEC, DANS DES TIAC IMPLIQUANT DES FROMAGES (EVENSON *ET AL.*, 1988 ; WIENEKE *ET AL.*, 1993 ; MEYRAND *ET AL.*, 1998 ; LAPEYRE, 1999 ; MEYRAND ET VERNZOY-ROZAND, 1999). IL EST A NOTER EGALEMENT QU'AUCUNE PRODUCTION DE SEC N'A ETE MISE EN EVIDENCE DANS LE FROMAGE MODELE, MEME AVEC DES NIVEAUX ELEVES DE *S. AUREUS* DE L'ORDRE DE 10^7 UFC/G - 10^8 UFC/G DE FROMAGE.

EN CONCLUSION, CE TRAVAIL EXPLORATOIRE EST TRES ORIGINAL DANS SON APPROCHE SCIENTIFIQUE, IL A MONTRE L'IMPORTANCE D'APPROFONDIR L'EFFET DU POTENTIEL REDOX SUR LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES PAR *S. AUREUS*. DES TRAVAUX COMPLEMENTAIRES RESTENT A REALISER POUR CONFIRMER ET AFFINER CES RESULTATS, TELS QU'UN SUIVI DE LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET DE LA PRODUCTION DE SEC DANS LE LAIT EN FONCTION DU REDOX INITIAL, MAIS EGALEMENT AVEC D'AUTRES SOUCHES DE *S. AUREUS* PRODUCTRICES DE SEA ET DE SEC.

Conclusion Générale et Perspectives

Conclusion Générale

L'OBJECTIF PRINCIPAL DE CE TRAVAIL DE THESE ETAIT D'EVALUER L'APTITUDE D'ISOLATS DE *S. AUREUS* A PRODUIRE DES ENTEROTOXINES DANS DES CONDITIONS CONTROLEES DE FABRICATION FROMAGERE EN FONCTION DE LEUR DIVERSITE PHENOTYPIQUE ET GENETIQUE.

POUR MENER A BIEN CE TRAVAIL, IL NOUS A SEMBLE IMPORTANT DANS UN PREMIER TEMPS, DE COLLECTER DES ISOLATS ISSUS DE LAITS ET DE FROMAGES AU LAIT CRU A PATE PRESSEE NON CUITE (FROMAGES LES PLUS SENSIBLES AU « RISQUE *S. AUREUS* ») DE DEUX REGIONS DE FRANCE (RHONE-ALPES ET MASSIF CENTRAL), ET NON DE TRAVAILLER UNIQUEMENT AVEC DES SOUCHES DE COLLECTION, PAS NECESSAIREMENT REPRESENTATIVES DES PRODUITS LAITIERS EN GENERAL ET DES FROMAGES AU LAIT CRU PLUS SPECIFIQUEMENT. CETTE PREMIERE ETAPE NOUS A PERMIS EGALEMENT D'AVOIR **UNE IMAGE ACTUALISEE** DES ISOLATS DE *S. AUREUS* PRESENTS DANS CE TYPE DE FABRICATIONS. AINSI, 1036 ISOLATS DE STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE ONT ETE COLLECTES AU COURS DE CETTE ETUDE : 82,2% APPARTENAIENT A L'ESPECE *S. AUREUS*, 13,3% A L'ESPECE *S. INTERMEDIUS* ET 4,5% ETAIENT DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE. **LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE RETROUVES APPARTENAIENT DONC MAJORITAIREMENT A L'ESPECE *S. AUREUS*, ET DANS UNE MOINDRE MESURE, EGALEMENT A L'ESPECE *S. INTERMEDIUS*.**

AFIN DE PERMETTRE UN CHOIX RAISONNE DES ISOLATS DE *S. AUREUS* A TESTER EN FABRICATION FROMAGERE CONTROLEE, NOUS AVONS ENGAGE DANS UN DEUXIEME TEMPS, UN ENSEMBLE DE TECHNIQUES PHENOTYPIQUES ET GENETIQUES PERMETTANT DE CARACTERISER LA DIVERSITE RENCONTREE DANS CES ISOLATS. AINSI, LE BIOTYPE LE PLUS REPANDU DANS NOTRE COLLECTION ET EGALEMENT LE PLUS SOUVENT RETROUVE DANS LE LAIT CRU DE VACHE, ETAIT LE BIOTYPE C BOVIN. LE BIOTYPE INCONNU, TRES PROCHE DU BIOTYPE C BOVIN, ETAIT AUSSI TRES REPANDU. **DE PLUS, IL EST IMPORTANT DE NOTER QUE LE BIOTYPE A HUMAIN ETAIT FAIBLEMENT RENCONTRE, IL REPRESENTAIT MOINS DE 3% DES ISOLATS.** CE RESULTAT DENOTE DE BONNES PRATIQUES D'HYGIENES RENCONTREES CHEZ LES PRODUCTEURS DONT LES FROMAGES AU LAIT CRU ONT ETE ANALYSES AU COURS DE CETTE ETUDE.

PUIS, 821 ISOLATS DE *S. AUREUS* DE LA COLLECTION AQS-SA ONT ETE ANALYSES POUR LEUR PRODUCTION DE SEA A SEE *IN VITRO*. **SEULEMENT 6% DES 821 ISOLATS TESTES ETAIENT PRODUCTEURS *IN VITRO* ;** CE CHIFFRE EST REDUIT A **4,9%** SI ON NE PREND EN COMPTE QUE LES ISOLATS PRODUCTEURS DE SEA OU SED, ENTEROTOXINES LE PLUS SOUVENT IMPLIQUEES DANS LES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES COLLECTIVES. EN GENERAL, LES BIOTYPES A HUMAIN ET D LIEVRE ETAIENT LE PLUS ENTEROTOXINOGENES ET CEUX DE BIOTYPES C BOVIN LE MOINS ENTEROTOXINOGENES. NOS RESULTATS ONT CONFIRME QU'UN TRES FAIBLE POURCENTAGE DES ISOLATS RENCONTRES DANS LE LAIT ET LES FROMAGES AU LAIT CRU EST ENTEROTOXINOGENE. NEANMOINS, SUITE A LA RECHERCHE DES GENES CODANT POUR DE « NOUVELLES » ENTEROTOXINES (G A J) D'UNE PARTIE REDUITE DE NOTRE COLLECTION (90 ISOLATS PRODUCTEURS DE A A E *IN VITRO* ET 90 NON PRODUCTEURS), LES ISOLATS DE *S. AUREUS* ONT UN POUVOIR POTENTIELLEMENT ENTEROTOXINOGENE PLUS IMPORTANT, CONFIRMANT LES RESULTATS OBTENUS PAR ROSEC ET GIGAUD (2002). EN EFFET, UN TOTAL DE 92% (166/180) ONT LE POTENTIEL DE PRODUIRE DES ENTEROTOXINES.

L'ANALYSE DE CETTE MEME SELECTION DE 180 ISOLATS DE LA COLLECTION AQS-SA PAR ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE, A MIS EN AVANT **LES RELATIONS GENETIQUES TRES PROCHES DES ISOLATS PRODUCTEURS DE SED *IN VITRO*,** COLLECTES DE FROMAGES PROVENANT DES DEUX REGIONS, ET LA DIVERSITE DES AUTRES ISOLATS, PRODUCTEURS ET NON PRODUCTEURS, QUI SE TROUVAIENT DANS DES PULSOTYPES VARIES (CORRESPONDANT

A DES EMPREINTES GENETIQUES DIFFERENTES). LA REP-PCR, UTILISEE AFIN D’AFFINER LA CARACTERISATION DES ISOLATS PRODUCTEURS DE SED, A MIS EN EVIDENCE LA PRESENCE D’AU MOINS TROIS SOUCHES, FORTEMENT LIEES GENETIQUEMENT.

LA SPECTROSCOPIE IRTF S’EST AVEREE ETRE, COMME DEJA DEMONTE AVEC D’AUTRES ESPECES BACTERIENNES (BEATTIE ET AL., 1998 ; KÜMMERLE ET AL., 1998 ; LEFIER ET AL., 2000), UNE METHODE INTERESSANTE POUR LA DISCRIMINATION ET L’IDENTIFICATION DE S. AUREUS, PARTICULIEREMENT POUR LES ISOLATS COLLECTES DE PRODUITS LAITIERS. DE PLUS, CETTE TECHNIQUE A EGALEMENT MONTRE QUE L’INFORMATION SPECTRALE PERMET UNE CARACTERISATION DES ISOLATS PRODUCTEURS DE SED IN VITRO. NEANMOINS, L’INFORMATION SPECTRALE N’A PAS PERMIS DE DISCRIMINER LES ISOLATS « POTENTIELLEMENT » PRODUCTEURS D’ENTEROTOXINES, DES ISOLATS NON PRODUCTEURS.

A L’ISSUE DE CETTE CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET GENETIQUE, UNE SELECTION D’ISOLATS A ETE RETENUE AFIN D’EVALUER LEUR APTITUDE A SE DEVELOPPER ET A PRODUIRE DES ENTEROTOXINES DANS UN FROMAGE MODELE A PATE PRESSEE NON CUITE, COMPORTANT UN DELACTOSAGE. L’OBJECTIF DE CETTE PARTIE DU TRAVAIL ETAIT DE SELECTIONNER TROIS ISOLATS PRODUCTEURS D’ENTEROTOXINES EN CONDITION FROMAGERE AFIN D’ETRE EVALUES *IN FINE* DANS DES FABRICATIONS SIMULANT TROIS TECHNOLOGIES TRADITIONNELLES. LES CRITERES RETENUS POUR LA SELECTION DES ISOLATS ETAIENT : LA NATURE DE L’ENTEROTOXINE PRODUITE *IN VITRO*, LE PULSOTYPE, LE BIOTYPE ET LA SOURCE D’ISOLEMENT.

LE FAIT QUE LES ISOLATS AIENT ETE COLLECTES DE LAITS ET DE FROMAGES N’IMPLIQUE PAS NECESSAIREMENT UNE CAPACITE A PROLIFERER DANS LE FROMAGE. C’EST POURQUOI, NOUS AVONS EVALUE LA CAPACITE DE 29 ISOLATS, POUR N’EN RETENIR QUE 23, A SE DEVELOPPER DANS DU LAIT. NOUS AVONS PU AINSI METTRE EN EVIDENCE **DES DIFFERENCES DE CROISSANCE DANS LE LAIT ENTRE ISOLATS DE S. AUREUS EN FONCTION DU BIOTYPE ET DU TYPE D’ENTEROTOXINE PRODUITE IN VITRO**, RESULTAT QUI, A NOTRE CONNAISSANCE, N’AVAIT JAMAIS ETE OBSERVE AUPARAVANT.

AFIN DE FAVORISER LA PRODUCTION D’ENTEROTOXINES DANS LE FROMAGE, LES 23 ISOLATS ONT ETE ENSEMENCES A UN NIVEAU AVOISINANT 10^5 UFC/ML DE LAIT, POUR ATTEINDRE DES POPULATIONS MAXIMUMS COMPRISES ENTRE 10^7 ET 10^8 UFC/G EN DEBUT D’AFFINAGE. L’ETUDE SUR FROMAGE MODELE A PERMIS DE METTRE EN EVIDENCE **UN POINT CLE : STADE MOULAGE + 3 HEURES (ENVIRON 5 HEURES APRES INOCULATION DE S. AUREUS) OU LE PH INFLUENÇAIT LA CROISSANCE GLOBALE DE S. AUREUS**. UN PH PLUS ELEVE A CE STADE ETAIT GENERALEMENT LIE A UNE POPULATION DE S. AUREUS PLUS ELEVEE. LES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DU CAILLE/FROMAGE NE SEMBLANT PAS ETRE LES SEULS FACTEURS INFLUENÇANT LA CROISSANCE DE S. AUREUS CAR NOS RESULTATS ONT EGALEMENT MIS EN EVIDENCE UN EFFET LIE AU BIOTYPE DE S. AUREUS SUR LA CINETIQUE DE CROISSANCE. UN DES RESULTATS MARQUANTS OBTENUS AU COURS DE CE TRAVAIL EST QUE **SEULES SEA ET SED ONT ETE PRODUITES A DES NIVEAUX DETECTABLES DANS LE FROMAGE MODELE DE TYPE PATE PRESSEE NON CUITE**. AUCUNE PRODUCTION DE SEB OU DE SEC N’A ETE DETECTEE AVEC LES METHODES D’EXTRACTION ET DE DETECTION UTILISEES AU LABORATOIRE, MEME AVEC DES POPULATIONS DE S. AUREUS ATTEIGNANT $10^7 - 10^8$ UFC/G EN DEBUT D’AFFINAGE. PAR CONSEQUENT, NOUS POUVONS ESTIMER QUE LES SOUCHES DE S. AUREUS POTENTIELLEMENT PRODUCTRICES DE SEA ET/OU SED REPRESENTENT UN RISQUE HYGIENIQUE PLUS IMPORTANT POUR DES FROMAGES A PATE PRESSEE NON CUITE QUE LES SOUCHES POTENTIELLEMENT PRODUCTRICES DE SEB OU SEC. PAR AILLEURS, CETTE ETAPE DU TRAVAIL NOUS A PERMIS DE METTRE AU POINT **UN MODELE FROMAGE A PATE PRESSEE NON CUITE** POUVANT ETRE UTILISE POUR TESTER LA PRODUCTION D’ENTEROTOXINES PAR D’AUTRES SOUCHES DE S. AUREUS, VOIRE D’AUTRES

ESPECES DE STAPHYLOCOQUES, TELLES QUE L'ESPECE *S. INTERMEDIUS* RENCONTREE DANS LE LAIT ET LE FROMAGE ET QUI EST POTENTIELLEMENT PRODUCTRICE D'ENTEROTOXINES.

LES FABRICATIONS EXPERIMENTALES SIMULANT TROIS FABRICATIONS TRADITIONNELLES, CANTAL, TOMME DE SAVOIE ET REBLOCHON, NOUS ONT PERMIS D'APPRECIER LE COMPORTEMENT DE TROIS ISOLATS DE *S. AUREUS* PARMIS LES 17 PRODUCTEURS DE A, D OU A ET D DANS DES TECHNOLOGIES AYANT, EN AUTRES, DES CINETIQUES D'ACIDIFICATION DIFFERENTES JUSQU'AU LENDEMAIN DE LA FABRICATION (J+1). LES ISOLATS AVAIENT ETE ENSEMENCES A DEUX NIVEAUX : ≈ 100 UFC/ML (NIVEAU BAS) ET 1500-2000 UFC/ML (NIVEAU HAUT), POUVANT ETRE RETROUVES DANS LE LAIT CRU DESTINE A LA FABRICATION DES FROMAGES. LE PLAN EXPERIMENTAL COMPORTANT DEUX SITES DE FABRICATION, DONC ENTRE AUTRES, DEUX ORIGINES DE LAIT DIFFERENTES, NE NOUS PERMET DE CONCLURE DE MANIERE SATISFAISANTE SUR LES NIVEAUX ATTEINTS PAR *S. AUREUS* DANS TELLE OU TELLE TECHNOLOGIE. EN REVANCHE, NOUS AVONS PU CONSTATER **UN EFFET LIE A L'INDIVIDU (ISOLAT) EN FONCTION DES TECHNOLOGIES**. AINSI, L'ISOLAT PRODUCTEUR DE SEA ET SED (ISOLAT A) S'EST MIEUX DEVELOPPE DANS LE FROMAGE EXPERIMENTAL TYPE CANTAL ALORS QUE L'ISOLAT PRODUCTEUR DE SED (ISOLAT C) S'EST MIEUX DEVELOPPE DANS LE FROMAGES EXPERIMENTAUX TYPES TOMME DE SAVOIE ET REBLOCHON, L'ISOLAT PRODUCTEUR DE SEA (ISOLAT B) AYANT UN COMPORTEMENT INTERMEDIAIRE. PAR AILLEURS, COMME DANS LE FROMAGE MODELE, L'INFLUENCE DU PH SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* A ETE MISE EN EVIDENCE. DANS LE FROMAGE MODELE TOMME DE SAVOIE, LE POINT CLE SE SITUAIT AU STADE MOULAGE + 4 HEURES ALORS QU'IL NE SE TROUVAIT QU'A J+1 DANS LE FROMAGE MODELE REBLOCHON. AINSI, PLUS LE PH EST ELEVE A CE POINT CLE, PLUS LA POPULATION DE *S. AUREUS* EST IMPORTANTE. CET EFFET TARDIF DU PH DANS LE FROMAGE EXPERIMENTAL TYPE REBLOCHON, LIE A UNE CINETIQUE D'ACIDIFICATION LENTE, PEUT ETRE UNE CAUSE DE LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DETECTEE EN DEBUT D'AFFINAGE A DES NIVEAUX FAIBLES (TRACES DE SEA ET 0,2 NG/G DE SED); AUCUNE PRODUCTION D'ENTEROTOXINE N'AYANT ETE DETECTEE DANS LES DEUX AUTRES FROMAGES EXPERIMENTAUX. LES POPULATIONS DE *S. AUREUS* SE TROUVAIENT DANS LES FROMAGES INCRIMINES EN MOYENNE A UN NIVEAU DE $2 \cdot 10^4$ UFC/G. A LA LUMIERE DE CES RESULTATS, NOUS POUVONS ESTIMER QUE LE MODELE REBLOCHON AVEC UNE ACIDIFICATION LENTE PEUT PRESENTER UN RISQUE « ENTEROTOXINE DE *S. AUREUS* » DANS LA MESURE OU DES SOUCHES DE *S. AUREUS* POTENTIELLEMENT PRODUCTRICES DE SEA E/OU SED SONT PRESENTES DANS LE LAIT DE FABRICATION, EVENEMENT QUI, COMME NOUS L'AVONS VU PRECEDEMMENT, EST MALGRE TOUT RELATIVEMENT RARE.

ENFIN, LE TRAVAIL EXPLORATOIRE SUR LE POTENTIEL D'OXYDO-REDUCTION A MIS EN EVIDENCE LA POSSIBILITE QUE DIFFERENTES CONDITIONS REDOX PEUVENT INTERVENIR SUR LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*.

POUR CONCLURE, CE TRAVAIL A APPORTE UNE IMAGE ACTUALISEE DE LA DIVERSITE DE *S. AUREUS* ISOLE DE LAIT CRU ET DE FROMAGES AU LAIT CRU PRINCIPALEMENT. IL A MIS EN AVANT L'EFFET DE L'INDIVIDU (ISOLAT/SOUCHE DE *S. AUREUS*), DE LA NATURE DE L'ENTEROTOXINE ET DE LA TECHNOLOGIE, EN PARTICULIER DU PH, SUR LA CROISSANCE ET L'ENTEROTOXINOGENESE DE *S. AUREUS*. ENFIN CE TRAVAIL A SOULIGNE LE RISQUE TRES FAIBLE DE PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DANS LES FROMAGES A PATE PRESSEE NON CUITE.

Perspectives

Suite à ce travail de thèse, des travaux complémentaires seraient à réaliser afin d'approfondir nos connaissances concernant l'influence de facteurs technologiques sur la croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxines. L'effet pH sur la croissance et la production d'entérotoxines reste à « creuser », en incluant différents niveaux d'ensemencements en *S. aureus*. Ce travail pourrait être réalisé à l'aide du fromage modèle à pâte pressée non cuite développé au cours de cette étude. Par ailleurs, ce même modèle pourrait d'abord servir à étudier la relation « niveaux de population en *S. aureus* et production d'entérotoxines » en incluant notamment les isolats producteurs de SEA et/ou SED.

LES RESULTATS OBTENUS AVEC L'ETUDE DU POTENTIEL D'OXYDOREDUCTION NOUS SEMBLANT PROMETTEURS ET NOUS SEMBLANT ETRE UNE PISTE DE RECHERCHE A APPROFONDIR. DE PLUS, LES LEVAINS LACTIQUES AYANT UN IMPACT SUR LE POTENTIEL REDOX DU LAIT (CACHON *ET AL.*, 2002), IL NOUS PARAIT ALORS ABORDABLE D'INCLURE CE PARAMETRE ENVIRONNEMENTAL EN TECHNOLOGIE FROMAGERE.

LES RESULTATS CONCERNANT LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES ONT ETE OBTENUS A PARTIR DE FROMAGES EXPERIMENTAUX FABRIQUES A PARTIR DE LAIT MICROFILTRÉ ADDITIONNE DE CREME PASTEURISEE POUR S'AFFRANCHIR DE LA MICROFLORE INITIALE DU LAIT. POUR TENIR COMPTE DE LA COMPLEXITE DU LAIT, IL NOUS SEMBLE EGALEMENT NECESSAIRE D'ETUDIER L'ENTEROTOXINOGENESE DE *S. AUREUS* EN INCLUANT L'EFFET DE LA « MATRICE LAIT CRU », MATRICE RECOUVRANT PLUSIEURS ASPECTS NOTAMMENT LA MICROFLORE NATURELLE DU LAIT SUSCEPTIBLE D'INTERAGIR AVEC DES MICROFLORES PATHOGENES TELLES QUE *S. AUREUS* (MONTEL, 2002), ET EGALEMENT DES AGENTS PHYSICO-CHIMIQUES, BIOCHIMIQUES TELS QUE LES MOLECULES A ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DU LAIT.

CEPENDANT, LA REALISATION DE CES TRAVAUX PASSE PAR LA MISE AU POINT D'OUTILS PERFORMANTS, FAISANT APPEL NOTAMMENT A L'IMMUNOCHEMIE, POUR QUANTIFIER LES ENTEROTOXINES ; L'UTILISATION SEULE DES KITS COMMERCIAUX ACTUELS NOUS SEMBLE LIMITANTE. PAR AILLEURS, IL EXISTE A CE JOUR 19 ENTEROTOXINES, AINSI QUE DES VARIANTS GENETIQUES, MAIS LE DANGER REEL EN TERME DE SANTE PUBLIQUE PAR LEUR PRODUCTION DANS LE FROMAGE EST MECONNU. POUR REPENDRE A CETTE QUESTION, IL EST INDISPENSABLE DE RENDRE DISPONIBLE DES TESTS DE DETECTION RAPIDE ET EFFICACE DE CES ENTEROTOXINES POUR POUVOIR EVALUER CE DANGER.

AU COURS DE NOTRE ETUDE, LA PFGE A MONTRE UN POUVOIR DISCRIMINANT POUR LES ISOLATS PRODUCTEURS DE SED *IN VITRO*, MAIS CECI SUR UN NOMBRE ASSEZ FAIBLE D'ISOLATS. IL EST PAR CONSEQUENT NECESSAIRE DE CONFIRMER NOS RESULTATS AVEC UN PLUS GRAND NOMBRE D'ISOLATS PRODUCTEURS DE SED, COLLECTES DE DIFFERENTS FROMAGES ET EGALEMENT D'AUTRES SOURCES ALIMENTAIRES ET NON ALIMENTAIRES CAR UNE SPECIFICITE ALIMENTAIRE, VOIRE LAITIERE, N'EST PAS A EXCLURE.

TOUS CES TRAVAUX DEVRAIENT ETRE UTILES AUX FABRICANTS DE FROMAGES AU LAIT CRU POUR MIEUX GERER LE RISQUE « ENTEROTOXINE DE *S. AUREUS* ».

Valorisation du travail de thèse

Articles

Helen Lamprell, Laurence Villard, Jean-François Chamba, Eric Beuvier, Evelyne Borges, Françoise Maurin, Gérard Mazerolles, Yolande Noël and Angeli Kodjo.
Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened French raw milk cheeses and their ability *in vitro* to produce enterotoxins.

Revue Méd. Vét., 2004, 155, 2, 92-96

Laurence Villard, Helen Lamprell, Evelyne Borges, Françoise Maurin, Yolande Noël, Eric Beuvier, Jean-François Chamba, and Angeli Kodjo.

Enterotoxin D producing strains of *Staphylococcus aureus* are typeable by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).

Accepté pour publication dans "Food Microbiology".

Communications affichées

Helen Lamprell, Gérard Mazerolles et Eric Beuvier.

La spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) appliquée à la détection de bactéries pathogènes : application à *Staphylococcus aureus*.

Présentée au colloque de la Société Française de Microbiologie « Devenir et Pathogénicité des micro-organismes dans les aliments ». 15 – 16 novembre 2001 à l'Institut Pasteur, Paris.

Helen Lamprell, Jean-François Chamba, Angeli Kodjo, Gérard Mazerolles, Yolande Noël et Eric Beuvier.

Conditions de productions des entérotoxines dans les fromages en fonction de la diversité des souches de *Staphylococcus aureus*.

Présentée aux « Rencontres 2003 des Microbiologistes de l'INRA » session « Interactions des Micro-organismes avec leur hôte et / ou le milieu physique. 5, 6 et 7 mai 2003 à Dourdan.

Références Bibliographiques

A

- Aarestrup, F. et N. Jensen** (1997). Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifers during the peripartum period. *J. Dairy Sci.*, **80**, 307-312.
- Adesiyun, A., L. Webb et H. Romain** (1998). Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. *J. Food Prot.*, **61**, (5), 629-632.
- Akineden, O., C. Annemuller, A. Hassan, C. Lammler, W. Wolter et M. Zschock** (2001). Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**, (5), 959-964.
- Allouch, P., G. Sockaligum, P. Pina, E. Bouhedja et M. Manfait** (1998). Utilisation de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en microbiologie. *Bul. Soc. Fr. Microbiol.*, **13**, (1), 18-20.
- Amiel, C., L. Mariey, C. Denis, P. Pichon et T. J** (2001). FTIR spectroscopy and taxonomic purpose: contribution to the classification of lactic acid bacteria. *Lait*, **81**, 249-255.
- Anonyme**. L'électrophorèse en champ pulsé : une technique d'appoint au biotypage automatisé. Centre de typage moléculaire : au service de l'agroalimentaire. <http://www.pasteur-lille.fr/france/techno/ctm/index.html>.
- Anonyme** (1986). Theory of FTIR spectroscopy. *Nicolet analytical instruments*.
- Anonyme** (1995). La microflore de surface de la Tomme de Savoie. ACTIA programme.
- Anonyme** (1997). Outbreak of staphylococcal food poisoning associated with precooked ham-Florida, 1997. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.*, **46**, (50), 1189-1191.
- Anonyme** (1999). Techniques de détection et d'identification des entérotoxines staphylococciques dans les produits laitiers. Note de service, Ministère de l'agriculture et de la pêche : Direction générale de l'alimentation.
- Anonyme** (2000). Snow brand search uncovers suspicious milk bags. Food Safety Net. www.foodsafetynetwork.ca.
- Anonyme** (2001a). Critères microbiologiques applicables aux aliments. Deuxième version. Note de service, Ministère de l'agriculture et de la pêche : Direction générale de l'alimentation.

Anonyme (2001b). WHO Surveillance system programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe - Spain 1993-1998.

Aubert, C., N. Capelle, S. Jeanson, H. Eckert, C. Diviès et R. Cachon (2002). Le potentiel d'oxydoréduction et sa prise en compte dans les procédés d'utilisation des bactéries lactiques. *Sciences des Aliments*, **22**, 177-187.

B

- Bachmann, H. et U. Spahr** (1995). The fate of potentially pathogenic bacteria in Swiss hard and semihard cheeses made from raw milk. *J. Dairy Sci.*, **78**, 476-483.
- Badawi, R. et A. El-Sonbaty** (1997). Viability of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in Zabady made with bifidobacteria. *Egypt. J. Dairy Sci.*, **25**, 217-233.
- Baird-Parker, A.** (1990). The Staphylococci : an introduction. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Supp.*, 1s-8s.
- Balaban, N. et A. Rasooly** (2000). Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.*, **61**, 01-oct.
- Balaban, N. et A. Rasooly** (2001). Analytical chromatography for recovery of small amounts of staphylococcal enterotoxins from food. *Int. J. Food Microbiol.*, **64**, 33-40.
- Bannerman, T. L., G. A. Hancock, F. C. Tenover et J. M. Miller** (1995). Pulsed-Field Gel Electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, (3), 551-555.
- Banwell, C. N. et E. M. McCash** (1994). Fundamentals of molecular spectroscopy. Maidenhead, McGraw-Hill Book Company Europe.
- Bärtschi, C., J. Berthier et G. Valla** (1994). Inventaire et évolution des flores fongiques de surface du Reblochon de Savoie. *Lait*, **74**, 105-114.
- Beattie, S., C. Holt, D. Hirst et A. Williams** (1998). Discrimination among *Bacillus cereus*, *B. mycoïdes* and *B. thuringiensis* and some other species of the genus *Bacillus* by Fourier transform infrared spectroscopy. *FEMS Microbiol. Lett.*, **164**, 201-206.
- Becker, K., B. Keller, C. Von Eiff, M. Bruck, G. Lubritz, J. Etienne et G. Peters** (2001). Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, (12), 5551-5557.

- Becker, K., R. Roth et G. Peters** (1998). Rapid and specific detection of toxinogenic *Staphylococcus aureus*: Use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, (9), 2548-2553.
- Belay, N. et A. Rasooly** (2002). *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production in an anaerobic environment. *J. Food Prot.*, **65**, (1), 199-204.
- Benito, M., M. Rodriguez, M. Cordoba, E. Aranda et J. Cordoba** (2000). Rapid differentiation of *Staphylococcus aureus* from staphylococcal species by arbitrarily primed-polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.*, **31**, 368-373.
- Benkerroum, N., H. Oubel et L. Ben Mimoun** (2002). Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in yogurt fermented with a bacteriocin-producing thermophilic starter. *J. Food Prot.*, **65**, (5), 799-805.
- Berthier, F., E. Beuvier, A. Dasen et R. Grappin** (2001). Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. *Int. Dairy. J.*, **11**, 293-305.
- Bes, M., V. Guèrin-Faublée, H. Meugnier, J. Etienne et J. Freney** (2000). Improvement of the identification of staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods. *Vet. Microbiol.*, **71**, 287-294.
- Bespalov, V., I. Zhulin et B. Taylor** (1996). Behavioral responses of *Escherichia coli* to changes in redox potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10084-10089.
- Betley, M., D. Borst et L. Regasse** (1992). Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and Streptococcal pyrogenic exotoxins : A comparative study of their molecular biology. *Chem. Immunol.*, **55**, 1-35.
- Beuvier, E.** (1990). Influence du traitement thermique du lait en fonction des conditions de stockage et de maturation sur la flaveur d'un fromage à pâte pressée cuite. *Thèse de doctorat de l'Université de Franche-Comté*.
- Beuvier, E., K. Berthaud, S. Cegarra, A. Dasen, S. Pochet, S. Buchin et G. Duboz** (1997). Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. *Int. Dairy. J.*, **7**, 311-323.
- Bhatti, A. et V. Micusan** (1999). Production and characterization of anti-peptide monoclonal antibodies with specificity for staphylococcal enterotoxins A and B. *J. Microbiol. Meth.*, **35**, 143-149.
- Blanc, D., M. Struelens, A. Deplano, R. De Ryck, P. Hauser, C. Petignat et P. Francioli** (2001). Epidemiological validation of pulsed-field gel electrophoresis patterns for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, (10), 3442-3445.
- Bolin, Z., Z. Libudzisz et J. Moneta** (1998). Viability loss of some food-borne pathogens in milk fermented with *Lactobacillus acidophilus*. *Pol. J. Food. Nutr. Sci.*, **748**, (4), 713-722.
- Borel, M. et B. Lynch** (1993). A study of differentiation of living bacteria by ATR/FTIR spectroscopy. *Can. J. Appl. Spectr.*, **38**, (1), 18-21.
- Brett, M.** (1998). Kits for detection of some bacterial food poisoning toxins : problems, pitfalls and benefits. *J. Appl. Microbiol. Symp. Supp.*, **84**, 110s-118s.
- Buchin, S., V. Delague, G. Duboz, J. Berdague, E. Beuvier, S. Pochet et R. Grappin** (1998). Influence of pasteurization and fat composition of milk on the volatile compounds and flavor characteristics of a semi-hard cheese. *J. Dairy Sci.*, **81**, 3097-3108.

C

- Cachon, R., S. Jeanson, M. Aldarf et C. Diviès** (2002). Characterisation of lactic starters based on acidification and reduction activities. *Lait*, **82**, 281-288.
- Capurro, A., C. Concha, L. Nilsson et K. Ostensson** (1999). Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Acta Vet. Scand.*, **40**, 315-321.
- Cardoso, H., N. M. Sena et L. Carmo** (1999). Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.*, **29**, 347-349.
- Cavallin, A., H. Arozenius, K. Kristensson, P. Antonsson, D. Otzen, P. Bjork et G. Forsberg** (2000). The spectral and thermodynamic properties of staphylococcal enterotoxin A, E, and variants suggest that structural modifications are important to control their function. *J. Biol. Chem.*, **275**, (3), 1665-1672.
- Chen, T.-R., M.-H. Hsiao, C.-S. Chiou et H.-Y. Tsen** (2001). Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.*, **71**, 63-70.
- Chiou, C.-S., H.-L. Wei et L.-C. Yang** (2000). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis

and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, (6), 2186-2190.

- Choo-Smith, L.-P., K. Maquelin, T. Van Vreeswijk, H. Bruining, G. Puppels, N. Ngo Thi, C. Kirschner, D. Naumann, D. Ami, A. Villa, F. Orsini, S. Doglia, H. Lamferraj, G. Sockalingum, M. Manfait, P. Allouch et H. Endtz** (2001). Investigating microbial (micro)colony heterogeneity by vibrational spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, (4), 1461-1469.
- Christianson, K., R. Tweten et J. Iandolo** (1985). Transport and processing of staphylococcal enterotoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, (3), 696-697.
- Cowell, N. A., M. T. Hansen, A. J. Langley, T. M. Graham et J. R. Bates** (2002). Outbreak of staphylococcal enterotoxin food poisoning. *Communicable Diseases Intelligence*, **26**, (4), 574-575.
- Curk, M., F. Peladan et J. Hubert** (1994). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.*, **123**, 241-248.

D

- De Boer, M. et A. Chow** (1994). Toxic shock syndrome toxin 1-producing *Staphylococcus aureus* isolates contain the staphylococcal enterotoxin B genetic element but do not express staphylococcal enterotoxin B. *J. Infect. Dis.*, **170**, 818-827.
- De Buyser, M., B. Dufour, M. Maire et V. Lafarge** (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.*, **67**, 1-17.
- De Buyser, M.-L., N. Audinet, M. Delbart, M. Maire et F. Françoise** (1998). Comparison of selective culture media to enumerate coagulase-positive staphylococci in cheeses made from raw milk. *Food Microbiol.*, **15**, 339-346.
- DeBuyser, M., B. Dufour, M. Maire et V. Lafarge** (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food microbiology*, **67**, 1-17.
- Del Vecchio, V. G., J. M. Petroziello, M. J. Gress, F. K. McCleskey, G. P. Melcher, H. K. Crouch et J. R. Lupski** (1995). Molecular genotyping of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, (8), 2141-2144.

- Demarigny, Y., E. Beuvier, A. Dasen et G. Duboz** (1996). Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. I. Evolution of microflora during ripening and characterization of facultatively heterofermentative lactobacilli. *Lait*, **76**, 371-387.
- Dengremont-Titeca, E., J.-P. Vincent et M. Cateau** (1997). Etude de *Staphylococcus aureus* dans les fromages au lait cru. Compte rendu de fin d'étude d'un programme ARILAIT-Recherches, Institut Pasteur de Lille.
- Devriese, L. et P. Oeding** (1976). Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *Res. Vet. Sci.*, **21**, 284-291.
- Diem, M., S. Boydston-White et L. Chiriboga** (1999). Infrared spectroscopy of cells and tissues: shining the light onto a novel subject. *Applied Spectroscopy*, **53**, (4), 148A-161A.
- Dinges, M., P. Orwin et P. Schlievert** (2000). Exotoxines of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**, (1), 16-34.
- Dos Santos, E. C. et C. Genigeorgis** (1981). Potential for presence and growth of *Staphylococcus aureus* in Brazilian Minas cheese whey. *J. Food Prot.*, **44**, (3), 185-188.
- Dos Santos, E. C., C. Genigeorgis et T. B. Farver** (1981). Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of Brazilian Minas cheese. *J. Food Prot.*, **44**, (3), 172-176.

E

- Eck, A. et J. Gillis** (1997). Le Fromage. Paris, *Lavoisier*.
- Egly, J.-M., G. Mengus, G. Monnet et O. Revelent** (1993). Eléctrophorèse en champs (alternés) de l'ADN. *Biofutur - Le Technoscope*. **127**, Cahier no. 61.
- El Dairouty, R.** (1998). Protein A reversed passive latex agglutination for tracing the production of staphylococcal enterotoxins A & B in acidophilus milk. *Egypt. J Dairy Sci*, **26**, 231-240.
- Erkmen, O.** (1995). Behavior of *Staphylococcus aureus* in Turkish Feta cheese during manufacture and ripening. *J. Food Prot.*, **58**, (11), 1201-1205.

Evenson, M., M. Hinds, R. Berstein et M. Bergdoll (1988). Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.*, **7**, 311-316.

F

Farias, M., D. R. H. AAP et F. Sesma (1994). Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: Inhibition of foodborne pathogens. *J. Food Prot.*, **57**, (11), 1013-1015.

Fitzsimons, N., T. Cogan, S. Condon et T. Beresford (2001). Spatial et temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 600-608.

Fontecha, J., C. Pelaez, M. Juarez, T. Requena, C. Gomez et M. Ramos (1990). Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. *J. Dairy Sci.*, **73**, 1150-1157.

Foster, G., G. Ross, R. Hutson et M. Collins (1997). *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, (3), 724-726.

Fox, P., Ed. (1993a). General Aspects. *in* Cheese : chemistry, physics and microbiology. **1**, *Chapman and Hall*.

Fox, P., Ed. (1993b). Major Cheese Groups. *in* Cheese : chemistry, physics and microbiology. **2**, *Chapman and Hall*.

Freed, R., M. Evenson, R. RF et M. Bergdoll (1982). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, (6), 1349-1355.

Freney, J., W. Kloos, V. Hajek et J. Webster (1999). Recommended minimal standards for description of new Staphylococcal species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 489-502.

Freney, J., F. Renaud, W. Hansen et C. Bollet (2000). Identification pratique des staphylocoques. *in* Précis de Bactériologie Clinique. ESKA. Paris, 798-807.

Fueyo, J., M. Martin, M. Gonzalez-Hevia et M. Mendoza (2001). Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.*, **67**, 139-145.

G

Gilligan, K., M. Shipley, B. Stiles, T. Hadfield et M. Ibrahim (2000). Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B genes by PCR-ELISA. *Mol. Cell. Probes*, **14**, 71-78.

Gilmour, A. et J. Harvey (1990). Staphylococci in milk and milk products. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Supp.*, 147s-166s.

Gomez-Lucia, E., J. Goyache, J. Orden, A. Domenech, F. Hernandez, J. Ruiz-Santa Quiteria, B. Lopez, J. Blanco et G. Suarez (1992). Growth of *Staphylococcus aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental Manchego-type cheese. *J. Dairy Sci.*, **75**, 19-26.

Gonzalez-Fandos, E., A. Otero, M. Sierra, M. Garcia-Lopez et M. Prieto (1994). Effect of three commercial starters on growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxins (A-D) and thermonuclease production in broth. *Int. J. Food Microbiol.*, **24**, 321-327.

Gué, M., V. Dupont, A. Dufour et O. Sire (2001). Bacterial swarming: a biochemical time-resolved FTIR-ATR study of *Proteus mirabilis* warm-cell differentiation. *Biochemistry*, **40**, 11938-11945.

H

Haeghebaert, S., F. Le Querrec, P. Bouvet, A. Gallay, A. Espié et V. Vaillant (2002). Les toxoinfections alimentaires collectives en France 2001. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, (50), 2002.

Hajek, V. et J. Balusek (1988). Biochemical properties and differentiation of coagulase-positive staphylococci from rooks and gulls. *Res. Vet. Sci.*, **44**, 242-246.

Hajek, V. et E. Marsalek (1971). The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. *Zentralbl. Bakteriol (originale A)*, **217**, 176-182.

Hamama, A., N. El Hankouri et M. El Ayadi (2002). Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. *Int. Dairy. J.*, **12**, 933-938.

Hatakka, M., K. Björkroth, K. Asplund, N. Mäki-Petäys et H. Korkeala (2000). Genotypes and enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. *J. Food Prot.*, **63**, (11), 1487-1491.

Helm, D., H. Labischinski et D. Naumann (1991a). Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. *J. Microbiol. Meth.*, **14**, 127-142.

Helm, D., H. Labischinski, G. Schallehn et D. Naumann (1991b). Classification and identification of bacteria by Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 69-79.

Helm, D. et D. Naumann (1995). Identification of some bacterial cell components by FTIR spectroscopy. *FEMS Microbiol. Lett.*, **126**, 75-80.

Hennekinne, J.-A., M. Gohier, T. Maire, L. Christiane, B. Lombard et S. Dragacci (2003a). First proficiency testing to evaluate the ability of european union national reference laboratories to detect staphylococcal enterotoxins in milk products. *J. AOAC Int.*, **86**, (2), 332-339.

Hennekinne, J. A., A. Kerouanton, A. Brisabois et M.-L. De Buyser (2003b). Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J. Appl. Microbiol.*, **94**, 321-329.

Hermier, J., J. Lenoir et F. Weber (1992). Les groupes microbiens d'intérêt laitier. Paris, CEPIL.

Hirooka, E., S. De Salzberg et M. Bergdoll (1987). Production of Staphylococcal enterotoxin A and thermonuclease in cream pies. *J. Food Prot.*, **50**, (11), 952-955.

Holeckova, B., E. Holoda, M. Fotta, V. Kalinacova, J. Gondol et J. Grolmus (2002). Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. *Ann. Agri. Environ. Med.*, **9**, 179-182.

Holt, C., D. Hirst, A. Sutherland et F. MacDonald (1995). Discrimination of species in the genus *Listeria* by Fourier transform infrared spectroscopy and canonical variate analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, (1), 377-378.

Horbach, I., D. Naumann et F. Fehrenbach (1988). Simultaneous infections with different serogroups of *Legionella pneumophila* investigated by routine methods and Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, (6), 1106-1110.

Huang, S.-L., Y.-M. Weng et R. Y.-Y. Chiou (2001). Survival of *Staphylococcus aureus* and

Escherichia coli as affected by ethanol and NaCl. *J. Food Prot.*, **64**, (4), 546-550.

I

Ibrahim, G., D. Radford, A. Baldock et L. Ireland (1981). Inhibition of growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin-A production in Cheddar cheese produced with induced starter failure. *J. Food Prot.*, **44**, (3), 189-193.

Igimi, S., E. Takahashi et T. Mitsuoka (1990). *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 409-411.

Isigidi, B., L. Devriese, C. Godard et J. Van Hoof (1990). Characteristics of *Staphylococcus aureus* associated with meat products and meat workers. *Lett. Appl. Microbiol.*, **11**, 145-147.

Isigidi, B., A.-M. Mathieu, L. Devriese, C. Godard et J. Van Hoof (1992). Enterotoxin production in different *Staphylococcus* biotypes isolated from food and meat plants. *J. Appl. Bacteriol.*, **72**, 16-20.

J

Jarraud, S., G. Cozon, F. Vandenesch, M. Bes, J. Etienne et G. Lina (1999). Involvement of enterotoxins G and I in Staphylococcal toxic shock syndrome and Staphylococcal scarlet fever. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, (8), 2446-2449.

Jarraud, S., M. Peyrat, A. Lim, A. Tristan, M. Bes, C. Mougel, J. Etienne, F. Vandenesch, M. Bonneville et G. Lina (2001). *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.*, 669-677.

Jean, M. (1989). *Staphylococcus aureus* dans le "Camembert de Normandie". Origine, comportement et production d'entérotoxines. *Thèse de Doctorat de l'université de Caen*.

Johnson, H., J. Russell et P. CH (1991). Staphylococcal enterotoxin superantigens. *J. Exp. Biol.*, 765-771.

K

Kenny, K., R. Reiser, F. Bastida-Corcuera et N. Norcross (1993). Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, (3), 706-707.

- Kijek, T., C. Rossi, D. Moss, R. Parker et E. Henchal** (2000). Rapid and sensitive immunomagnetic-electrochemiluminescent detection of staphylococcal enterotoxin B. *J. Immunol. Methods*, **236**, sept-17.
- Kirschner, C., K. Maquelin, P. Pina, N. A. Ngo Thi, L.-P. Choo-Smith, G. D. Sockalingum, C. Sandt, D. Ami, F. Orsini, S. M. Doglia, P. Allouch, M. Mainfait, G. J. Puppels et D. Naumann** (2001). Classification and identification of Enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, (5), 1763-1770.
- Kloos, W. et K. H. Schleifer** (1986). Genus IV. *Staphylococcus*. in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. P. H. Sneath. Baltimore, Williams & Wilkins. **2**, 1013-1035.
- Kodjo, A., C. Larcher, L. Villard et Y. Richard** (1999). Typages comparés de *Staphylococcus caprae* par trois techniques moléculaires : amplification de l'espace intergénique 16-23S (ITS), amplification génique aléatoire (RAPD) et électrophorèse en champ pulsé (PFGE). *Rév. Méd. Vét.*, **150**, (1), 27-32.
- Koenig, S. et E. Marth** (1982). Behavior of *Staphylococcus aureus* in Cheddar cheese made with Sodium chloride or a mixture of Sodium chloride and Potassium chloride. *J. Food Prot.*, **45**, (11), 996-1002.
- Kosikowski, F. et V. Mistry** (1997a). Origins and principles. **1**. Westport, *FV Kosikowski LLC*.
- Kosikowski, F. et V. Mistry** (1997b). Procedures and analysis. **2**. Westport, *FV Kosikowski, LLC*.
- Kümmerle, M., S. Scherer et H. Seiler** (1998). Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, (6), 2207-2214.
- Kuroda, Ohta, Uchiyama, Baba, Yuzawa, Kobayashi, Cui, Oguchi, Aoki, Nagai, Lian et Ito.....** (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **357**, 1225-1240.
- L**
- Lapeyre, C.** (1997a). Détection des entérotoxines staphylococciques. *La lettre de Cécalait*, (24), 1-6.
- Lapeyre, C.** (1997b). Détection des entérotoxines staphylococciques. *Revue Laitière Française*, (577), 36-37.
- Lapeyre, C.** (1999). Staphylocoques-Entérotoxines Staphylococciques-Produits laitiers-Risques en pathologie humaine. *6èmes Ren. Rech. Rum.*, **6**, 308-310.
- Lapeyre, C., M. DeSolán et X. Drouet** (1996). Immunoenzymatic detection of Staphylococcal enterotoxins : international interlaboratory study. *J. AOAC Int.*, **79**, (5), 1095-1101.
- Lapeyre, C., T. Maire, S. Messio et S. Dragacci** (2001). Enzyme Immunoassay of Staphylococcal Enterotoxins in Dairy products with cleanup and concentration by Immunoaffinity. *J. AOAC Int.*, **84**, (5), 1587-1592.
- Laporte, E., J. Guiraud et J. Reverbel** (1992). Action antimicrobienne liée à la technologie du fromage de Roquefort : influence de la souche de *Penicillium roqueforti*. *Sciences des Aliments*, **12**, 729-741.
- Larsen, H., A. Huda, N. Eriksen et N. Jensen** (2000). Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. *Vet. Microbiol.*, **76**, 153-162.
- Le Gal, J.-M., M. Manfait et T. Theophanides** (1991). Applications of FTIR spectroscopy in structural studies of cells and bacteria. *J. Mol. Struct.*, **242**, 397-407.
- Lefier, D., D. Hirst, C. Holt et A. Williams** (1997). Effect of sampling procedure and strain variation in *Listeria monocytogenes* on the discrimination of species in the genus *Listeria* by Fourier transform infrared spectroscopy and canonical variates analysis. *FEMS Microbiol. Lett.*, **147**, 45-50.
- Lefier, D., H. Lamprell et G. Mazerolles** (2000). Evolution of *Lactococcus* strains during ripening in Brie cheese using Fourier transform infrared spectroscopy. *Lait*, **80**, 247-254.
- Letertre, C., S. Perelle, F. Dilasser et P. Fach** (2003a). Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.*, **95**, 38-43.
- Letertre, C., S. Perelle, F. Dilasser et P. Fach** (2003b). A strategy based on 5' nuclease multiplex PCR to detect enterotoxin genes *sea* to *sej* of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell. Probes*, **17**, (5), 227-235.
- Lin, S., H. Schraft et M. Griffiths** (1998). Identification of *Bacillus cereus* by Fourier transform infrared spectroscopy (IRTF). *J. Food Prot.*, **61**, (7), 921-923.
- Lindhart, F., W. Ziebhur, P. Meyer, W. Witte et J. Hacker** (1992). Pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments as a tool for

the epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiol. Lett.*, **63**, 275-281.

Lindsay, J. A., A. Ruzin, H. F. Ross, N. Kurepina et R. P. Novick (1998). The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.*, **29**, (2), 527-543.

Lodi, R., P. Malaspina et M. Brasca (1994). I batteri lattici: un parametro di qualità per i formaggi freschi. *L'Industria del latte*, **30**, (4), 3-16.

Luquet, F. (1990). Les produits laitiers 2 : Transformation et technologies. Paris, Lavoisier.

M

Mäntynen, V., S. Niemela, S. Kaijalainen, T. Pirhonen et K. Lindström (1997). MPN-PCR - quantification method for staphylococcal enterotoxin c1 gene from fresh cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, **36**, 135-143.

Maquelin, K., C. Kirschner, L.-P. Choo-Smith, N. Van den Braak, H. Endtz, D. Naumann et G. Puppels (2002). Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J. Microbiol. Meth.*, **51**, 255-271.

Martin, O., T. Li, D. Su, D. Biek et M. Schmid (1999). Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **181**, (12), 3666-3673.

Matsunaga, T., S.-C. Kamata, N. Kakiichi et K. Uchida (1993). Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from Peracute, Acute and Chronic bovine mastitis. *Journal of Veterinary and Medical Science*, **55**, (2), 297-300.

Mclauchlin, J., G. Narayanan, V. Mithani et G. O'Neill (2000). The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J. Food Prot.*, **63**, (4), 479-488.

Mendoza, M., H. Meugnier, M. Bes, J. Etienne et J. Freney (1998). Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 1049-1055.

Meyrand, A., V. Atrache, C. Bavai, M. Montet et C. Vernozy-Rozand (1999a). An automated method for the detection of staphylococcal heat stable deoxyribonuclease in dairy products. *Lett. Appl. Microbiol.*, **29**, 216-220.

Meyrand, A., S. Boutrand-Loei, S. Ray-Gueniot, C. Mazuy, C. Gaspard, G. Jaubert, G. Perrin, C. Lapeyre et C. Vernozy-Rozand (1998). Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. *J. Appl. Microbiol.*, **85**, 537-544.

Meyrand, A. et C. Vernozy-Rozand (1999). Croissance et entérotoxigenèse de *Staphylococcus aureus* dans différents fromages. *Rév. Méd. Vét.*, **150**, (7), 601-616.

Meyrand, A., C. Vernozy-Rozand, C. Gonthier, C. Mazuy, S. Ray-Gueniot, G. Jaubert, G. Perrin, C. Lapeyre et Y. Richard (1999b). Main differences in behavior and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in two different raw milk cheese. *Rév. Méd. Vét.*, **150**, (3), 271-278.

Monday, S. et G. Bohach (1999). Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, (10), 3411-3414.

Montel, M.-C. (2002). Maitrise des écosystèmes microbiens : Un tour d'horizon des études actuelles. *Congrès 26th IDF World Dairy Congress*, Paris, 24-28 septembre.

Moore, P. et J. A. Lindsay (2001). Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, (8), 2760-2767.

Morgan, S., R. Ross, T. Beresford et C. Hill (2000). Combination of hydrostatic pressure and lactacin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 414-420.

Mossel, D. et P. Van Netten (1990). *Staphylococcus aureus* and related staphylococci in foods : ecology, proliferation, toxinogenesis, control and monitoring. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Supp.*, 123s-145s.

Munson, S., M. Tremaine, M. Betley et R. Welch (1998). Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, **66**, (7), 3337-3348.

N

Naumann, D., V. Fijala, H. Labischinski et P. Giesbrecht (1988). The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using Fourier transform infrared spectroscopy and

multivariate analysis. *J. Mol. Struct.*, **174**, 165-170.

Naumann, D., D. Helm, H. Labischinski et P. Giesbrecht (1991). Chapter 3: The characterisation of micro-organisms by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). in *Modern techniques for rapid microbiological analysis*, VCH publishers, 43-96.

Northolt, M. (1984). Growth and inactivation of pathogenic micro-organisms during manufacture and storage of fermented dairy products. A review. *Neth. Milk Dairy J.*, **38**, 135-150.

Nunez, M., L. Bautista, M. Medina et P. Gaya (1988). *Staphylococcus aureus*, thermostable nuclease and staphylococcal enterotoxins in raw ewes' milk Manchego cheese. *J. Appl. Bacteriol.*, **65**, 29-34.

O

Offner, F. (1995). *Staphylococcus aureus* en fabrication de Reblochon : évolution de la contamination - influence des paramètres technologiques et des recontaminations. *Doctorat Vétérinaire*.

Olarte, C., S. Sanz, E. Gonzalez-Fandos et P. Torre (2000). The effect of a commercial starter culture addition on the ripening of an artisanal goat's cheese (Cameros cheese). *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 421-429.

Omoe, K., M. Ishikawa, Y. Shimoda, D.-L. Hu, S. Ueda et K. Shinagawa (2002). Detection of seg, seh and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S.aureus* isolates harboring seg, seh, or sei genes. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, (3), 857-862.

Onoue, Y. et M. Mori (1997). Amino acid requirements for the growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in chemically defined media. *Int. J. Food Microbiol.*, **36**, 77-82.

O'Reilly, C., P. O'Connor, A. Kelly, T. Beresford et P. Murphy (2000). Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, (11), 4890-1896.

Orwin, P., D. Leung, H. Donahue, R. Novick et P. Schlievert (2001). Biochemical and biological properties of Staphylococcal enterotoxin K. *Infect. Immun.*, **69**, (1), 360-366.

Orwin, P. M., D. Y. Leung, T. J. Tripp, G. A. Bohach, C. A. Earhart, D. H. Ohlendorf et P. M. Schlievert (2002). Characterization of a Novel

Staphylococcal Enterotoxin-like Superantigen, a member of the Group V Subfamily of Pyrogenic Toxins. *Biochemistry*, **41**, 14033-14040.

Otero, A., M. Garcia, M. Garcia, J. Santos et B. Moreno (1993). Behaviour of *Staphylococcus aureus* strains FRI 137 and FRI 361 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *Int. Dairy. J.*, **3**, 85-96.

Ouvry, A., Y. Waché, R. Tourdot-Maréchal, C. Diviès et R. Cachon (2002). Effects of oxidoreduction potential combined with acetic acid, NaCl and temperature on the growth, acidification, and membrane properties of *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **214**, 257-261.

P

Palmer, M. (1998). Staphylococcal alpha toxin. *J. Appl. Microbiol. Symp. Supp.*, **85**, 125s-126s.

Papageorgiou, A. et K. Acharya (2000). Microbial superantigens: from structure to function. *Trends Microbiol.*, **8**, (8), 369-375.

Park, C., M. Akhtar et M. Rayman (1994). Evaluation of a commercial enzyme immunoassay kit (RIDASCREEN) for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, (2), 677-681.

Pavia, D., G. Lampan et G. Kriz (1979). Introduction to Spectroscopy. *Saunders college publishing*.

Pazakova, J., P. Turek et A. Laciakova (1997). The survival of *Staphylococcus aureus* during the fermentation and storage of yoghurt. *J. Appl. Microbiol.*, **82**, 659-662.

Pereira, M., L. Do Carmo, E. Dos Santos, J. Pereira et M. Bergdoll (1996). Enterotoxin H in Staphylococcal food poisoning. *J. Food Prot.*, **59**, (5), 559-561.

Piard, J.-C. et M. Desmazeaud (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. I. oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, **71**, 525-541.

Pimbley, D. et P. Patel (1998). A review of analytical methods for detection of bacterial toxins. *J. Appl. Microbiol. Symp. Supp.*, **84**, 98s-109s.

Pinheiro, J. et D. Bates (2000). Mixed-effects models in S and S-plus. New York, *Springer Verlag*.

R

S

- Rasooly, A. et R. Rasooly** (1998). Detection and analysis of Staphylococcal enterotoxin A in food by Western immunoblotting. *Int. J. Food Microbiol.*, **41**, 205-212.
- Rasooly, L., N. Rose, D. Shah et A. Rasooly** (1997). In vitro assay of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A activity in food. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, (6), 2361-2365.
- Riondet, C., R. Cachon, Y. Waché, G. Alcaraz et C. Diviès** (1999). Changes in the proton-motive force in *Escherichia coli* in response to external oxidoreduction potential. *Eur. J. Biochem.*, **262**, 595-599.
- Riondet, C., R. Cachon, Y. Waché, G. Alcaraz et C. Diviès** (2000). Extracellular oxidoreduction potential modifies carbon and electron flow in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **182**, (3), 620-626.
- Roberson, J., L. Fox, D. Hancock et T. Bresser** (1992). Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, (12), 3217-3219.
- Rodrigues, E., J. Arqués, P. Gaya, J. Tomillo, M. Nunez et M. Medina** (2000). Behaviour of *Staphylococcus aureus* in semi-hard cheese made from raw milk with nisin-producing starter cultures. *Milchwissenschaft*, **55**, (11).
- Roitt, I., J. Bostoff et D. Male** (1985). Immunologie fondamentale et appliquée. Paris, *MEDSI*.
- Rosec, J. et O. Gigaud** (2002). Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int. J. Food Microbiol.*, **77**, 61-70.
- Rosec, J., J. Guiraud, C. Dalet et N. Richard** (1997). Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *Int. J. Food Microbiol.*, **35**, 213-221.
- Rosec, J.-P.** (1999). Les Staphylocoques entérotoxiques : Etude épidémiologique de souches d'origine alimentaire et détection par PCR multiple. *Thèse de Doctorat de l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc*.
- Rosec, J.-P., C. Dalet, O. Puel et J.-P. Guiraud** (1998). Staphylocoques isolés de produits alimentaires. Détection des souches entérotoxigènes par PCR. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **91**, (943), 157-173.
- Rosendahl, A., J. Hansson, P. Antonsson, R. Sékaly, T. Kalland et M. Dohlsten** (1997). A mutation of F47 to A in *Staphylococcus enterotoxin A* activates the T-cell receptor Vb repertoire in vivo. *Infect. Immun.*, **65**, (12), 5118-5124.
- Sawhney, D.** (1986). The toxicity of potassium tellurite to *Staphylococcus aureus* in rabbit plasma fibrinogen agar. *J. Appl. Bacteriol.*, **61**, 149-155.
- Schmitz, F.-J., M. Steiert, B. Hofmann, J. Verhoef, U. Hadding, H.-P. Heinz et K. Köhrer** (1998). Development of a multiplex-PCR for direct detection of the genes for enterotoxin B and C, and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Med. Microbiol.*, **47**, 335-340.
- Sesques, M.** (1994). Staphylocoques à coagulase positive dans le fromage fermier au lait cru de St. Nectaire. *Thèse de Doctorat de Claude Bernard Lyon I*.
- Sesques, M.** (2002). Devenir de *Staphylococcus aureus* durant la fabrication de fromages au lait cru d'Appellation d'Origine Contrôlée (A.O.C.) du Massif Central. *Congrilait*. Paris.
- Sesques, M. et N. Ballot** (1998). *Staphylococcus aureus* dans les fromages d'AOC du Massif central.
- Sharma, N., C. Rees et C. Dodd** (2000). Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, (4), 1347-1353.
- Shimizu, A., M. Fujita, H. Igarashi, M. Takagi, N. Nagase, A. Sasaki et J. Kawano** (2000). Characterization of *Staphylococcus aureus* coagulase type VII isolates from staphylococcal food poisoning outbreaks (1980-1995) in Tokyo, Japan, by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, (10), 3746-3749.
- Smith, J., R. Buchanan et S. Palumbo** (1983). Effect of food environment on Staphylococcal enterotoxin synthesis : A review. *J. Food Prot.*, **46**, (6), 545-555.
- Stadhouders, J., F. Hassing et N. Van Aalst-Van Maren** (1976). A pour-plate method for the detection and enumeration of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in the Baird-Parker medium without egg yolk. *Neth. Milk Dairy J.*, **30**, 222-229.
- Stephan, R., C. Annemuller, A. Hassan et C. Lammler** (2001). Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet. Microbiol.*, **78**, 373-382.
- Stephan, R., K. Buehler et C. Lutz** (2002). Prevalence of genes encoding enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* strains isolated from

bulk-tank milk samples in Switzerland. *Milchwissenschaft*, **57**, (9/10), 502-504.

Stewart, C. M., M. B. Cole, J. D. Legan, L. Slade, M. H. Vandeven et D. W. Schaffner (2002). *Staphylococcus aureus* growth boundaries: Moving towards mechanistic predictive models based on solute-specific effects. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, (4), 1864-1871.

Strachan, N., P. John et I. Millar (1997). Application of a rapid automated immunosensor for the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in cream. *Int. J. Food Microbiol.*, **35**, 293-297.

Su, Y.-C. et A. Wong (1998). Production of staphylococcal enterotoxin H under controlled pH and aeration. *Int. J. Food Microbiol.*, **39**, 87-91.

Su, Y.-C. et A. C. L. Wong (1997). Current Perspectives on Detection of Staphylococcal Enterotoxins. *J. Food Prot.*, **60**, (2), 195-202.

T

Takeuchi, S., K. Ishiguro, M. Ikegami, T. Kaidih et Y. Hayakawa (1998). Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. *Vet. Microbiol.*, **59**, 251-258.

Taylor, D. et K. Holland (1989). Amino acid requirements for the growth and production of some exocellular products of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 319-329.

Tenover, F. C., R. Arbeit, R. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing et B. Swaminathan (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, (9), 2233-2239.

Todd, E., R. Szabo, H. Robern, T. Gleeson, C. Park et D. Clark (1981). Variation in counts, enterotoxin levels and TNase in Swiss-type cheese contaminated with *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.*, **44**, (11), 839-848.

Tsen, H., G. Yu et H. Hu (1997). Comparison of type A enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from geographically far distant locations by pulsed field gel electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.*, **82**, 485-493.

Tsen, H., G. Yu et I.-T. Lin (1995). Plasmid profiles and pulsed-field gel electrophoresis for type A enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *J. Food Prot.*, **58**, (2), 147-153.

Turner, K., H. Morris et F. Martley (1983). Swiss-type cheese. II. The role of thermophilic lactobacilli

in sugar fermentation. *N. Z. J. Dairy Sci. Tech.*, **18**, 117-123.

Tweten, R. et J. Iandolo (1983). Transport and processing of staphylococcal enterotoxin B. *J. Bacteriol.*, **153**, (1), 297-303.

V

Van der Zee, A., H. Verbakel, J.-C. Van Zon, I. Frenay, A. Van Belkum, M. Peeters, A. Buiting et A. Bergmans (1999). Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains : comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, (2), 342-349.

Varaldo, P., R. Kilpper-Balz, F. Biavasco, G. Satta et K. H. Schleifer (1988). *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **38**, (4), 436-439.

Vautor, E., G. Abadie, J.-M. Guibert, C. Huard et M. Pépin (2003). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.*, article in press.

Vernozy-Rozand, C., A. Meyrand, C. Mazuy, M.-L. Delignette-Muller, G. Jaubert, G. Perrin, C. Lapeyre et Y. Richard (1998). Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goats' milk lactic cheeses. *J. Dairy Res.*, **65**, 273-281.

Vilhelmsson, O. et K. J. Miller (2002). Synthesis of pyruvate dehydrogenase in *Staphylococcus aureus* is stimulated by osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, (5), 2353-2358.

W

Walstra, P., T. Geurts, A. Noomen, A. Jellema et M. Van Roekel (1999). Chapter 17. in *Dairy Technology : Principles of milk, properties and processes*. New York, Marcel Dekker, Inc.

Weinrichter, B., W. Luginbühl, H. Rohm et J. Jimeno (2001). Differentiation of Facultatively Heterofermentative Lactobacilli from plants, milk, and hard type cheeses by SDS-PAGE, RAPD, FTIR, energy source utilization and autolysis type. *Leben. Wiss. U-Technol.*, **34**, 556-566.

Widmer, F. et R. Beffa (1997). Aide-mémoire de biochimie et de biologie moléculaire. Paris, *Tec & Doc, Lavoisier*.

Wieneke, A., D. Roberts et R. Gilbert (1993). Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. *Epidemiol. Infect.*, **110**, 519-531.

Witte, W., M. Grigorova, D. Bajljsov, R. Humel et G. Korukov (1978). Ecology of *Staphylococcus aureus* : comparative characterization of strains isolated from man, cattle and sheep in bulgaria and in the GDR. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, **22**, (2), 177-183.

Wu, X., N. Bishopric, D. Discher, B. Murphy et K. Webster (1996). Physical and functional sensitivity of zinc finger transcription factors to redox change. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, (3), 1035-1046.

Z

Zadoks, R., W. Van Leeuwen, H. Barkema, O. Sampimon, H. Verbrugh, Y. Schukken et A. Van Belkum (2000). Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, (5), 1931-1939.

Zhang, S., J. Iandolo et G. Stewart (1998). The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiol. Lett.*, **168**, 227-233.

Zschöck, M., D. Botzler, S. Blöcher, J. Sommerhäuser et H. Hamann (2000a). Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 (tst) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. *Int. Dairy. J.*, **10**, 569-574.

Zschöck, M., J. Sommerhäuser et H. Castaneda (2000b). Relatedness of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mammary gland suffering from mastitis in a single herd. *J. Dairy Res.*, **67**, 429-435.

Annexes

Milieux de Culture

Les compositions des milieux sont en grammes par litre sauf mention spéciale.

➔ *Baird Parker - Rabbit Plasma Fibrinogen – BP-RPF (Biokar Diagnostics, France)*

Milieu de base (950 ml) :	Tryptone	10 g
	Extrait de viande	5 g
	Extrait autolytique de levure	1 g
	Pyruvate de sodium	10 g
	Glycine	12 g
	Chlorure de lithium	5 g
	Agar bactériologique	15 g

Supplément à ajouter dans 90 ml de milieu de base		
	Plasma de lapin, EDTA	12.5 ml
	Fibrinogène bovin	2.5 g
	Inhibiteur de trypsine	12.5 mg
	Tellurite de potassium	12.5 mg

pH du milieu complet prêt à l'emploi à 25 °C : 7.2 ± 0.2

➔ *Bouillon cœur cervelle - BHI (Biokar Diagnostics, France)*

Bouillon cœur cervelle	17.5 g
Peptone pancréatique de gélatine	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate disodique	2.5 g
Glucose	2 g

pH du milieu prêt à l'emploi : 7.4 ± 0.2

Pour du BHI gélosé il faut ajouter 15 g d'agar bactériologique par litre

➔ **PLATE COUNT AGAR - PCA (DIFCO, DETROIT, USA)**

Digestion pancréatique de caséine	5 g
Extrait de levure	2.5 g
Dextrose	1 g
Gélose	15 g

pH du milieu prêt à l'emploi : 7.4 ± 0.2

➔ **Gélose au sang de mouton** Gélose de base Columbia au sang de mouton

Tripcase	15 g
Soyase	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Gélose	15 g

Supplément de 5 % de sang de mouton

pH du milieu prêt à l'emploi : 7.3 ± 0.2

➔ *Gélose M17*

Milieu pour 950 ml :

Polypeptone peptone	5 g
Soytone	5 g
Extrait de levure	2.5 g
Extrait de viande	5 g
B-glycérophosphate de sodium	19 g
Sulphate de magnésium	0.25 g
Acide ascorbique	0.5 g

pH du milieu prêt à l'emploi : 7.4 ± 0.2

50 ml de lactose à 10 % (Difco, Detroit, USA) sont ajoutés après autoclavage

➔ Milieu Mayeux Sandine Elliker – MSE (Biokar Diagnostics, France)

Tryptone	20 g
Gélatine	2.5 g
Extrait autolytique de levure	5 g
Saccharose	100 g
Glucose	5 g
Citrate de sodium	1 g
Azide de sodium	0.075 g
Agar bactériologique	15 g

pH du milieu prêt à l'emploi : 6.9 ± 0.2

➔ Milieu MRS (Difco, Detroit, USA)

Peptone de protéase no. 3	10 g
Extrait de bœuf	10 g
Extrait de levure	5 g
Dextrose	20 g
Polysorbate 80	1 g
Citrate d'ammonium	2 g
Acétate de sodium	5 g
Sulfate de magnésium	0.1 g
Phosphate dipotassique	2 g

pH du milieu prêt à l'emploi : 6.5 ± 0.2

➔ Agar de bile rouge violet – VRBA (Difco, Detroit, USA)

Extrait de levure	3 g
Peptone	7 g
Sel biliaires N°. 3	1.5 g
Lactose	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Gélose	15 g
Rouge neutre	0.03 g
Cristal violet	0.002 g

pH du milieu prêt à l'emploi : 7.4 ± 0.2

Transia Plate

Staphylococcal Enterotoxins

Notice d'utilisation

Référence ST 0796

INTRODUCTION

Transia Plate *Staphylococcal Enterotoxins* est un test qui permet la détection des entérotoxines staphylococciques A, B, C, D et E dans les aliments et les surageants de culture.

Note : le kit Transia Plate *Staphylococcal Enterotoxins* permet de réaliser un test qualitatif. Aucune quantification ne doit être effectuée avec ce test.

PRINCIPE DU TEST

Transia Plate *Staphylococcal Enterotoxins* est un test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) de type sandwich. Le support solide de la réaction est une microplaque dont les puits sécables sont sensibilisés avec des anticorps spécifiques des entérotoxines staphylococciques.

MATERIEL

Composition du kit

Plaque de microtitration à barrettes sécables
(12 barrettes de 8 puits)
Couvercle plastique

Flacon 1 : témoin négatif : prêt-à-l'emploi - 4 mL.

Flacon 2 : témoin positif : entérotoxine A de staphylocoques. A diluer 50 fois au moment de l'emploi - 0,8 mL.

A manipuler avec des gants.

Flacon 3 : tampon de lavage concentré. A diluer 30 fois - 50 mL.

Flacon 4 : conjugué : mélange d'anticorps anti-entérotoxines de staphylocoques conjugués à la peroxydase : prêt-à-l'emploi - 12 mL.

Flacon 5 : substrat : urée - H₂O₂ - 7 mL.

Flacon 6 : chromogène : TMB - 7 mL.

Flacon 7 : solution stop : H₂SO₄ - prêt-à-l'emploi - 7 mL.

Equipement nécessaire mais non fourni

Pour la préparation des échantillons et des réactifs :

- Balance et nacelles de pesée
- Mixeur ou stomacher et sacs avec filtre
- Gants

- Centrifugeuse de laboratoire (3000 g minimum)
- Vortex
- pH-mètre ou papier pH
- Verrierie propre
- Filtre 0,2 µm
- Tubes à dialyse SPECTRA/POR STANDARD en cellulose régénérée, catégorie SPECTRA/POR 1 avec seuil de rétention (MWCO = Molecular Weight Cut-Off) de 6-8000. Fournisseur : Merck Eurolab, division Polylabo (Strasbourg, France) sous la référence 85716 (largeur à plat = 32 mm). Autres fournisseurs : Bioblock (Illkirch, France) et Interchim (Montluçon, France).
- Pincettes de fermeture pour tubes à dialyse. Fournisseurs : Merck Eurolab, division Polylabo (Strasbourg, France), Bioblock (Illkirch, France) et Interchim (Montluçon, France). Références suivant la couleur souhaitée et la largeur du tube à dialyse.
- Portoir de tubes à hémolyse.
- Micropipettes de 100-1000 µL et cônes adaptés, (disponibles au catalogue Diffchamb, réf : EP 1000).
- Multipipette type Eppendorf et embouts de 5 et de 2,5 mL pour Multipipette (disponibles au catalogue Diffchamb, réf : EP 0490, EP 0472, EP 0478).
- Agitateur (environ 600 rpm).
- Epruvette de 1 litre et béccher de 1 litre.
- Fissette plastique.
- Papier absorbant.
- Cuvette ou autre récipient pouvant être en contact avec de l'eau de javel ou de la soude.
- Portoir de tubes autobloquant (disponible au catalogue Diffchamb, réf : PT 0921).
- Lecteur de microplaque, avec filtre de 450 nm (disponibles au catalogue Diffchamb).

Réactifs nécessaires mais non fournis

Pour la préparation des échantillons :

- Eau distillée
- Tampon d'extraction (optionnel)
 - Na₂HPO₄, 2H₂O 35,6 g
 - KH₂PO₄ 6,8 g
 - H₂O 1 L
- Réactifs pour l'ajustement du pH : NaOH (6N), HCl (6N)
- Kit d'extraction pour les viandes crues (Diffchamb, réf : AK 0220) : pour l'analyse de viande crue, de charcuterie crue ou cuite ou de produits de la mer.
- Pour une concentration de l'échantillon par dialyse : PEG (ou polyéthylène glycol) avec un poids moléculaire > 17000. Fournisseurs : Fluka (St Quentin)

NOT COM 120K 03/01 - 1/7

Transia Plate

Staphylococcal Enterotoxins

Fallavier, France) ou Merck (Nogent sur Marne, France).

Pour la confirmation du pouvoir toxigène d'une souche de Staphylococcus aureus :

- Bouillon cœur cervelle
- Sérum de lapin non immun décomplémenté (Diffchamb, réf AK 0224)

Pour la préparation de tampon complémentaire :

Si le volume de tampon de lavage est insuffisant, on peut en préparer à partir de PBS et de Tween (Voir préparation des réactifs).

- PBS NaCl 0,765 g
- Na₂HPO₄·2H₂O 0,0724 g
- KH₂PO₄ 0,021 g
- H₂O 1 L
- Tween 20 (SIGMA : réf. P1379) 0,5 mL

RECOMMANDATIONS GENERALES

- Le kit doit être conservé entre +2 et 8°C.
- Les entérotoxines représentent un risque potentiel d'intoxication. Les bonnes pratiques de laboratoire doivent être respectées lors de l'utilisation de ce kit. Des vêtements protecteurs doivent être portés et tout contact des réactifs avec la peau doit être évité. Ne pas avaler.
- Le flacon 2 contient une solution d'entérotoxine A de staphylocoque.
- Décontaminer tous les matériels et réactifs ayant été en contact avec les entérotoxines de staphylocoques dans de l'eau de javel ou de la soude (voir annexe 1).
- Ne pas pipeter les réactifs à la bouche.
- Respecter les durées d'incubation.
- En cas de contact de l'un des réactifs avec la peau ou les yeux, laver abondamment à l'eau.
- Une fiche de sécurité est disponible sur demande.

MODE OPERATOIRE

Préparation des réactifs

Important : Ramener les échantillons à température ambiante (18-25°C). Les sortir de leur boîte au moins une heure avant leur utilisation.

Préparer à l'avance tous les réactifs et le matériel de manière à éviter toute attente au cours de la manipulation. Agiter chaque flacon manuellement ou au vortex avant toute utilisation.

Tampon d'extraction

Dans un béccher d'un litre, dissoudre en agitant : 35,6 g de Na₂HPO₄·2H₂O et 6,8 g de KH₂PO₄ dans 1 L d'eau distillée. Homogénéiser.

20-40 mL de tampon sont nécessaires par échantillon.

Ajustement du pH

- Solution de soude NaOH 6N : dissoudre 240 g de NaOH dans 0,8 litre d'eau distillée. Ajuster le volume à 1 litre en eau distillée.
- Solution d'acide chlorhydrique HCl 6N : mélanger 500 ml d'HCl à 37 % (12 N) avec 500 mL d'eau distillée (prendre soin d'ajouter l'acide dans l'eau).

Kit d'extraction pour les viandes crues (AK 0220)

- Reconstituer les solutions d'extraction 1 et 2 en introduisant 400 µL d'eau distillée dans chacun des flacons contenant ces 2 réactifs. Homogénéiser.
- Aliquoter en fractions de 20 µL et conserver entre -15 et -30° C.

Sérum de lapin non immun décomplémenté (AK 0224)

- Ce sérum est prêt-à-l'emploi
- Aliquoter en fractions de 100 µL puis conserver entre -15 et -30° C.

Préparation des tubes à dialyse

Attention : manipuler les tubes à dialyse avec des gants.

- Couper une longueur de tube à dialyse d'environ 2 mètres.
- Placer le tube à dialyse dans de l'eau distillée pour le réhydrater pendant 3 heures. Attention : ne pas laisser sécher le tube à dialyse après réhydratation.
- Eliminer l'eau distillée et renouveler une fois l'opération de trempage du tube à dialyse en eau distillée pendant 3 heures.
- Le tube à dialyse ainsi hydraté peut être stocké à 2-8°C dans une solution d'éthanol à 20 %.
- Pour la concentration d'un échantillon contre le PEG, découper la longueur nécessaire de tube à dialyse, et avant utilisation, bien rincer l'intérieur et l'extérieur du tube à dialyse avec de l'eau distillée.

Dilution du tampon de lavage

- Diluer le tampon de lavage concentré (flacon 3) dans de l'eau distillée au 1/30^{ème}, homogénéiser et remplir la pissette prévue à cet usage.
- Conserver le tampon de lavage à 2-8°C pendant 1 mois maximum.
- A titre indicatif, environ 20 mL de solution de lavage sont nécessaires par échantillon.

Préparation de tampon de lavage complémentaire

- Dans un béccher d'un litre, dissoudre les différents composants dans environ 800 ml. d'eau distillée, sous agitation.
- Vérifier le pH qui doit être à 7,2 +/- 0,1, puis compléter à 1 litre dans une fiole jaugée. Transférer dans un flacon et étiqueter. Conserver à 2-8°C (1 mois maximum).

Dilution du témoin positif

- Afin de diminuer les erreurs dues au pipetage d'un volume de témoin positif trop faible, il est possible de préparer un volume plus important que le volume strictement nécessaire.
- Préparer 1 témoin positif avant chaque manipulation
- Préparer le témoin positif en diluant 40 µL de témoin positif 50X (flacon 2) dans 2 mL de tampon de lavage reconstitué.
- Agiter soigneusement.

Mélange substrat / chromogène

- Préparer le mélange substrat chromogène (flacon 5 et flacon 6) comme suit : soit n, le nombre de puits, mélanger n x 60 µL de substrat avec n x 60 µL de chromogène.
- Ce mélange n'est pas stable et ne peut donc pas être préparé à l'avance.

Préparation des échantillons

Préambule :

Afin de garantir une extraction optimale, des protocoles particuliers ont été développés pour certaines matrices alimentaires.

Cette notice présente en effet des protocoles pour les produits suivants :

- Produits laitiers, produits chocolatés et viandes séchées,
- Viande crue, charcuterie crue ou cuite, produits de la mer,
- Liquides et conserves de champignons,
- Produits riches en sucre et en sels.
- Tous les extraits peuvent être concentrés par dialyse contre du polyéthylène glycol à 30 % (voir § Concentration de l'échantillon par dialyse) pendant quelques heures ou par lyophilisation ou par utilisation d'un concentrateur Speed-Vac à 44°C. Une étape de dialyse/concentration est obligatoire avant la réalisation du test lors d'une analyse d'un produit laitier par la méthode officielle (Cf. Note de Service DGAL/SDHA/N 99-8113 du 19 juillet 1999)
- Les extraits peuvent être conservés entre -15 et -20°C pendant 1 mois environ (1 semaine seulement pour les produits laitiers) avant d'être testés.

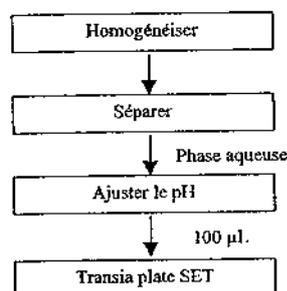
Protocole général

1. Ajouter 20 mL de tampon d'extraction à 20 g d'aliment à tester. Broyer l'échantillon pour obtenir une suspension homogène.
2. Dans le cas où la suspension serait trop compacte, augmenter le volume de tampon d'extraction.
3. Il est conseillé de laisser diffuser la toxine éventuellement présente dans l'échantillon en laissant reposer la suspension pendant environ 20 min.
4. Filtrer sur papier Whatman ou centrifuger la suspension pour éliminer les particules alimentaires (15 min à 3000 g minimum).
5. Récupérer la phase aqueuse.

6. Contrôler le pH de l'extrait. Le ramener dans l'intervalle (7,0-7,5) si nécessaire.
7. Si l'extrait est trouble, refaire une filtration ou une centrifugation identique à la précédente.
8. Réaliser le test sur 100 µL de surnageant clair.

Préparation des échantillons

Ajouter 20 g d'échantillon à 20 mL de tampon d'extraction / eau distillée



Produits laitiers, produits chocolatés et viandes séchées

Une précipitation acide améliore le rendement d'extraction :

1. Ajouter 40 mL d'eau distillée à 20 g d'échantillon à tester. Broyer l'échantillon pour obtenir une suspension homogène.
2. Il est conseillé de laisser diffuser la toxine éventuellement présente dans l'échantillon en laissant reposer la suspension pendant 30 minutes environ.
3. Amener le pH de la suspension dans l'intervalle 4,0-4,5. Filtrer ou centrifuger (3000 g minimum).
4. Récupérer la phase aqueuse.
5. Ramener le pH dans l'intervalle 7,0-7,5.
6. Refaire une filtration ou une centrifugation identique à la précédente. (3000 g minimum).
7. Récupérer la phase aqueuse.
8. Vérifier si le pH est toujours entre 7,0 et 7,5 (réajuster si nécessaire).
9. Réaliser le test sur 100 µL de surnageant clair.

Transia Plate

Staphylococcal Enterotoxins

Produits de la mer, produits carnés crus et produits de charcuterie

Réaliser l'extraction selon le protocole général (1 à 6) en utilisant de l'eau distillée (l'utilisation du tampon d'extraction peut provoquer la formation d'un gel). Un traitement supplémentaire est cependant nécessaire pour éliminer d'éventuels faux positifs. Pour cela, utiliser le kit d'extraction des viandes crues (réf. AK0220).

1. Au moment de l'emploi, décongeler une fraction des solutions 1 et 2 et les maintenir dans de la glace pilée.
2. Ajouter 1 mL d'extrait ramené à température ambiante à 20 µL de la solution 1.
3. Homogénéiser.
4. Incuber 10 min à température ambiante (18-25°C).
5. Ajouter 20 µL de la solution 2.
6. Homogénéiser.
7. Incuber 10 min à température ambiante (18-25°C).
8. Tester 100 µL de l'extrait final.

Aliments secs

- Réaliser l'extraction sur 20 g de produit réhydraté (avec de l'eau distillée) en suivant le protocole général.

Aliments liquides, conserves de champignons

La détection des entérotoxines dans les conserves de champignons s'effectue sur le jus.

Dans le cas de liquides, réaliser directement le test sur 100 mL après vérification du pH et ajustement à 7,0-7,5 si nécessaire, sans extraction.

Produits fortement salins (> 5%) ou riches en sucres (marmelade, confiture et produits dérivés)

- Après application du protocole d'extraction se rapportant à la catégorie d'aliments testée, dialyser l'extrait pendant une nuit contre de l'eau distillée (seuil de rétention du tube à dialyse : 6-8000 Da).

Concentration de l'échantillon par dialyse (obligatoire lors de l'analyse de produits laitiers par la méthode officielle, Cf. préambule, page 3/7)

Attention : manipuler les tubes de dialyse avec des gants.

1. Placer l'échantillon à concentrer dans le tube à dialyse, en fermant soigneusement chaque extrémité du tube de dialyse, soit en réalisant des nœuds (attention à ne pas rompre le tube à dialyse), soit à l'aide de pinces de fermeture adaptées à la largeur du tube à dialyse.
2. Placer le tube à dialyse dans la solution de PEG 30 % et laisser dialyser à 2-8°C. L'objectif de la dialyse est de concentrer l'extrait 10 fois (en partant de 30 mL d'extrait concentré jusqu'à un volume final d'environ 3 mL).

3. En fin de concentration, sortir le tube à dialyse et en rincer soigneusement l'extérieur avec de l'eau distillée, afin d'éliminer tous les résidus de PEG 30 %.
4. Ouvrir alors une extrémité du tube à dialyse et récupérer l'échantillon concentré, soit par retournement du tube à dialyse, soit à l'aide d'une pipette.
Rincer l'intérieur du tube avec un faible volume de tampon d'extraction afin de récupérer le reste d'échantillon.
5. Contrôler le pH de l'échantillon concentré qui doit être égal à 7,0-7,5. Ajuster le pH si nécessaire.
6. Réaliser alors le test immunoenzymatique sur 100 µL.

Surnageant de culture de *Staphylococcus aureus*

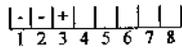
L'interférence due à la présence de protéine A produite par *Staphylococcus aureus* peut être éliminée par addition de sérum de lapin non immun décomplémenté (réf AK0224).

1. Cultiver une colonie de *Staphylococcus aureus* dans 10 mL de bouillon cœur cervelle (BCC) pendant 24 heures à 37°C.
2. Centrifuger la culture pendant 10 min à 3000 g.
3. Prélever le surnageant et stériliser par filtration à 0,2 µm.
4. Diluer ce surnageant au 1/10 dans du BCC (100 µL de surnageant de culture + 900 µL BCC).
5. Mettre 900 µL de la solution diluée dans un tube à hémolyse puis ajouter 100 µL de sérum de lapin non immun décomplémenté.
6. Préparer un témoin négatif en mélangeant 900 µL de BCC stérile et 100 µL de sérum de lapin non immun décomplémenté. Ce témoin servira de base pour le calcul du seuil de positivité.
7. Homogénéiser.
8. Incuber les deux tubes pendant 30 min à température ambiante (18-25°C).
9. Réaliser le test sur 100 µL de chaque solution.

TEST IMMUNOENZYMATIQUE

Ne pas mélanger différents lots de réactifs.
L'étape du lavage est très importante. Lors du lavage, diriger un jet puissant vers le fond des puits.
Réaliser les différentes incubations du test immunoenzymatique sous agitation (environ 600 rpm).
Essuyer le couvercle avant chaque utilisation.

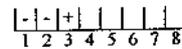
1.



Témoins et échantillons

Retirer les barrettes de leur support en retournant la microplaque. Calculer le nombre de puits nécessaires et les placer sur le support : 2 puits pour le témoin négatif, 1 seul puits pour les surnageants de culture, 1 puits pour le témoin positif dilué, 1 puits par échantillon à analyser. Remettre les barrettes non utilisées dans le sachet plastique contenant le déshydratant.
Repérer l'emplacement des échantillons sur la feuille de travail (ENR COM 120).

2.



Distribuer 100 µL des contrôles et des échantillons dans les puits correspondants à l'aide d'une micropipette.
Pour les surnageants de culture de *Staphylococcus aureus*, utiliser le témoin négatif préparé dans « Préparation des échantillons ».

3.



30 min.,
T°C ambiante
Agitation

Incuber à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes minimum sous agitation. Couvrir la microplaque.
Préparer le tampon de lavage – Voir Préparation des réactifs.

4.

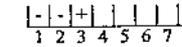


Laver 5 fois

Conjugué

Vider le contenu des puits dans une cuvette, par retournement et les remplir successivement avec un jet puissant de tampon de lavage dirigé vers le fond des puits ; laisser le tampon de lavage 5 à 10 secondes ; effectuer l'opération 5 fois. A la fin des lavages, éliminer les traces de tampon en tapant fermement la microplaque retournée sur un papier absorbant propre.

5.



Distribuer 100 µL de conjugué dans chacun des tubes (flacon 4).

6.



30 min.,
T°C ambiante
Agitation

Laisser incuber à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes sous agitation.
Préparer le volume nécessaire du mélange substrat /chromogène juste avant la fin de l'incubation. Voir Préparation des réactifs.

7.



Laver 5 fois

Laver les puits comme indiqué au paragraphe n°4. Effectuer l'opération 5 fois.

8.



Substrat /
chromogène

Distribuer 100 µL du mélange substrat /chromogène dans chaque puits.
Une distribution séparée du substrat et du chromogène peut être réalisée : distribuer successivement 50 µL de substrat (flacon 5) et 50 µL de chromogène (flacon 6).

9.



30 min.,
T°C
ambiante

Laisser incuber à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes sous agitation.

10.



Solution stop

Ajouter 50 µL de solution stop (flacon 7) dans chaque puits, en suivant le même ordre que lors de l'addition du mélange substrat /chromogène.
Mélanger le contenu des puits en effectuant un mouvement horizontal avec la plaque afin de permettre un changement radical de la couleur. Le bleu vire alors au jaune.
Lire les densités optiques à 450 nm (faire le blanc sur l'air).

Transia Plate

Staphylococcal Enterotoxins

INTERPRETATION DES RESULTATS

Validation du test

- La DO du témoin positif (TP) doit être supérieure ou égale à 0,50.
- La DO du témoin négatif (TN) doit être inférieure ou égale à 0,30.
- Si les témoins ne satisfont pas ces critères, les résultats sont non valides.

Seuil de positivité

- Cas d'un extrait alimentaire
- DO moyenne des témoins négatifs + 0,20
- Cas d'un surnageant de culture
- DO du témoin milieu de culture stérile + 0,10

Echantillons positifs

Un échantillon est considéré positif si la valeur de sa DO est supérieure ou égale au seuil de positivité.

Echantillons négatifs

Un échantillon est considéré négatif si sa DO est inférieure au seuil de positivité - 0,05.

Echantillons douteux

Si la DO d'un extrait est légèrement inférieure au seuil de positivité (comprise entre le seuil et le seuil - 0,05), la réponse peut être vérifiée en concentrant l'extrait par dialyse contre du PEG 30 % (seuil de coupure 6-8000 Da) et en le retestant en ELISA.

Confirmation d'un résultat positif

Un échantillon positif peut être confirmé en recherchant le pouvoir toxigène de la souche isolée à partir de l'échantillon (si toutefois celle-ci n'a pas été détruite par la cuisson ou tout autre traitement physique de l'échantillon).

PERFORMANCES DU TEST

Limite de détection

Lors d'une étude d'expertise, dans des conditions expérimentales de contamination artificielle à l'aide de l'entérotoxine A, le kit a permis de détecter de 0,25 à 1 ng/g selon la nature des échantillons.

Le rendement d'extraction variant en fonction de la composition de l'aliment, il n'est pas possible de faire d'estimation de la quantité d'entérotoxines présentes dans un échantillon trouvé positif.

Spécificité

Le kit de détection des entérotoxines de staphylocoques est spécifique des entérotoxines A, B, C, D et E. Cependant, la nature spécifique de certaines matrices alimentaires peut être parfois à l'origine d'interférences (faux positifs rares et aléatoires) dues à la présence de peroxydase, de protéine A ou de substances endogènes à effets similaires.

VALIDATION

Méthode officielle recommandée par le Ministère de l'Agriculture.

ANNEXES

Annexe 1 : Recommandation pour la décontamination

Annexe 2 : Feuille de travail ENR COM 120

Remarque : Les informations contenues dans cette notice sont basées sur nos connaissances actuelles et sont destinées à fournir des précisions quant à l'utilisation de ce kit. Cependant, elles ne constituent en aucun cas une garantie de bons résultats en cas d'application particulière.

Ce test est produit par : Diffchamb S.A.
8, rue St Jean de Dieu
69007 LYON - France
Tél. : 04 72 71 56 80
Fax : 04 72 71 43 34
www.diffchamb.com

Ce test est distribué par : Diffchamb France SARL
85, Bd du Parc d'Artillerie
69007 LYON - France
Tél : 04 37 37 88 77
Fax : 04 37 37 88 78
E-mail : Diffchamb.France@wanadoo.fr

Annexe 1

Tout matériel ayant été en contact avec des entérotoxines staphylococciques doit être décontaminé par immersion dans une solution de javel ou de soude pendant 12 heures à température ambiante. Bien laver et rincer le matériel plusieurs fois après la décontamination.

Matériel et réactifs utilisés

Récipients résistant à la javel et la soude
Eau de javel à 48° Cl
Soude 1N

Préparation des solutions de décontamination

Eau de javel : Diluer 50 mL d'eau de javel concentrée dans 950 mL d'eau.
Soude 1N : Dissoudre 40 g de soude dans un litre d'eau distillée.

SET-RPLA KIT TOXIN DETECTION KIT

Code: TD0900

STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN TEST KIT FOR THE DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS A, B, C AND D IN FOOD SAMPLES OR CULTURE FILTRATES BY REVERSED PASSIVE LATEX AGGLUTINATION

INTRODUCTION

Staphylococcal food poisoning is caused by eating foods contaminated with enterotoxins produced during the growth of certain strains of *Staphylococcus aureus*. Reports on the assay of these toxins by reversed passive latex agglutination (RPLA) have been published.^{1,2,3} The technique of reversed passive latex agglutination (RPLA) enables soluble antigen such as bacterial toxins to be detected in an agglutination assay.

In a standard agglutination assay, soluble antibody reacts with particulate antigen such as bacterial cells. However, in a **REVERSED** agglutination assay the antibody, which is attached to particles, reacts with the soluble antigen. The particles (in this case, latex) do not themselves play a part in the reaction and they are therefore **PASSIVE**. The cross-linking of the latex particles by the specific antigen/antibody reaction results in the visible **LATEX AGGLUTINATION** reaction.

The SET-RPLA test kit is based upon the reports by Shingaki *et al.*¹ and Oda *et al.*⁴ It was developed under the guidance of the Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health.

The SET-RPLA test may be used to detect staphylococcal enterotoxins in a wide variety of foods and to give a semi-quantitative result. The test may also be used to demonstrate enterotoxin production in isolates of *S. aureus* grown in culture. It should be noted that coagulase-negative staphylococci have been isolated which also produce enterotoxin in staphylococcal food poisoning.⁵

PRINCIPLE OF ASSAY

Polystyrene latex particles are sensitised with purified antiserum taken from rabbits, immunised individually with purified staphylococcal enterotoxins A, B, C and D. These latex particles will agglutinate in the presence of the corresponding enterotoxin. A control reagent is provided which consists of latex particles sensitised with non-immune rabbit globulins. The test is performed in V-well microtitre plates. Dilutions of the food extract or culture filtrate are made in five rows of wells, a volume of the appropriate latex suspension is added to each well and the contents mixed. If staphylococcal enterotoxins A, B, C or D are present, agglutination occurs, which results in the formation of a lattice structure. Upon settling, this forms a diffuse layer on the base of the well. If staphylococcal enterotoxins are absent or at a concentration below the assay detection level, no such lattice structure can be formed and, therefore a tight button will be observed. The diluent provided contains sodium hexametaphosphate, which has been shown to reduce the incidence of non-specific reactions with components of food matrices.⁶

PRECAUTIONS

This product is for *in vitro* diagnostic use only.

Do not freeze.

Reagents with different lot numbers should not be interchanged.

Reagents and diluent contain 0.1% sodium azide as a preservative. Sodium azide may react with lead or copper plumbing to produce metal azides which are explosive by contact detonation. To prevent azide accumulation in plumbing, flush with copious amounts of water immediately after waste disposal.

STORAGE

The SET-RPLA Kit must be stored at 2-8° C. Under these conditions the reagents will retain their reactivity until the date shown on the kit box. After reconstitution, the enterotoxin controls should be stored at 2-8° C. Under these conditions, the reconstituted enterotoxin controls will retain the reactivity for 3 months, or until the date shown on the kit box, whichever is the sooner.

SAMPLE PREPARATION

Food Matrices

A wide range of foods may be tested for staphylococcal enterotoxins; the extraction procedure may, however, require modification for particular foods. The main requirement is to achieve a non-turbid, fat-free extract. A low dilution factor is desirable for optimum sensitivity, but if the nature of the food dictates a greater dilution during extraction, a reduced sensitivity will result.

TO GAIN A REPRESENTATIVE SAMPLE OF A BATCH, A SERIES OF 10G PORTIONS ARE COLLECTED FROM DIFFERENT LOCATIONS WITHIN THE BATCH (SEE T.P.I., U.S.D.A. SAMPLING PLANS OR EQUIVALENT).

3. CULTURE FILTRATES

Staphylococci from either clinical sources or food matrices may be recovered and identified using suitable techniques described in standard textbooks.

METHOD OF USE

Materials required but not provided

Blender or homogeniser
Microtitre plates (V-well) and lids
Fixed or variable pipette and tips (25µl)
Centrifuge capable of generating 900g (typically 300 rpm in a small bench top centrifuge)
Membrane filtration unit using low protein-binding disposable filters with a porosity of 0.2µm-0.45µm (such as Millipore SLGV)
Tryptone Soya Broth (CM129)
Sodium chloride solution (0.85%)
Sodium hypochlorite solution (>1.3% w/w)
25µl dropper (optional)
25µl diluter (optional)
Micromixer (optional)
Moisture box (optional)

COMPONENTS OF KIT

TD901 Latex sensitised with anti-enterotoxin A. Latex suspension sensitised with specific antibodies (rabbit IgG) against staphylococcal enterotoxin A.

TD902 Latex sensitised with anti-enterotoxin B. Latex suspension sensitised with specific antibodies (rabbit IgG) against staphylococcal enterotoxin B.

TD903 Latex sensitised with anti-enterotoxin C. Latex suspension sensitised with specific antibodies (rabbit IgG) against staphylococcal enterotoxin C.

TD904 Latex sensitised with anti-enterotoxin D. Latex suspension sensitised with specific antibodies (rabbit IgG) against staphylococcal enterotoxin D.

TD905 Latex control. Latex suspension sensitised with non-immune rabbit globulins.

TD906 Staphylococcal enterotoxin A control.

TD907 Staphylococcal enterotoxin B control.

TD908 Staphylococcal enterotoxin C control.

TD909 Staphylococcal enterotoxin D control.

TD910 Diluent. Phosphate buffered saline containing bovine serum albumin and sodium hexametaphosphate.

Instruction leaflet

TOXIN EXTRACTION OR PRODUCTION

Extraction from Food Matrices

Blend 10g of sample with 10ml of sodium chloride solution (0.85%) in a blender or homogeniser.

Centrifuge the blended sample at 900g at 4° C for 30 minutes. **NOTE:** If a refrigerated centrifuge is not available, cool the sample to 4° C before centrifugation.

Filter the supernatant through a 0.2µm-0.45µm low protein-binding membrane filter. **Retain the filtrate for assay of toxin content.**

PRODUCTION OF ENTEROTOXINS IN CULTURE FLUIDS

Inoculate the isolated organism into Tryptone Soya Broth (CM129) and incubate at 37° C for 18-24 hours, preferably with shaking.

After growth, either centrifuge at 900g for 20 minutes at 4° C **or** membrane filter using a 0.2µm low protein-binding filter. **Retain the filtrate for assay of toxin content.**

CONTROL

Each reconstituted toxin control will cause agglutination with its respective sensitised latex. The use of the toxin controls will provide references for the positive patterns illustrated below (see interpretation of Test Results). The controls should be used from time to time only to confirm the correct working of the test latex. The toxin controls are not provided at a specified level and therefore must not be used as a means of quantifying the level of toxin detected in the test sample.

Assay Method

Working Reagents

The latex reagents and diluent are ready for use. The latex reagents should be thoroughly shaken before use to ensure a homogeneous suspension. To reconstitute the control reagents, add 0.5ml of diluent (TD910) to each vial. Shake gently until the contents are dissolved.

Arrange the plate so that each row consists of 8 wells. Each sample needs the use of 5 such rows.

Using a pipette or dropper, dispense 25µl of test sample to the first well of each of the 5 rows.

Using a pipette or diluter and starting at the **first well** of each row, pick up 25µl and perform doubling dilutions along each of the 5 rows. **Stop at the 7th well** to leave the last well containing diluent only.

To each well in the first row, add 25µl of latex sensitised with anti-enterotoxin A.

To each well in the second row, add 25µl of latex sensitised with anti-enterotoxin B.

To each well in the third row, add 25µl of latex sensitised with anti-enterotoxin C.

To each well in the fourth row, add 25µl of latex sensitised with anti-enterotoxin D.

To each well in the fifth row, add 25µl of latex control.

To mix the contents of each well, rotate the plate by micromixer or agitate by hand. Take care that no spillage occurs from the wells.

To avoid evaporation, cover the plate with a lid. Placing the plate in a moisture box is an acceptable alternative.

Leave the plate undisturbed on a vibration-free surface at room temperature for 20-24 hours. It will help subsequent reading of the test if the plate is placed on black paper for the duration of this incubation.

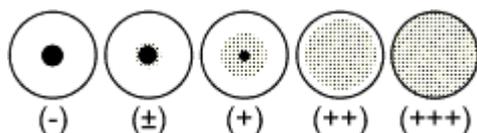
Examine each well in each row for agglutination, against a black background.

Centrifuge tubes, membrane filters, microtitre plates, lids and pipette tips should be sterilised by autoclaving at 121° C or disinfected before disposal in hypochlorite solutions (>1.3% w/w).

Dispose of culture extracts, food extracts, samples and toxin controls in hypochlorite solutions (>1.3% w/w).

INTERPRETATION OF TEST RESULTS

The agglutination pattern should be judged by comparison with the following illustration.



Results classified as (+), (++) and (+++) are considered to be positive.

Results in the row of wells containing latex control should be negative. In some cases, non-specific agglutination may be observed. In such cases the results should be interpreted as positive, provided that the reaction with sensitised latex is positive to a higher dilution of test sample than that seen with the latex control. The last well in all rows should be negative. If positive patterns are observed in some of these wells, the reaction should be regarded as invalid.

NOTE: Certain staphylococcal strains are known to produce more than one enterotoxin.

LIMITATIONS OF THE TEST

The sensitivity of this test in detecting the enterotoxins has been reported to be 0.5ng/ml in the test extract. When a food extract is made with a dilution ratio of 1 : 1 with diluent, the sensitivity is, therefore, 1ng/g of food matrix. The detection limit will vary according to any extra dilution conditions dictated by the type of food matrix. Concentration of the enterotoxin in the food extract can be effected by a variety of methods, such as ultrafiltration. Production in culture of SET's depends on the growth conditions. A positive result obtained by the culture demonstrates the production of one or more SET under those circumstances; it does not imply the *in vivo* production of toxins to those levels.

REFERENCES

1. Shingaki, M *et al.* (1981). *Ann. Rep. Tokyo Metro. Lab. Public Health* **32**: 128.
 2. Oda, T., *et al.* (1979) *Ann. Rep. Fukuoka City Lab Hyg.* **4** : 33.
 3. Park, C and Szabo, R. (1986). *Can. J. Microbiol.* **32** : 723.
 4. Oda, T. (1978) *Jap. J. Bacteriol.* **33**: 743.
 5. Crass, B and Bergdoll, M (1986). *J Clin. Microbiol.* **23**: 43.
 6. Rose, S., Bankes, P. and Stringer, M. (1989) *Int. J Food Microbiol.* **8**: 65-72
- ©2003 Oxoid Limited, All rights reserved.

RESUME

LES FROMAGES AU LAIT CRU DE TYPE PATE PRESSEE NON CUITE, SONT PARTICULIEREMENT SENSIBLES AU RISQUE "*STAPHYLOCOCCUS AUREUS*". CES FROMAGES SONT DITS SENSIBLES A CAUSE DE CERTAINS FACTEURS TECHNOLOGIQUES QUI PEUVENT FAVORISER LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES.

L'OBJECTIF PRINCIPAL DU TRAVAIL ETAIT D'EVALUER L'APTITUDE D'ISOLATS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* A PRODUIRE DES ENTEROTOXINES (SE) DANS DES CONDITIONS CONTROLEES DE FABRICATION FROMAGERE, EN FONCTION DE LEUR DIVERSITE PHENOTYPIQUE ET GENETIQUE. LE TRAVAIL A ETE REALISE EN QUATRE ETAPES :

- (1) Collecte et isolement de staphylocoques à coagulase positive, de laits et de fromages au lait cru de deux régions de France, et caractérisation phénotypique et génétique des isolats de *S. aureus* ;
- (2) Evaluation de l'aptitude à la croissance et à la production d'entérotoxines de 23 isolats de *S. aureus* sur fromage modèle à pâte pressée non cuite, fabriqué à partir de lait microfiltré additionné de crème pasteurisée ;
- (3) Evaluation de l'aptitude à la croissance et à la production d'entérotoxines de trois isolats de *S. aureus* dans des fromages expérimentaux, fabriqués avec du lait microfiltré, simulant trois fabrications traditionnelles : Cantal, Reblochon et Tomme de Savoie,
- (4) Evaluation de l'effet du potentiel d'oxydoréduction sur la croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxines.

LES ISOLATS DE *S. AUREUS* PRESENTAIENT UNE GRANDE DIVERSITE PHENOTYPIQUE ET GENETIQUE. LE BIOTYPE A HUMAIN ETAIT FAIBLEMENT RENCONTRE (< 3%) ET 6% DES ISOLATS ETAIENT PRODUCTEURS D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*. LE TYPAGE GENETIQUE D'UN NOMBRE REDUIT D'ISOLATS A REVELE UN FORT POURCENTAGE POSSEDANT AU MOINS UN DES GENES CODANT POUR SEA A SEJ ET TSST-1. PAR AILLEURS, LES ISOLATS PRODUCTEURS DE SED *IN VITRO* PRESENTAIENT UNE EMPREINTE GENETIQUE DISTINCTE, CARACTERISEE PAR ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE, DES AUTRES ISOLATS PRODUCTEURS. LA SPECTROSCOPIE IRTF S'EST AVEREE UNE TECHNIQUE INTERESSANTE POUR L'IDENTIFICATION DE *S. AUREUS*.

SEULE LA PRODUCTION DE SEA ET/OU SED A ETE MISE EN EVIDENCE DANS LE FROMAGE MODELE A PATE PRESSEE NON CUITE. AUCUNE PRODUCTION DE SEB OU SEC N'A ETE DETECTEE, MEME A DES NIVEAUX DE *S. AUREUS* DE $10^7 - 10^8$ UFC/G EN DEBUT D'AFFINAGE. CES FABRICATIONS ONT EGALEMENT MIS EN EVIDENCE UN EFFET LIE AU BIOTYPE SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET SA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES, AINSI QU'UN EFFET DU PH DU FROMAGE.

LES FABRICATIONS EXPERIMENTALES SIMULANT TROIS TECHNOLOGIES TRADITIONNELLES ONT EGALEMENT MIS EN EVIDENCE UN EFFET LIE AU PH DU FROMAGE, AINSI QU'A LA NATURE DE L'ISOLAT SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES. AUCUNE PRODUCTION D'ENTEROTOXINE N'A ETE DETECTEE DANS LES FROMAGES DE TYPE CANTAL ET DE TYPE TOMME DE SAVOIE. CEPENDANT, DES TRACES DE SEA ET DE SED ONT ETE DETECTEES EN DEBUT D'AFFINAGE DANS LE FROMAGE DE TYPE REBLOCHON, LIEES EN AUTRES, A UNE CINETIQUE D'ACIDIFICATION LENTE OBSERVEE DANS CE FROMAGE.

LE TRAVAIL EXPLORATOIRE SUR LE POTENTIEL D'OXYDORÉDUCTION A MONTRE L'IMPORTANCE D'APPROFONDIR LA CONNAISSANCE DE CE PARAMETRE ENVIRONNEMENTAL SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINE.

MOTS CLES : *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ENTEROTOXINES, BIOTYPES, TYPAGE GENETIQUE, SPECTROSCOPIE IRTF, FROMAGES MODELES, POTENTIEL D'OXYDOREDUCTION.

SUMMARY

SEMI-HARD RAW MILK CHEESES ARE PARTICULARLY SENSITIVE TO THE RISK OF “*STAPHYLOCOCCUS AUREUS*”. THESE CHEESE VARIETIES ARE SAID TO BE SENSITIVE DUE TO CERTAIN TECHNOLOGICAL FACTORS THAT CAN PROMOTE ENTEROTOXIN PRODUCTION.

THE MAIN OBJECTIVE OF THIS STUDY WAS TO EVALUATE *S. AUREUS* GROWTH AND ENTEROTOXIN (SE) PRODUCTION UNDER CONTROLLED CHEESE MAKING CONDITIONS, ACCORDING TO THE PHENOTYPIC AND GENETIC DIVERSITY OF THE ISOLATES. THE WORK WAS CARRIED OUT IN FOUR STAGES:

- (1) Recuperation and isolation of coagulase positive staphylococci from raw milk and raw milk cheeses from two regions in France, followed by phenotypic and genetic characterisation of the *S. aureus* isolates.
- (2) Evaluation of the capacity of 23 *S. aureus* isolates to grow and produce enterotoxins in an experimental cheese made with microfiltered milk.
- (3) Evaluation of the capacity of 3 *S. aureus* isolates to grow and produce enterotoxins in experimental cheeses, made with microfiltered milk, simulating three traditional fabrications: Cantal, Tomme de Savoie and Reblochon.
- (4) Evaluation of *S. aureus* growth and enterotoxin production as affected by redox potential.

THE *S. AUREUS* ISOLATES CONSTITUTED A WIDE PHENOTYPIC AND GENETIC DIVERSITY. THE HUMAN A BIOTYPE WAS RARELY ENCOUNTERED (<3%) AND 6% WERE CAPABLE OF PRODUCING ENTEROTOXINS *IN VITRO*. THE GENETIC TYPING OF A REDUCED NUMBER OF ISOLATES REVEALED A HIGH PERCENTAGE POSSESSING AT LEAST ONE OF THE GENES CODING FOR SEA TO SEJ AND TSST-1. MOREOVER, SED PRODUCING STRAINS WERE SHOWN TO BE TYPEABLE BY PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS AND PRESENTED A DIFFERENT GENETIC FINGERPRINT FROM THE OTHER ENTEROTOXIN PRODUCING ISOLATES. FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY REVEALED ITSELF TO BE AN INTERESTING TECHNIQUE FOR THE IDENTIFICATION OF *S. AUREUS*.

ONLY SEA AND SED WERE SHOWN TO BE PRODUCED IN THE SEMI-HARD CHEESE MODEL. NO SEB OR SEC WAS DETECTED. THESE FABRICATIONS ALSO EMPHASISED THE INFLUENCE OF THE BIOTYPE OF THE ISOLATE, ON *S. AUREUS* GROWTH AND ENTEROTOXIN PRODUCTION, AS WELL AS PH.

LIKewise, THE THREE TRADITIONAL CHEESES UNDERLINED THE EFFECT OF PH AS WELL AS THE NATURE OF THE ISOLATE ON *S. AUREUS* GROWTH AND ENTEROTOXIN PRODUCTION. NO ENTEROTOXINS WERE FOUND IN THE CANTAL AND TOMME DE SAVOIE CHEESES. HOWEVER, TRACES OF SEA AND SED WERE DETECTED IN THE REBLOCHON CHEESE, PROBABLY DUE TO THE VERY SLOW ACIDIFICATION DURING MANUFACTURE.

EXPLORATORY WORK WAS CARRIED OUT ON THE REDOX POTENTIAL AND EMPHASISED THE IMPORTANCE OF A MORE THOROUGH STUDY, TO IMPROVE UNDERSTANDING OF THIS ENVIRONMENTAL PARAMETER ON *S. AUREUS* GROWTH AND ENTEROTOXIN PRODUCTION.

KEYWORDS: *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ENTEROTOXINS, BIOTYPES, GENETIC TYPING, FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY, MODEL CHEESES, REDOX POTENTIAL.