



HAL
open science

Incidence de paramètres technologiques sur l'expression de gènes et la production d'entérotoxines de *Staphylococcus aureus* au cours des 72 h suivant l'empresurage des laits en fabrication fromagère

Manon Duquenne

► To cite this version:

Manon Duquenne. Incidence de paramètres technologiques sur l'expression de gènes et la production d'entérotoxines de *Staphylococcus aureus* au cours des 72 h suivant l'empresurage des laits en fabrication fromagère. Ingénierie des aliments. AgroParisTech, 2010. Français. NNT : 2010AGPT0015 . pastel-00569982

HAL Id: pastel-00569982

<https://pastel.hal.science/pastel-00569982>

Submitted on 25 Feb 2011

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.

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

**l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement
(Agro Paris Tech)**

Spécialité : Microbiologie

*présentée et soutenue publiquement
par*

Manon DUQUENNE

le 9 Février 2010

INCIDENCE DE PARAMETRES TECHNOLOGIQUES SUR L'EXPRESSION DE GENES ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS AU COURS DES 72 H SUIVANT L'EMPRESURAGE DES LAITS EN FABRICATION FROMAGERE

Directeur de thèse : Marielle BOUIX

Travail réalisé à :

*INRA, UR888 Bactéries Lactiques et pathogènes Opportunistes,
F-78350 Jouy en Josas
et AFSSA LERQAP, unité Hygiène et Microbiologie des Produits Alimentaires,
F-94700 Maisons Alfort*

Devant le jury :

M. Marc DANZART, Professeur, **AGROPARISTECH** **Président**
M^{me} Marie-Christine MONTEL, Directeur de recherche, **INRA**..... **Rapporteur**
M. Yves LE LOIR, Directeur de recherche, **INRA**..... **Rapporteur**
M. Emmanuel JAMET, **ACTILAIT** **Examineur**
M^{me} Agnès DELACROIX-BUCHET, Ingénieur de recherche, **INRA** **Examineur**
M^{me} Véronique DEPERROIS, Ingénieur de recherche, **AFSSA** **Examineur**
M^{me} Marielle BOUIX, Professeur, **AGROPARISTECH**..... **Examineur**

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Unité Bactéries Lactiques et Pathogènes Opportunistes (UBLO) de l'INRA de Jouy-en-Josas et dans l'unité Hygiène et Microbiologie des Produits Alimentaires (HMPA) du Laboratoire d'Etude et de Recherche sur la Qualité des Aliments et sur les Procédés agro-alimentaires (LERQAP) à l'AFSSA de Maisons-Alfort. Mes premiers remerciements s'adressent à Alexandra Gruss, directrice de UBLO, Véronique Deperrois, chef de l'unité HMPA, et Laurent Laloux, directeur du LERQAP, pour m'avoir accueillie au cours de ces trois ans dans leurs laboratoires respectifs.

Je remercie également l'ensemble des membres du jury, Marc Danzart, Marie-Christine Montel, Yves Le Loir et Emmanuel Jamet pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail, et tout particulièrement à Marie-Christine Montel et Yves Le Loir pour avoir accepté la charge de rapporteur de cette thèse.

Ces travaux de thèse ont été réalisés sous la direction de Marielle Bouix que je remercie pour son soutien et ses conseils avisés.

J'ai bénéficié, au cours de ces trois ans, de l'encadrement d'Agnès Delacroix-Buchet et Véronique Deperrois, qui sont toutes deux à l'origine de ce projet de thèse passionnant. Je les remercie tout d'abord de m'avoir donné l'opportunité de participer à ce projet. Merci à Véronique pour le soutien, l'aide précieuse et la confiance qu'elle m'a accordée au cours de ces trois années de thèse.

J'adresse un immense merci à Agnès Delacroix-Buchet qui m'a encadrée tout au long de mes travaux et qui est à l'origine du projet ANR SEFRO qui les a financés. Merci Agnès pour votre présence et votre disponibilité permanente, pour votre immense soutien dans les bons comme dans les mauvais moments, pour le temps que vous avez consacré à ce travail et pour votre investissement quasi-quotidien qui a permis que cette thèse se passe dans les meilleures conditions possibles.

Je tiens aussi à remercier les membres de mon comité de thèse, Elise Durant, Sylviane Derzelle et Michel Place, pour les conseils scientifiques prodigués lors de nos réunions semestrielles et pour le temps investi dans ce travail. Merci à Elise de m'avoir fait part de ses connaissances sur *S. aureus* et la biologie moléculaire et pour toutes les discussions que nous avons eues au cours de cette thèse. Merci à Sylviane pour ses conseils avisés sur les questions

de biologie moléculaire et particulièrement pour le temps consacré à la correction des articles scientifiques écrits au cours de cette thèse. Et enfin merci à Michel Place pour ses précieux conseils et les connaissances de l'industrie fromagère qu'il a bien voulu partager au cours de nos rencontres.

Merci également à l'ensemble des partenaires du projet SEFRO, Gilles Prévost, Valérie Stahl, Emmanuel Jamet, Olivier Couvert, Karine Le Barillec, Elisabeth Vindel, Caroline Frilley, Eric Mettler, Nadine Ballot, Gilbert Delespaul, pour les conseils au cours des discussions des réunions semestrielles du projet ANR.

Un très grand merci à Jacques-Antoine Hennekinne, avant tout, pour avoir partagé avec moi toutes ses connaissances sur les entérotoxines staphylococciques, pour ses précieux conseils et pour sa disponibilité. Je ne peux remercier Jacques-Antoine sans remercier tous les membres de son équipe et plus particulièrement Isabelle Papinaud et Amélie Gateaux qui ont effectué tous les dosages des entérotoxines.

J'adresse mes remerciements également à Marc Danzart, membre de ce jury, pour son aide dans la conception et l'analyse des plans d'expériences mis en œuvre au cours de la thèse.

Et bien sûr, je n'oublie pas que les résultats obtenus sont avant tout le fruit d'un merveilleux travail d'équipe ! Mes plus vifs remerciements vont à Isabelle Fleurot, Marina Aigle et Claire Darrigo, mes trois compagnes de galères, sans qui la fabrication et l'analyse de nos quelques 120 lots de fromages n'auraient pas été possibles. Merci à toi Isabelle pour ton aide indispensable et ton soutien sans faille, inconditionnel et quotidien. Merci à toi Marina pour les sacrifices (et calculs) que tu as faits pour que tout ce travail puisse être réalisé dans le temps qui m'était imparti. Merci pour toute l'énergie que tu y as investie. Et merci à toi Claire, qui nous as rejoint au cours de cette aventure, d'avoir pris le relais avec succès en l'absence de Marina, pour ton implication et l'énergie que tu as mis toi aussi pour que ce travail soit réalisé en temps et en heure. Un énorme merci à toutes les trois pour votre amitié, votre soutien dans les moments difficiles et tous les très bons moments que nous avons passés en dehors mais aussi dans cette fromagerie qui nous a réunies !

La réalisation de ce travail n'aurait pu être possible sans les interventions quasi-quotidiennes de notre « Mc Giver » local, Patrick Régent, qui a sauvé mes manip et/ou fabrications à maintes et maintes reprises (je ne peux même pas compter...) en réparant d'urgence le matériel nécessaire. Un énorme merci à toi Patrick pour ça, mais aussi pour ta bonne humeur et le soutien moral que tu as su m'apporter.

Merci également à mes stagiaires, tout particulièrement, à Chizuko Sakamoto et Stéphanie Miclo, pour leur investissement dans ce travail et le sérieux avec lequel elles l'ont réalisé. Ce fut un plaisir de vous former et de travailler avec vous pendant les quelques mois que vous avez passés à UBLO.

Je remercie bien évidemment tous les membres de UBLO pour leurs petites attentions quotidiennes, leur soutien et les conseils prodigués tout au long de ces trois ans. Plus particulièrement, merci à Caroline et Emilie à qui j'ai donné beaucoup de travail lors de mes nombreuses fabrications fromagères.

Merci également à tous les membres de l'unité HMPA pour leur accueil très chaleureux lors de mes brefs passages, particulièrement à Françoise Dilasser pour sa disponibilité et sa bonne humeur.

Au cours de cette thèse, j'ai aussi passé beaucoup de temps sur la plateforme PICT pour les analyses des ARN. Un grand merci à Claudia Bevilacqua, Samira Makzhami, Emmanuelle Zalachas et Sophie Pollet pour leurs aide et conseils sur le traitement des ARN.

Je tiens également à remercier très sincèrement mes amis d'avoir été à mes côtés au cours de cette thèse, malgré l'éloignement pour certains, de m'avoir écoutée et pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble. Mes plus vifs remerciements vont sans hésiter à Virginie ! Merci à toi pour ton amitié et tes précieux conseils, merci de m'avoir écoutée raconter mes aventures, bonnes ou mauvaises, intéressantes ou non... Merci de m'avoir épaulée au cours des moments difficiles que j'ai traversés au cours de ces trois ans et mais aussi pour tous les très bons moments passés en ta compagnie. Une pensée également à Delphine, Julie, Vanessa, Thibault et Olivier qui, comme moi, se sont lancés dans cette grande aventure qu'est la thèse.

Je remercie du fond du cœur toute ma famille, mes parents, mes frère et sœur et surtout ma mère, qui m'ont entourée de tout leur amour et apporté tout leur soutien au cours de mes études. Merci de m'avoir encouragée et d'avoir toujours été présents pour moi. Sans vous, sans vos encouragements je ne serais pas arrivé là. Et enfin un immense merci à Thibault pour sa patience, son inestimable compréhension, ses encouragements, son aide précieuse et tout son amour.

Ce travail a été effectué dans le cadre du projet ANR06-PNRA029 SEFRO et a reçu le soutien financier de l'ANR. La région Ile-de-France a participé à l'acquisition de la fromagerie expérimentale de niveau de sécurité P2 de l'INRA de Jouy-en-Josas.

ABREVIATIONS

ADN,	Acide DésoxyRiboNucléique
ADNc,	ADN complémentaire
AFSSA,	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ARN,	Acide RiboNucléique
ARNm,	ARN messenger
ARNr,	ARN ribosomal
<i>agr</i> ,	Accessory Gene Regulator
$A_{\lambda nm}$,	Absorbance à une longueur d'onde de λ nm
A_w ,	Activité de l'eau
CNIEL	Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière
DEPC	DiethylenePyrocarbonate
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Ec.</i>	<i>Enterococcus</i>
ELISA,	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
<i>L.</i>	<i>Lactococcus</i>
LCR	Laboratoire communautaire de référence
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>P.</i>	<i>Pediococcus</i>
PCR,	Polymerase Chain Reaction
p/v	poids/volume
RIN,	RNA Integrity Number
rpm	rotation par minute
RT,	Reverse Transcriptase
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SE,	Entérotoxine(s) Staphylococcique(s)
<i>se</i> ,	Gène d'entérotoxine(s) staphylococcique(s)
TIAC,	Toxi-Infections Alimentaires Collectives
ufc,	unité formant colonie
v/v	volume/volume

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	9
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
I – LES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES COLLECTIVES LIEES A LA CONSOMMATION DE FROMAGES CONTAMINES PAR <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ET LEURS ORIGINES	13
1. <i>Généralités sur les TIAC</i>	13
2. <i>Les origines des TIAC par Staphylococcus aureus dans les produits laitiers</i>	15
2.1. Contamination d'origine humaine.....	16
2.2. Contamination d'origine animale	17
2.3. Les conditions de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> et de production d'entérotoxines.....	18
3. <i>Les entérotoxines staphylococciques</i>	19
3.1. Les différentes entérotoxines et leurs caractéristiques	20
3.2. Supports génétiques et système de régulation.....	24
4. <i>Les moyens de détection des entérotoxines dans les produits laitiers</i>	25
4.1. Les différentes techniques de détection des entérotoxines.....	25
4.2. La méthode de référence pour le dosage les entérotoxines dites « classiques » dans les produits laitiers	27
4.3. Méthode de détection des entérotoxines récemment décrites.....	28
<i>Synthèse</i>	28
II – <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ET SON ENVIRONNEMENT	30
1. <i>Staphylococcus aureus et la flore des produits fermentés</i>	30
1.1. Incidence de l'activité acidifiante des micro-organismes.....	30
1.2. Incidence de la production de H ₂ O ₂	32
1.3. Incidence de la production de bactériocine.....	33
1.4. Incidence de la compétition nutritionnelle	33
2. <i>Comportement de Staphylococcus aureus dans les fromages</i>	34
<i>Synthèse</i>	37

III – LA RT-PCR QUANTITATIVE, UN OUTIL POUR MESURER L’EXPRESSION DES GENES	39
1. Outils d’analyse de la qualité des ARN.....	39
1.1. Les méthodes d’extraction d’ARN.....	39
1.2. Pureté chimique des ARN.....	40
1.3. Intégrité des ARN	41
2. Extraction des ARN bactériens à partir d’une matrice fromagère.....	42
2.1. Méthode directe	42
2.2. Méthode indirecte.....	43
3. La RT-PCR quantitative.....	44
3.1. Pourquoi la PCR quantitative ?	44
3.2. Les différentes technologies utilisées pour la PCR quantitative	47
3.3. Comment analyser les résultats de RT-PCR ?.....	49
3.4. Les gènes de référence pour la normalisation de résultats de RT-PCR quantitative	51
Synthèse	53
CONCLUSION DE LA SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE ET INTRODUCTION DU TRAVAIL DE THESE	54
MATERIELS ET METHODES.....	57
I – SOUCHES ET CONDITIONS DE CULTURE.....	57
1. Souches et conditions de stockage	57
2. Conditions de culture	58
2.1. Croissance en lait.....	58
2.2. Préparation pour l’inoculation dans les laits utilisés pour les fabrications fromagères	58
3. Vérification de la présence des gènes des entérotoxines A, B, C et D.....	59
II – FABRICATIONS FROMAGERES	60
1. Fabrications en mini-cuve.....	60
2. Fabrications en cuve automatisée.....	60
2.1. Choix de paramètres technologiques à étudier.....	60
2.2. Plans d’expériences utilisés pour étudier l’effet des paramètres technologiques sélectionnés	61
2.3. Déroulement des fabrications.....	64

3. <i>Analyses des fromages</i>	66
3.1. <i>Analyses physico-chimiques</i>	66
3.2. <i>Analyse microbiologique</i>	66
3.3. <i>Préparation des culots cellulaires en vue de l'extraction des ARN</i>	66
3.4. <i>Dosage des entérotoxines staphylococciques</i>	67
III – TRAITEMENT DE L'ARN	68
1. <i>Extraction des ARN totaux à partir de culots cellulaires</i>	68
2. <i>Elimination de l'ADNg et analyse des échantillons d'ARN</i>	68
3. <i>RT-PCR quantitative</i>	69
3.1. <i>Transcription inverse (RT)</i>	69
3.2. <i>Amorces utilisées pour la PCR quantitative</i>	69
3.3. <i>PCR quantitative</i>	70
4. <i>Analyse des résultats de PCR quantitative</i>	71
RESULTATS ET DISCUSSION	73
I – MISE AU POINT D'UNE BOITE A OUTILS POUR ETUDIER L'EXPRESSION DES GENES DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES AU COURS D'UNE FABRICATION DE FROMAGE	73
1. <i>Contexte et objectifs</i>	73
2. <i>Article 1 : Tool for quantification of staphylococcal enterotoxin gene expression in cheese</i>	74
3. <i>Conclusion</i>	83
II – EXPRESSION DES GENES ET PRODUCTION D'ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES AU COURS DE LA FABRICATION DE FROMAGES A PATE PRESSEE NON CUITE	84
1. <i>Contexte et objectifs</i>	84
2. <i>Article 2 : Staphylococcal enterotoxin gene expression and production during the manufacturing of uncooked semi-hard cheese</i>	85
3. <i>Conclusion</i>	121

III – APPLICATION DE LA METHODE DES SURFACES DE REPONSES POUR MINIMISER LA PRODUCTION D’ENTEROTOXINE STAPHYLOCOCCIQUE PENDANT LA FABRICATION DE FROMAGES A PATE PRESSEE NON CUITE	122
<i>1. Contexte et objectifs.....</i>	122
<i>2. Article 3 : Application of the response surface methodology to minimize staphylococcal enterotoxin production during the manufacturing of uncooked semi- hard cheese</i>	123
<i>3. Conclusion</i>	147
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	149
LISTE DES TABLEAUX	159
LISTE DES FIGURES.....	160
VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE.....	161
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	163
ANNEXES.....	181

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

Staphylococcus aureus est une bactérie pathogène opportuniste responsable d'un large panel d'infections pouvant aller de simples lésions cutanées à de graves septicémies. Les niches écologiques naturelles de cette bactérie sont le nasopharynx et la peau des animaux à sang chaud. A partir de ces sites de portage, *S. aureus* peut coloniser les territoires cutanés, en particulier les zones humides (aisselles, périnée). De plus, cette bactérie, particulièrement résistante, est fréquemment retrouvée dans l'environnement. Son caractère remarquablement flexible lui permet en effet de survivre ou de se développer dans de nombreuses autres niches (surface inanimée, denrées alimentaires...) ce qui facilite sa dissémination. Du fait de ses bonnes capacités d'adaptation et des nombreux facteurs de virulence qu'il produit, *S. aureus* pose de graves problèmes médicaux et sanitaires. En effet, c'est le micro-organisme le plus souvent incriminé dans les infections nosocomiales en France entre 2001 et 2005 avec 16% des signalements (Coignard *et coll.*, 2006). C'est aussi une des causes majeures de mammites (infections de la glande mammaire) dans les élevages laitiers caprins, ovins et bovins. C'est également la seconde cause de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) déclarées entre 1996 et 2005 en France et notamment la première cause de TIAC par les produits laitiers (Delmas *et coll.*, 2006). *S. aureus* est suspecté ou responsable de 68% des cas de TIAC à produits laitiers (Delmas, *et coll.*, 2006). En France, les produits laitiers impliqués dans des cas de TIAC sont, dans la majorité des cas, des fromages au lait cru (De Buyser *et coll.*, 2001).

L'apparition de symptômes chez un individu est due à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques (SE) produites par la bactérie dans l'aliment. Les SE sont des protéines de faible poids moléculaire (~ 30 kDa) ayant une activité superantigène et émétique qui peut provoquer nausées, vomissements, douleurs abdominales et diarrhées (Balaban et Rasooly, 2000; Le Loir *et coll.*, 2003). Parmi la vingtaine d'entérotoxines décrites à l'heure actuelle, on distingue les entérotoxines dites classiques (SEA à SEE) dont l'implication dans des cas de TIAC est reconnue et qui sont dosables par une méthode de référence mis au point à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) (Hennekinne *et coll.*, 2007).

S. aureus est capable de se développer et de produire des toxines dans toutes les grandes familles de fromages ; les fromages au lait cru type pâte pressée non cuite et les fromages au lait cru type pâte molle étant les plus sensibles. Les pratiques au sein d'une même technologie fromagère diffèrent assez largement entre ateliers de production au regard de la préparation des laits, de la température d'emprésurage des laits et de la dose de présure utilisée, de la nature et de la dose de levain utilisé, des cinétiques d'acidification ou encore des traitements mécaniques (modalité de brassage, soutirage, pressage). Ces variations induisent, dans l'environnement externe de *S. aureus*, des différences de température, de pH, d'acides organiques produits ou de peptides disponibles, d'oxygénation, de potentiel redox et d'activité de l'eau susceptibles d'avoir un impact sur sa croissance et la production d'entérotoxines. En général la croissance se produit pendant les 48 – 72 premières heures de la fabrication puis diminue dans le fromage (milieu réducteur, compétition entre micro-organismes). L'activité des entérotoxines produites va par contre pouvoir se maintenir jusqu'au produit final. Les contaminations par *S. aureus* ont donc de graves conséquences socio-économiques : les lots contaminés doivent être détruits, rappelés si déjà commercialisés et les produits responsables de TIAC nuisent à l'image de l'entreprise qui les fabrique.

Depuis le 1^{er} janvier 2006, le nouveau règlement européen sur les critères microbiologiques impose la recherche des staphylocoques à coagulase positive au stade de la fabrication où leur nombre est le plus élevé. A partir de 10⁵ germes de staphylocoques à coagulase positive par gramme de fromage, la recherche des entérotoxines staphylococciques doit être effectuée par les industriels.

Des recherches sont encore nécessaires pour confirmer la pertinence de ce seuil de numération et pour comprendre les interactions entre *S. aureus*, la matrice fromagère, les bactéries lactiques acidifiantes et les mécanismes de production des entérotoxines dans les 72 premières heures de la transformation du lait en fromage.

Le sujet de cette thèse concerne l'analyse et la meilleure compréhension des réponses physiologiques (croissance, production de toxines) de *S. aureus* à des modifications de paramètres technologiques de la fabrication des fromages. Inscrit dans le projet ANR06-PNRA029 « SEFRO », il vise en particulier à identifier des paramètres technologiques clés de la croissance de *S. aureus* ainsi que de l'expression des gènes et de la production d'entérotoxines au cours de la transformation du lait en fromage afin de mieux comprendre les mécanismes conduisant à la présence des entérotoxines dans les caillés au démoulage. Ces résultats devraient contribuer à l'expertise publique dans l'appréciation du risque *S. aureus*

lié à la consommation de produits laitiers, un enjeu très important notamment pour l'établissement des normes.

La première partie de ce mémoire expose l'état des connaissances sur *S. aureus* et son rôle dans les TIAC impliquant les fromages puis sur les facteurs influençant son développement et la production d'entérotoxines et les moyens disponibles pour étudier cette bactérie. Les résultats du travail de thèse sont ensuite présentés sous forme d'articles. Une conclusion générale clôt le mémoire.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I – LES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES COLLECTIVES LIEES A LA CONSOMMATION DE FROMAGES CONTAMINES PAR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ET LEURS ORIGINES

1. Généralités sur les TIAC

Les toxi-infections alimentaires sont soit des intoxications soit des infections qui résultent de la consommation d'aliments contaminés par des toxines produites par des micro-organismes spécifiques ou par la présence de micro-organismes infectieux. Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) doit faire l'objet d'une déclaration obligatoire. Elle est définie par l'apparition d'au moins deux cas groupés d'une symptomatologie similaire, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

Les bactéries sont la principale cause des infections et des intoxications alimentaires. *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia* et *Listeria monocytogenes* sont les principales bactéries responsables d'infections alimentaires liées à la présence de la bactérie dans l'aliment. Les symptômes apparaissent plus de 12 h après l'ingestion de l'aliment contaminé, suite au développement de la bactérie dans l'organisme et, dans certains cas, à la production de toxines. A l'inverse, l'apparition de symptômes suite à une intoxication alimentaire est très rapide (quelques heures) car elle est liée à la consommation de toxines préalablement produites par la bactérie dans l'aliment. Les bactéries responsables sont généralement *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* et *Bacillus cereus*.

Une TIAC est confirmée lorsque la bactérie ou la toxine responsable est isolée d'un aliment responsable ou suspecté. Dans certains cas, l'origine d'une TIAC est seulement suspectée sur les bases des symptômes cliniques (Tableau 1). On estime que moins de 10% des infections alimentaires sont déclarées à la Direction départementale des affaires sanitaires et sociales (Ddass) ou à la Direction départementale des services vétérinaires (DDSV). En France, entre 1996 et 2005, dans 46% des cas de TIAC déclarés, l'agent responsable a été clairement identifié et dans 35% des cas il a été suspecté sur des critères cliniques. Dans les foyers où l'agent était confirmé, *Salmonella* était le plus fréquemment incriminé (64%), suivi

par *S. aureus* (19,4%). Dans les foyers où l'agent n'avait pu être confirmé, *S. aureus* était le plus fréquemment suspecté (35,9%) (Delmas, *et coll.*, 2006).

BACTÉRIES PATHOGÈNES	ALIMENTS INCRIMINÉS	DURÉE D'INCUBATION	TOXICITÉ ET FRÉQUENCE	SYMPTÔMES
<i>Listeria monocytogenes</i> Peut se multiplier dès 1°C. « Avantage » en milieu froid par rapport aux autres bactéries (dès 4°C). Sensible à la chaleur.	Lait, fromages, charcuterie, volailles, produits de la mer (fumés)	1 jour à plusieurs semaines (jusqu'à 2 mois)	En général bénigne. Très grave chez les femmes enceintes, les jeunes enfants, les sujets immunodéprimés. Peu fréquent (200 cas/an). Environ 25-30% de cas mortels.	Très variables en fonction des individus. Passe parfois inaperçu (fausse grippe) avec diarrhées et douleurs abdominales. Séquelles neurologiques possibles en cas de méningite. Très grave chez la femme enceinte, avortements au 2e trimestre de grossesse, accouchements prématurés. Très grave chez les sujets affaiblis ou immunodéprimés, très jeunes enfants. Antibiothérapie très efficace.
<i>Campylobacter</i> (<i>Campylobacter jejuni</i> surtout) Sensible à la chaleur.	Volailles, viandes, crustacés, lait cru, eau dans certains pays	1 à 10 jours (le plus souvent entre 2 à 5 j)	Bénigne, sauf jeunes enfants Fréquent	Douleurs musculaires, migraines, fièvre, diarrhées liquides, douleurs abdominales, nausées. Grave chez le très jeune enfant : risque de septicémie et de méningite.
<i>Escherichia coli</i> Sensible à la chaleur.	Eau dans certains pays, viandes, lait cru	3 à 9 jours	Bénigne Fréquent	Gastro-entérites peu graves, diarrhées abondantes et liquides (<i>tourista</i>).
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 Sensible à la chaleur.	Viandes surtout, cresson, eau, lait cru	3 à 9 jours	Grave Rare (cas signalés au Japon et aux Etats-Unis)	Symptômes peuvent persister plus d'une semaine, diarrhées abondantes et sanglantes, nausées, vomissements, parfois insuffisance rénale, qui peut être mortelle.
Salmonelles (<i>Salmonella enteridis</i> et <i>typhimurium</i>) <i>Salmonella typhimurium</i> DT104 est la plus dangereuse. Sensibles à la chaleur	Viandes, volailles, oeufs, lait cru, fruits de mer	De quelques heures à 4-5 jours (surtout 24 h)	Bénigne, sauf enfants et sujets immunodéprimés Très fréquent	Douleurs abdominales, migraines, frissons, fièvre importante, vomissements, diarrhées, prostration. Les symptômes durent de 2 à 3 jours. Grave chez les sujets immunodéprimés et les jeunes enfants. Complications possibles si passage de la bactérie dans le sang (septicémie). Complications articulaires (arthrite).
Staphylocoque doré (<i>Staphylococcus aureus</i>) Egalement responsable des furoncles et panaris Sensible à la chaleur	Lait, fromages, crèmes glacées, viandes, volailles, charcuterie, poissons, plats cuisinés (plats subissant des manipulations humaines)	1 à 6 heures	Bénigne, sauf nourrissons Fréquent	Nausées, vomissements violents, douleurs abdominales, parfois diarrhées, parfois fièvre. Chez le jeune enfant, risque de déshydratation en raison de la diarrhée.
<i>Clostridium botulinum</i> Responsable du botulisme. Résistant à la chaleur, ses toxines aussi.	Conserves familiales mal stérilisées et charcuteries non traitées aux nitrites	Quelques heures à 8 jours	Très grave (surtout le type A et E) Rare en France	Atteinte du système nerveux : difficulté d'élocution et de déglutition, troubles oculaires, troubles respiratoires, paralysie, coma, mort si non traité. Pourrait être responsable de certains cas de mort subite du nourrisson.
<i>Clostridium perfringens</i> Résistant à la chaleur.	Aliments cuits puis mal protégés, plats cuisinés surtout à base de viande	9 à 24 heures	En général bénignes chez l'adulte. À prendre très au sérieux chez le jeune enfant, surtout le type C. Assez fréquent	Diarrhées, douleurs abdominales, rarement fièvre ou vomissements. Chez le jeune enfant, le type C peut provoquer des nécroses intestinales.
Intoxications par les amines produites par des bactéries (en général non pathogènes) présentes dans l'aliment.	Poissons mal conservés, certains aliments fermentés (vins, fromages)	Quelques minutes à une heure	Peu grave. Sensibilité très variable en fonction des individus. Semblerait relativement fréquent (peu de données chiffrées).	Souvent confondues avec de l'allergie. En fait hypersensibilité aux amines. Manifestations de type allergique : urticaire, migraines, diarrhées, etc.

Tableau 1. Bactéries responsables de cas de TIAC et pathologies associées

D'après Nugon-Baudon et Mollier (Nugon-Baudon et Mollier, 2002)

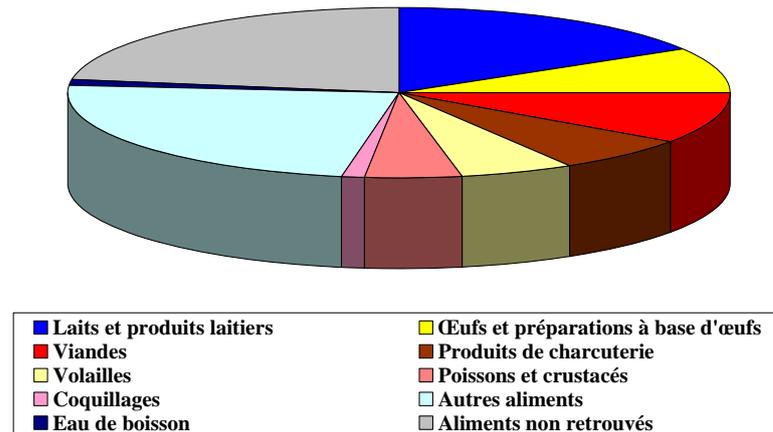


Figure 1. Aliments responsables ou suspectés de TIAC par *Staphylococcus aureus*

D'après Delmas *et coll.* (Delmas, *et coll.*, 2006)

Les aliments responsables ou suspectés de TIAC par *S. aureus* sont principalement les produits laitiers (16,3%), les viandes (9,7%) et les œufs et préparations à base d'œufs (8,6%) (Figure 1). *S. aureus* est responsable ou suspecté dans 68% des cas de TIAC par les produits laitiers (Delmas, *et coll.*, 2006).

2. Les origines des TIAC par *Staphylococcus aureus* dans les produits laitiers

S. aureus, plus couramment appelé staphylocoque doré en raison de la couleur jaune des colonies qu'il forme sur gélose, est une bactérie sphérique à Gram positif, anaérobie facultative, immobile et formant des amas réguliers à la manière de grappe de raisins. Cette espèce fait partie du genre *Staphylococcus* qui peut être divisé en deux groupes : les staphylocoques à coagulase positive et les staphylocoques à coagulase négative. La coagulase produite par les staphylocoques à coagulase positif tels que *S. aureus* est une exoenzyme capable de coaguler le plasma sanguin et constitue un moyen d'identification simple et rapide.

Une intoxication alimentaire due à *S. aureus* est suspectée lorsque des symptômes, tels que nausées, vomissements, crampes abdominales et diarrhée, affectent des individus 1 à 8 h après l'ingestion d'aliments. Ces symptômes sont dus à l'action des entérotoxines que la bactérie peut produire au cours de sa croissance. La présence de *S. aureus* peut être d'origine humaine ou animale.

2.1. Contamination d'origine humaine

S. aureus colonise la peau et les muqueuses de l'homme et de nombreuses espèces animales à sang chaud (Williams, 1963). Bien qu'il existe de nombreux sites de colonisation chez l'homme, le nasopharynx est le site de portage le plus fréquent. Il a en effet été estimé que 27% de la population humaine est porteuse de *S. aureus* dans le nasopharynx (Wertheim *et coll.*, 2005). Les autres sites fréquents de portage sont la peau et le périnée (Wertheim, *et coll.*, 2005). Même si le portage de *S. aureus* augmente le risque de contracter une infection liée à cette bactérie, l'homme ne présente généralement aucun symptôme lié à cette colonisation. De ce fait, au cours de la fabrication/préparation des aliments, une contamination de l'aliment par l'homme est possible si les conditions d'hygiène ne sont pas pleinement contrôlées (port de gants et de masques notamment).

Il a été estimé qu'environ 20% des cas de TIAC impliquent une contamination par une personne infectée par un agent pathogène et ayant manipulé la nourriture (Greig *et coll.*, 2007). Une revue récente de 816 cas de TIAC, répertoriés entre 1927 et 2006 principalement aux Etats-Unis, au Canada, en Europe et en Australie et dans lesquels des personnes ayant manipulé la nourriture ont été impliquées, a recensé les moyens de transmission des pathogènes aux aliments : les voies fécales et orales (mains contaminées après passage aux toilettes, vomissements) de personnes malades, convalescentes ou colonisées sont les plus souvent incriminées ; viennent ensuite les contaminations, essentiellement staphylococciques ou streptococciques, dues aux sécrétions nasales ou orales ainsi que les infections de la peau (Todd *et coll.*, 2008). Ces cas de TIAC ont été provoqués principalement dans des lieux de restauration (restaurant, hôtel...), lors d'événements animés par des traiteurs ou encore à la maison (Todd *et coll.*, 2007a). Mais il arrive aussi que les contaminations aient lieu dans les usines de transformation des aliments (Todd, *et coll.*, 2007a). Les aliments incriminés sont principalement des aliments cuisinés qui, après contamination, ont été stockés dans des conditions inadéquates (rupture de la chaîne du froid par exemple) permettant le développement des agents pathogènes (Todd *et coll.*, 2007b).

Les fromages ne sont pas épargnés par ce type de contamination. Récemment, la caractérisation de 33 souches de *S. aureus* isolées de 31 cas de TIAC recensées entre 1981 et 2002 en France et impliquant aussi bien des aliments cuisinés que des fromages a mis en évidence que 31 de ces souches étaient d'origine humaine (biotype humain) (Kerouanton *et coll.*, 2007), mettant ainsi en cause le personnel ayant manipulé ces aliments. De récents rapports de TIAC au Japon ou au Brésil incriminent le personnel des usines de

conditionnement de lait et de production de lait en poudre ou de fromages dans la contamination (Asao *et coll.*, 2003; Simeão do Carmo *et coll.*, 2002).

Bien que la source de contamination des aliments par un pathogène soit le plus souvent humaine, le lait cru peut aussi être un vecteur de pathogène dans des cas de TIAC impliquant des produits laitiers.

2.2. Contamination d'origine animale

Une des niches écologiques naturelles de *S. aureus* est, comme écrit précédemment, la peau et les muqueuses des animaux à sang chaud. De ce fait, cette bactérie peut coloniser les pis des femelles laitières dans les élevages ovins, caprins ou bovins, et provoquer des infections de la glande mammaire. La mammite est la principale pathologie rencontrée en élevage laitier, elle se manifeste de deux façons :

- la mammite sub-clinique ne présente pas de symptôme visible bien que la composition du lait soit altérée (augmentation du nombre de cellules somatiques) et la production diminuée,
- la mammite clinique présente des symptômes visibles localisés sur la mamelle (inflammation, œdème, gangrène...), des symptômes fonctionnels (modifications de la qualité et de la quantité du lait) et des symptômes plus généraux dans les cas les plus graves (fièvre, anorexie, faiblesse...) (Bergonier et Berthelot, 2003).

Lorsqu'une mammite est détectée, le lait produit par l'animal atteint est écarté du reste de la production pour éviter la contamination de la totalité de la production. Cependant, dans des cas de mammites sub-cliniques ou de conditions d'hygiène défectueuses (contaminations croisées dues au matériel de traite par exemple), il peut arriver que le lait soit contaminé par la bactérie à l'origine de mammites. *S. aureus* est une des causes majeures des mammites bovines, ovines et caprines (Bergonier *et coll.*, 2003; Ster *et coll.*, 2005).

Le lait cru est souvent incriminé dans les cas de TIAC par les produits laitiers, et notamment les fromages au lait cru (De Buyser, *et coll.*, 2001), même si le lien n'est pas toujours simple à établir. Dans des cas de production fermière de fromage au lait cru, Jorgensen *et coll.* ont montré que *S. aureus* était présent partout dans la ferme et qu'il se propageait à partir du lait dans l'environnement, sur les équipements et dans les fromages produits (Jorgensen *et coll.*, 2005b). Dans le cas de fabrication d'aliments à partir de lait cru, la relation entre la souche de *S. aureus* présente dans l'aliment et celle présente dans le lait cru peut être clairement et facilement établie comme c'était le cas lors de la TIAC en Norvège en 2003 impliquant de la purée de pommes de terre préparée avec du lait cru

(Jorgensen *et coll.*, 2005a). Dans le cas de consommation directe de lait cru, il est tout aussi aisé de relier l'intoxication alimentaire au lait qui, par exemple, dans un cas d'intoxication en Suisse en 2008, provenait d'une chèvre atteinte de mammite (Giezendanner *et coll.*, 2009). Dans d'autres cas, comme celui incriminant des laits pasteurisés comme source de TIAC en Autriche en juin 2007 (Schmid *et coll.*, 2009), il est plus difficile de connaître la source de la contamination. En l'occurrence, dans ce cas, il semblerait que la production d'entérotoxines staphylococciques ait eu lieu dans une conduite non réfrigérée connectant l'unité de pasteurisation et le tank de stockage, et que ces entérotoxines se soient ensuite retrouvées dans le lait pasteurisé impliqué dans le cas de TIAC (Schmid, *et coll.*, 2009). Il s'agirait donc ici plutôt d'une contamination résultant de mauvaises conditions d'hygiène (nettoyage) dans l'usine de production, la source initiale de contamination restant difficilement identifiée.

Quelque soit la source de contamination, il apparaît donc que de bonnes conditions d'hygiène, de la traite à la transformation des aliments, permettraient de limiter ou d'éviter le développement de *S. aureus* mais une contamination reste possible quand le lait provient d'animaux souffrant de mammites sub-cliniques ou de porteurs sains. Une fois présente dans l'aliment, cette bactérie est capable de survivre, se développer et produire des toxines dans des conditions extrêmes.

2.3. Les conditions de croissance de *Staphylococcus aureus* et de production d'entérotoxines

S. aureus ne forme pas de spores et peut donc être facilement éliminé par traitement thermique. Cependant, dans les cas de fabrication de produits à partir de lait cru ou de cas de contaminations postérieures au traitement thermique, cette caractéristique ne permet pas de s'affranchir du risque lié à *S. aureus*.

S. aureus est une bactérie anaérobie facultative, mésophile, neutrophile et halophile. Son optimum de croissance se situe donc à une température d'environ 37°C avec un pH compris entre 6 et 7 mais elle est capable de se développer à des températures comprises entre 7 et 48°C et à des pH compris entre 4 et 10 (Charlier *et coll.*, 2009; Genigeorgis *et coll.*, 1971; Genigeorgis et Sadler, 1966). La croissance de *S. aureus* est possible dans des milieux présentant une activité de l'eau (A_w) très faible (0,83), avec un optimum quand l' A_w est supérieure à 0,99 (Bennett, 2001). La bactérie est aussi capable de supporter des concentrations en chlorure de sodium allant jusqu'à 20 % (Charlier, *et coll.*, 2009). Elle est capable de produire des SE à des températures comprises entre 10 et 45°C, avec un pH pouvant être compris entre 4 et 10 et dans un milieu présentant une A_w de 0,84 à plus de 0,99

(Bennett, 2001; Genigeorgis, *et coll.*, 1971; Genigeorgis et Sadler, 1966). La condition aérobie est plus favorable à la croissance ainsi qu'à la production de toxines que la condition anaérobie. Tous ces paramètres interagissent entre eux et toutes les combinaisons de température-pH- A_w -[NaCl]-aération ne permettent pas la croissance de la bactérie ou la production de SE mais ces conditions extrêmes illustrent bien le grand nombre de situations dans lesquelles *S. aureus* est capable de se développer, survivre et produire des toxines (Tableau 2).

Facteur	Croissance de <i>S. aureus</i>		Production d'entérotoxines staphylococciques	
	Extrêmes	Optimum	Extrêmes	Optimum
Température (°C)	7 – 47	37	10 - 45	40
pH	4 – 10	6 - 7	4 - 10	~ 7
A_w	0,83 - > 0,99	> 0,99	0,84 - > 0,99	> 0,99
[NaCl]	0 – 20 %	0 – 4 %		

Tableau 2. Conditions de croissance de *Staphylococcus aureus* et de production d'entérotoxines staphylococciques

Les bonnes capacités d'adaptation évoquées précédemment permettent à *S. aureus* de coloniser la peau et les muqueuses des êtres humains et des animaux. Il a aussi été montré que *S. aureus* était capable de survivre, entre autres, dans la poussière, sur les tissus, sur le verre ou les surfaces vitrées ainsi que sur les sols (Todd *et coll.*, 2009). Et comme en témoignent les nombreux aliments impliqués dans des cas de TIAC par *S. aureus*, la bactérie se développe et produit des toxines entre autres sur les viandes, dans des produits de charcuterie, les préparations à base d'œufs et les produits laitiers (Figure 1).

3. Les entérotoxines staphylococciques

Les entérotoxines staphylococciques font partie de la grande famille des exotoxines pyrogènes staphylococciques et streptococciques. Cette famille de protéines est à l'origine du syndrome de choc toxique et a été impliquée dans des cas d'intoxication alimentaire et de nombreuses maladies auto-immunes ou allergiques. Les SE sont avant tout impliquées dans les toxi-infections alimentaires.

D'autres espèces que *S. aureus* sont capables de produire des SE. Parmi les staphylocoques à coagulase positive, il a été montré que *Staphylococcus intermedius* est capable de produire des SE (Becker *et coll.*, 2001) et a déjà été incriminé dans des cas de TIAC (Khambaty *et coll.*, 1994). Certaines espèces de staphylocoques à coagulase négative sont également capables de produire des SE. C'est par exemple le cas de *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. equorum*, *S. lentus* et *S. capitis*

(Bautista *et coll.*, 1988; Vernozy-Rozand *et coll.*, 1996). Nous résumerons ici les principales caractéristiques des entérotoxines produites par *S. aureus*, qui sont par ailleurs, les plus étudiées.

3.1. Les différentes entérotoxines et leurs caractéristiques

Les entérotoxines staphylococciques sont des protéines solubles à chaîne linéaire de faible masse moléculaire (22,6 à 28,3 kDA, Tableau 3). A ce jour, 24 entérotoxines staphylococciques ont été décrites dans la littérature. Ces différentes entérotoxines ont été désignées par une lettre de l'alphabet dans l'ordre de leur découverte (Tableau 3). Elles ont, dans un premier temps, été identifiées grâce à leurs différentes propriétés antigéniques (SEA à SEJ). Depuis, le développement des techniques de séquençage a accéléré la découverte de nouveaux types d'entérotoxines (SEK à SEV). Ces SE, produites par *S. aureus*, présentent de fortes similarités en terme de structure, de séquences peptidiques et de fonction (Le Loir, *et coll.*, 2003).

Les SE sont, comme les autres exotoxines pyrogènes, des superantigènes du fait de leur capacité à suractiver le système immunitaire. Concrètement, lors d'une réponse immunitaire classique de l'organisme face à un antigène, les lymphocytes T4 reconnaissent, via leur récepteur membranaire, les antigènes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène. Cette reconnaissance permet une haute spécificité de la réponse immunitaire, les lymphocytes T4 étant capable de reconnaître un antigène spécifique. Un superantigène est capable de créer un lien non spécifique entre les cellules présentatrices d'antigène et les lymphocytes T4 ce qui va provoquer l'activation et la prolifération d'un grand nombre de lymphocytes (20%) (Rasooly et Do, 2009). Il en résulte alors une réaction immunitaire exacerbée. Parmi les différentes entérotoxines, l'activité superantigène de SEB a été largement étudiée et SEB est maintenant considérée comme une arme biologique puissante (Greenfield *et coll.*, 2002; Henghold, 2004).

Cependant, les SE étaient, à l'origine, définie comme entérotoxine du fait de leur activité émétique lors de leur ingestion orale et donc de leur implication dans des cas de TIAC. L'activité émétique des entérotoxines n'est pas aussi bien caractérisée que l'activité superantigène (Dinges *et coll.*, 2000). Il a tout de même été montré que ces deux activités étaient dissociées (Dinges, *et coll.*, 2000; Harris *et coll.*, 1993; Hovde *et coll.*, 1994) et que les SE semblent avoir un effet sur les cellules épithéliales de l'intestin (Arbuthnott *et coll.*, 1990; Sugiyama et Hayama, 1965). Les mécanismes moléculaires et cellulaires impliquant

L'activité émétique des SE n'étant pas suffisamment connus, le « meilleur » moyen de vérifier l'activité émétique des SE est de les administrer à des animaux, même si ce type d'études est très coûteux et pose des problèmes éthiques. En 2004, une nouvelle nomenclature concernant les SE a été proposée pour la désignation des nouvelles SE : seules les entérotoxines ayant une activité émétique après administration par voie orale chez le singe seront désignées « SE » (Lina *et coll.*, 2004), les autres seront désignées comme « staphylococcal enterotoxin-like » (SEI). Les entérotoxines dites « classiques », SEA à SEE, ont déjà été impliquées dans des cas de TIAC. L'activité émétique des nouvelles SE décrites a été confirmée pour SEG et SEI (Munson *et coll.*, 1998), pour SEH (Su et Wong, 1995), et pour SER, SES et SET (Ono *et coll.*, 2008). SEL et SEQ ne présentent pas d'activité émétique lors de leur administration par voie orale à des singes (Orwin *et coll.*, 2003; Orwin *et coll.*, 2002) et seront donc désignées SEIL et SEIQ. Les autres entérotoxines décrites, dont l'activité émétique n'a pas été investiguée, seront appelées SEIJ, SEIK, SEIM à SEIP, SEIU et SEIV. SEH a été récemment incriminée dans des cas de TIAC par les produits laitiers (Ikeda *et coll.*, 2005a; Jorgensen, *et coll.*, 2005a). SES et SET ont été découvertes dans une souche ayant été impliquée dans un cas de TIAC au Japon ; SES et SER (toxine également produite par cette souche) sont suspectées d'être les toxines impliquées dans l'infection alimentaire (Ono, *et coll.*, 2008).

Type	Poids moléculaires (kDa)	Activité émétique	Support génétique	Références
A	27 100	Oui	Prophage	(Betley et Mekalanos, 1985; Betley et Mekalanos, 1988; Borst et Betley, 1994)
B	28 336	Oui	Chromosome, plasmide, îlot de pathogénicité	(Altboum <i>et coll.</i> , 1985; Johns et Khan, 1988; Shafer et Iandolo, 1978; Shalita <i>et coll.</i> , 1977; Yarwood <i>et coll.</i> , 2002b)
C1	27 496	Oui	Plasmide	(Altboum, <i>et coll.</i> , 1985; Bohach et Schlievert, 1987)
C2	27 531	Oui		(Bohach et Schlievert, 1989)
C3	27 563	Oui		(Hovde <i>et coll.</i> , 1990)
D	26 360	Oui	Plasmide	(Bayles et Iandolo, 1989)
E	26 425	Oui	Prophage	(Couch <i>et coll.</i> , 1988)
G	27 043	Oui	<i>enterotoxin gene cluster</i> (egc), chromosome	(Jarraud <i>et coll.</i> , 2001; Munson, <i>et coll.</i> , 1998)
H	25 210	Oui	Élément génétique mobile	(Noto et Archer, 2006; Su et Wong, 1995)
I	24 928	Oui	<i>egc</i> , chromosome	(Jarraud, <i>et coll.</i> , 2001; Munson, <i>et coll.</i> , 1998)
J	28 565*	Indéterminé	Plasmide	(Zhang <i>et coll.</i> , 1998)
K	26 000	Indéterminé	Îlot de pathogénicité	(Orwin <i>et coll.</i> , 2001)
L	24 593*	Non	Îlot de pathogénicité	(Fitzgerald <i>et coll.</i> , 2001; Orwin, <i>et coll.</i> , 2003)
M	24 842*	Indéterminé	<i>egc</i> , chromosome	(Jarraud, <i>et coll.</i> , 2001)
N**	26 067*	Indéterminé	<i>egc</i> , chromosome	(Jarraud, <i>et coll.</i> , 2001)
O**	26 777*	Indéterminé	<i>egc</i> , chromosome	(Jarraud, <i>et coll.</i> , 2001)
P		Indéterminé	Prophage	(Kuroda <i>et coll.</i> , 2001; Omoe <i>et coll.</i> , 2005)
Q	25 207	Non	Îlot de pathogénicité	(Diep <i>et coll.</i> , 2006; Orwin, <i>et coll.</i> , 2002; Yarwood, <i>et coll.</i> , 2002b)
R	27 049	Oui	Plasmide	(Omoe <i>et coll.</i> , 2003; Ono, <i>et coll.</i> , 2008)
S	26 217	Oui	Plasmide	(Ono, <i>et coll.</i> , 2008)
T	22 614	Oui	Plasmide	(Ono, <i>et coll.</i> , 2008)
U		Indéterminé	<i>egc</i> , chromosome	(Letertre <i>et coll.</i> , 2003)
U2		Indéterminé	<i>egc</i> , chromosome	(Thomas <i>et coll.</i> , 2006)
V		Indéterminé	<i>egc</i> , chromosome	(Thomas, <i>et coll.</i> , 2006)

* Déterminé par Le Loir *et coll.* (Le Loir, *et coll.*, 2003)

** Nommées SEK et SEL par Jarraud *et coll.* (Jarraud, *et coll.*, 2001), renommées respectivement SEN et SEO dans une note corrective (Anonymous, 2001)

Tableau 3. Caractéristiques des différentes entérotoxines staphylococciques

La quantité d'entérotoxines nécessaire à l'intoxication dépend de la sensibilité d'un individu à ces toxines donc de son poids et de son état de santé général, ainsi que du type de toxines. Le Tableau 4 présente les doses de toxines qui ont induit une réaction émétique chez le singe rhésus (*Macaca mulatta*) ou des cas de TIAC reportés dans la littérature. L'homme est nettement plus sensible que le singe aux entérotoxines : une plus faible quantité d'entérotoxines est impliquée dans les cas de TIAC que la quantité de SE nécessaire pour observer une réaction émétique chez le singe.

Cas	Type d'entérotoxines	Dose ayant induit une réaction émétique	Références
Administration orale à des singes	SEA à SEE	5 à 20 µg/animaux	(Bergdoll, 1979)
Administration orale à des singes	SEH	30 µg/animal	(Su et Wong, 1995)
Administration nasogastrique à des singes	SEG SEI	80 µg/kg 150 µg/kg	(Munson, <i>et coll.</i> , 1998)
Administration intragastrique à des singes	SER SES SET	100 µg/kg (réaction après 5h) 100 µg/kg (réaction après 5h) 100 µg/kg (réaction après 1 à 5 jours)	(Ono, <i>et coll.</i> , 2008)
TIAC par du chocolat au lait, Etats Unis	SEA	94 à 194 ng/portion	(Evenson <i>et coll.</i> , 1988)
TIAC par du lait écrémé en poudre, Japon	SEA	20 à 100 ng/personne	(Asao, <i>et coll.</i> , 2003)
TIAC par une purée préparée avec du lait cru, Norvège	SEH	2,8 µg/portion	(Jorgensen, <i>et coll.</i> , 2005a)

Tableau 4. Doses d'entérotoxines staphylococciques ayant induit une réaction émétique dans des cas de TIAC ou d'essais sur animaux

Les SE sont des protéines très stables, capables de résister à la plupart des enzymes protéolytiques telles que la pepsine. Après ingestion, elles conservent ainsi leurs activités dans le tube digestif. Les SE sont également très thermorésistantes. Un cas récent de TIAC impliquant du lait pasteurisé au Japon en est un bon exemple : SEA, qui était présente dans le lait avant le traitement thermique, a été exposée à une température de 130°C pendant 4 ou 2 secondes et présentait une activité immunologique et biologique intacte au moment de la consommation du lait, induisant un cas important de TIAC (Asao, *et coll.*, 2003). La stabilité semble cependant dépendre d'un certain nombre de facteurs environnementaux. La forme native de SEA produite directement dans un aliment apparaît notamment trois fois plus résistante à la chaleur (120°C pendant 15 min) que la forme purifiée de la protéine (Akhtar *et coll.*, 1996). L'inactivation thermique de SEA est plus rapide lorsque la toxine est dans du lait autoclavé que dans du lait non autoclavé, et dépend donc du milieu dans lequel la toxine est présente (Rasooly et Do, 2009). Le pH, le type de matrice alimentaire, le type d'entérotoxines ainsi que la concentration initiale en protéines dans le milieu semblent aussi jouer un rôle

dans la résistance à la chaleur des SE (Denny *et coll.*, 1971; Schwabe *et coll.*, 1990). Ainsi, il apparaît clairement que les traitements thermiques qui permettent d'éliminer *S. aureus* d'une matrice ne permettent pas l'inactivation des entérotoxines préalablement produites.

3.2. Supports génétiques et système de régulation

Les différentes souches de *S. aureus* productrices d'entérotoxines possèdent soit un soit plusieurs des gènes SE/SEI (*se*). Ces gènes sont localisés soit sur le chromosome soit plus fréquemment sur des éléments génétiques mobiles tels que des prophages (*sea*, *see* et *sep*) (Betley et Mekalanos, 1985; Couch, *et coll.*, 1988; Kuroda, *et coll.*, 2001; Omoe, *et coll.*, 2005), des plasmides (*sec1*, *sed*, *sej*, *ser*, *ses* et *set*) (Altboum, *et coll.*, 1985; Bayles et Iandolo, 1989; Omoe, *et coll.*, 2003; Ono, *et coll.*, 2008; Zhang, *et coll.*, 1998) et des îlots de pathogénicité (*sek*, *sel* et *seq*) (Orwin, *et coll.*, 2003; Yarwood, *et coll.*, 2002b) (Tableau 3). Le gène *ser* est codé par au moins deux plasmides dont un qui code aussi *sed* et *sej* (pIB485) (Omoe, *et coll.*, 2003). Le gène *sec* de la souche de *S. aureus* isolée de mammite bovine (RF122) (*sec*-bovine) est codé sur le même plasmide que *sel* (Fitzgerald, *et coll.*, 2001) alors que le gène *sec1* se trouve sur un prophage (Altboum, *et coll.*, 1985). Le gène *seb* a été trouvé à la fois sur le chromosome, un plasmide et l'îlot de pathogénicité codant aussi pour *seq* et *sek* (Altboum, *et coll.*, 1985; Johns et Khan, 1988; Shafer et Iandolo, 1978; Shalita, *et coll.*, 1977; Yarwood, *et coll.*, 2002b). Le plasmide pF5 qui porte le gène *ser* encode aussi *sej* et les gènes des deux dernières entérotoxines décrites, *ses* et *set* (Omoe, *et coll.*, 2003; Ono, *et coll.*, 2008). Jarraud *et coll.* ont mis en évidence l'existence d'un opéron chromosomique, *egc* (enterotoxin gene cluster), qui code les gènes de nombreuses entérotoxines : *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* et parfois *seu* ou *sev* (Jarraud, *et coll.*, 2001; Letertre, *et coll.*, 2003; Thomas, *et coll.*, 2006).

Les données disponibles sur les systèmes de régulation des entérotoxines staphylococciques concernent essentiellement les SE classiques. Au cours de la croissance de *S. aureus*, la production des entérotoxines B, C et D est maximale en phase stationnaire de croissance (Bayles et Iandolo, 1989; Bergdoll *et coll.*, 1974; McLean *et coll.*, 1968; Otero *et coll.*, 1990) alors que SEA est majoritairement produite au cours de la phase exponentielle de croissance (Borst et Betley, 1994; Czop et Bergdoll, 1974). L'expression des gènes des trois SE produites en phase stationnaire de croissance (SEB, SEC et SED) est contrôlée par le système de régulation principal de la virulence de *S. aureus*, le système *agr* (accessory gene regulator) (Bayles et Iandolo, 1989; Gaskill et Khan, 1988; Regassa *et coll.*, 1991) alors que les gènes codant SEA et SEJ ne le sont pas (Tremaine *et coll.*, 1993; Zhang, *et coll.*, 1998).

Le système *agr* régule l'expression d'un grand nombre de gènes de protéines sécrétées par *S. aureus* (Novick, 2003). L'activation du système est maximale en phase post-exponentielle de croissance car elle est étroitement liée à la densité de population (*quorum sensing*) (Ji *et coll.*, 1995). L'expression des gènes contrôlés par *agr* varie également en fonction des phases de croissance.

4. Les moyens de détection des entérotoxines dans les produits laitiers

Le diagnostic des TIAC à *S. aureus* est généralement confirmé soit uniquement par la détection d'entérotoxines staphylococciques dans les restes de nourriture (lorsque la symptomatologie est caractéristique), soit par la détection de SE et l'isolement de souches de *S. aureus* présentant des caractéristiques similaires chez les personnes malades et dans les restes de nourriture. En pratique, le diagnostic final repose principalement sur la détection de toxines dans l'aliment.

4.1. Les différentes techniques de détection des entérotoxines

La détection des SE dans les aliments est souvent difficile en raison des faibles quantités présentes et de leur nature protéique. Trois méthodes sont généralement utilisées pour détecter les SE dans la nourriture : les techniques biologiques, les techniques immunochimiques et les techniques de biologie moléculaire. Pour doser les SE par des techniques immunochimiques et certaines méthodes biologiques, il est nécessaire au préalable d'extraire et de concentrer les toxines de la matrice alimentaire.

- *Techniques biologiques*

Les techniques biologiques sont basées sur la capacité des aliments à induire des symptômes tels que vomissements ou troubles gastro-intestinaux chez les animaux et/ou leur action superantigénique sur des cultures cellulaires. Historiquement, les SE étaient détectées en administrant des échantillons suspects à des animaux, des singes le plus souvent. Ce type d'essai présente de nombreux désavantages : il soulève des problèmes éthiques liés à l'utilisation d'animaux et c'est un essai coûteux dont la sensibilité n'est pas suffisante, les singes étant moins sensibles aux SE que les humains (cf. **I. 3. 3.1**). L'activité émétique des entérotoxines a été testée sur d'autres animaux que les singes, les musaraignes (Hu *et coll.*, 2003) et les furets (Wright *et coll.*, 2000) par exemple, mais plutôt dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'action des SE. Deux autres méthodes, qui exploitent l'activité

superantigénique de SEA, ont été développées pour détecter SEA (Hawryluk et Hirshfield, 2002; Rasooly et Do, 2009). Elles permettent de détecter SEA à des concentrations très faibles (de l'ordre du picomolaire ou du picogramme/ml) mais pour le moment SEA est la seule entérotoxine pour laquelle ces méthodes sont disponibles.

- *Techniques immunochimiques*

Les techniques immunochimiques sont basées sur l'utilisation d'anticorps spécifiques anti-SE. Des kits commerciaux, utilisant tous ce type de techniques, sont disponibles et permettent de détecter les entérotoxines « classiques », SEA à SED et généralement SEE. Trois de ces kits (Transia Plate SET de Diffchamb S.A., Ridascreen SET de R. Biopharm et TECRA SEVI de Tecra) utilisent la méthode ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). La technique ELISA consiste à utiliser des anticorps spécifiques fixés sur une phase solide et une enzyme (ex : peroxydase) qui va catalyser une réaction libérant un composant coloré dont la concentration peut être mesurée par spectrométrie. Les SE présentes dans l'échantillon analysé vont tout d'abord se lier aux anticorps attachés sur la phase solide. Puis, soit en introduisant des SE conjuguées à l'enzyme qui vont se fixer sur les anticorps « libres » (ELISA compétitif), soit en ajoutant des anticorps couplés à l'enzyme (anticorps secondaires) qui vont se fixer sur les SE de l'échantillon elles-mêmes fixées sur la phase solide (ELISA Sandwich), la concentration en SE va pouvoir être évaluée inversement (ELISA compétitif) ou proportionnellement (ELISA Sandwich) à l'intensité de couleur. Le kit commercial SET RPLA d'Oxoïd utilise la méthode d'agglutination passive reverse de particules de latex (RPLA, Reverse Passive Latex Agglutination). Dans ce cas, les anticorps anti-SE sont fixés sur des particules en latex qui s'agglutinent en présence des entérotoxines. Le cinquième kit commercialisé (VIDAS SET 2 de BioMérieux) utilise la méthode ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) : le principe est le même que pour l'ELISA Sandwich sauf que l'enzyme conjuguée aux anticorps (la phosphatase alcaline dans le VIDAS SET 2) catalyse une réaction dont le produit va pouvoir être quantifié par mesure de la fluorescence.

- *Techniques de biologie moléculaire*

Les méthodes de biologie moléculaire utilisées pour détecter les entérotoxines impliquent souvent une PCR. La PCR permet en effet de rechercher les gènes codant pour des entérotoxines dans des souches de *S. aureus* isolées d'aliments contaminés. L'application de cette méthode nécessite bien entendu que les souches de *S. aureus* soient isolées. Cette technique permet d'indiquer la présence ou l'absence de gènes codant les SE mais elle ne permet pas de savoir si les gènes étaient exprimés au cours de la fabrication des aliments

incriminés. Elle ne permet pas de détecter les toxines elles-mêmes mais seulement de caractériser les souches impliquées dans des cas de TIAC.

- *Autres techniques*

D'autres techniques sont utilisées dans les laboratoires pour détecter et quantifier les SE : le Western blot ou des méthodes biochimiques comme la chromatographie ou la spectrométrie de masse. Le Western blot est difficile à mettre en œuvre dans les aliments, comme la viande ou les produits laitiers, très riches en protéines : une dilution importante est nécessaire pour réduire le bruit de fond ce qui implique une forte diminution de la sensibilité de la méthode. La spectrométrie en masse n'a pour le moment pas été développée pour d'autres SE que SEA (Dupuis *et coll.*, 2008). Une méthode, récemment publiée, utilise l'immuno-PCR quantitative en temps réel pour doser SEA et SEB (Fischer *et coll.*, 2007).

4.2. La méthode de référence pour le dosage les entérotoxines dites « classiques » dans les produits laitiers

En France et en Europe, une méthode de référence officielle pour détecter les SE dans les produits laitiers a été développée et validée au laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et sur les Procédés agro-alimentaires à l'AFSSA, Laboratoire Communautaire de Référence (LCR) pour les staphylocoques à coagulase positive. Elle ne concerne que les entérotoxines SEA à SEE.

Cette méthode de référence comporte, après l'extraction des protéines, une première phase de concentration par dialyse indispensable pour détecter les faibles quantités de toxines présentes dans les aliments (Anonymous, 2006; Hennekinne, *et coll.*, 2007).

Les deux méthodes officielles pour détecter les entérotoxines sont ensuite, au choix, la trousse VIDAS SET 2 commercialisée par BioMérieux ou la trousse Transia Plate SE commercialisée par Diffchamb. Cette dernière nécessite au préalable un traitement de l'extrait protéique par des immunoglobulines de lapin pour éviter des faux positifs possibles en présence dans l'échantillon de la protéine A produite par *S. aureus*. Ces deux kits vont indiquer s'il y a ou non des SE dans l'échantillon analysé.

En cas de résultats positifs, les entérotoxines sont dosées par la méthode de confirmation du LCR (Hennekinne *et coll.*, 2003; Hennekinne, *et coll.*, 2007). C'est une méthode de type ELISA Sandwich. Les entérotoxines sont tout d'abord détectées à l'aide d'anticorps monoclonaux des SE (Lapeyre *et coll.*, 1987) fixés sur une phase solide puis leur présence est révélée par des anticorps polyclonaux de lapins couplés à la peroxydase et quantifiée par colorimétrie.

4.3. Méthode de détection des entérotoxines récemment décrites

Pour les entérotoxines récemment décrites, aucune méthode de détection n'est commercialisée à ce jour mais des méthodes ELISA « maisons » ont été développées pour détecter SEG à SEI (Omoe *et coll.*, 2002; Su et Wong, 1996) ainsi que SES et SET (Ono, *et coll.*, 2008) par exemple. Ces méthodes ont été utilisées dans les aliments pour détecter SEH dans des cas de TIAC au Japon (Ikeda *et coll.*, 2005b) et en Norvège (Jorgensen, *et coll.*, 2005a). Elles ne sont cependant pas systématiquement mises en œuvres dans les cas de TIAC.

Une alternative à ces techniques immunochimiques est la détection des gènes des nouvelles SE dans les souches isolées d'aliments impliqués ou non dans des cas de TIAC (Chiang *et coll.*, 2008; Hwang *et coll.*, 2007; Martin *et coll.*, 2004; McLaughlin *et coll.*, 2000; Omoe, *et coll.*, 2002; Poli *et coll.*, 2007; Rosec et Gigaud, 2002). McLaughlin *et coll.* ont ainsi répertorié 17 souches sur 38 impliquées dans des cas de TIAC qui présentaient les gènes *see*, *seg*, *seh* et *sei* alors qu'elles ne présentaient pas les gènes *sea* à *sed* (McLaughlin, *et coll.*, 2000) ou encore dans une souche isolée d'un aliment impliqué dans un cas de TIAC au Japon, seuls les gènes *sej*, *ser*, *ses* et *set* ont été retrouvés (Omoe, *et coll.*, 2003; Ono, *et coll.*, 2008). Ce type de résultats permet d'incriminer de nombreuses nouvelles SE dans des cas de TIAC. Il faut cependant rester prudent dans l'interprétation des résultats : la présence des gènes et même leur transcription ne sont pas des éléments de preuves suffisants de la production des SE. Enfin, la présence des SE demeure encore difficile à détecter du fait du manque de sensibilité de la très grande majorité des méthodes actuellement disponibles. Omoe *et coll.* ont en effet montré que, bien que les gènes *seg* et *sei* soient transcrits dans certaines souches, les SE correspondantes ne sont pas détectables dans leur milieu de culture (Omoe, *et coll.*, 2002). Il est donc primordial de développer de nouvelles méthodes pour détecter l'ensemble des entérotoxines produites par *S. aureus*.

Synthèse

S. aureus est la première cause de TIAC par les produits laitiers. La contamination de ces aliments peut être aussi bien d'origine humaine que d'origine animale et résulte généralement de la manipulation des produits dans de mauvaises conditions d'hygiène (absence de protection individuelle, non respect de la chaîne du froid, mauvais nettoyage des installations de fabrication...) mais il se peut que la contamination provienne d'un animal souffrant de mammite sub-clinique, difficilement identifiable par l'homme. Quelle qu'en soit

la provenance, la bactérie, une fois présente, est capable de se développer et de produire des SE dans des conditions extrêmes (oxygénation faible, température basse, pH bas, faible activité de l'eau et forte concentration en sel) et bien que la bactérie puisse être aisément éliminée de la matrice, ce n'est pas le cas des SE qui sont des protéines très stables.

De ce fait, afin de limiter les cas de TIAC par les produits laitiers et notamment les fromages, la Commission Européenne impose, depuis 2006 (Anonymous, 2007), la numération des staphylocoques à coagulase positive au stade où leur population est maximale au cours du procédé de fabrication des fromages et, au-delà de 10^5 staphylocoques à coagulase positive par gramme de fromages, la recherche des SE doit être effectuée par les industriels (Anonymous, 2007). Le seuil de 10^5 ufc/g de fromage a été fixé en tenant compte des différentes études du comportement de *S. aureus* dans les fromages. Du fait de l'absence de méthode simple et rapide de détection des SE récemment décrites, ces études ne concernent que les entérotoxines classiques SEA à SED.

II – *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ET SON ENVIRONNEMENT

Du fait de l'impact des TIAC à *S. aureus* sur la santé humaine et sur la sécurité des aliments, la bactérie et les conditions de toxigenèse ont été largement étudiées depuis les années 1960 tant *in vitro* qu'*in situ* mais très peu d'études concernent les SE récemment décrites. Les conditions de production de SEH, étudiées en milieu de culture, sont proches de celles des entérotoxines classiques (Tableau 2) : la production est favorisée par l'aération du milieu et elle est maximale à pH neutre (Su et Wong, 1998). L'aération du milieu, la température, le pH, l'activité de l'eau ainsi que le sel ne sont cependant pas les seuls paramètres à affecter la croissance de *S. aureus* et sa capacité à produire des SE. Dans la revue de Halpin-Dohnalek et Marth, il a été souligné que la teneur en minéraux (magnésium, potassium ou fer), la teneur en protéines (extrait de levure par exemple), la teneur en sucre ainsi que la présence d'autres micro-organismes peuvent avoir une incidence sur la production de toxines (Halpin-Dohnalek et Marth, 1989). Parmi les aliments dans lesquels *S. aureus* est capable de se développer (Figure 1), certains possèdent un écosystème microbien riche en bactéries lactiques, les produits de charcuterie et les produits laitiers notamment. L'effet inhibiteur de ces bactéries lactiques sur *S. aureus* a été abondamment étudié.

1. *Staphylococcus aureus* et la flore des produits fermentés

Les bactéries lactiques isolées de produits alimentaires peuvent agir sur le développement de *S. aureus* du fait de leur capacité à acidifier le milieu, à produire des acides organiques, des bactériocines, du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou encore du fait de compétitions nutritionnelles.

1.1. Incidence de l'activité acidifiante des micro-organismes

Comme indiqué dans le paragraphe I – 2. 2.3, *S. aureus* est capable de croître et de produire des SE à des pH allant de 4 à 10 avec un optimum à un pH proche de la neutralité. L'acidité du milieu (pH < 5) inhibe fortement la croissance de *S. aureus* (Charlier *et coll.*, 2008; Haines et Harmon, 1973a; Tatini *et coll.*, 1971b) et la production de SE (Genigeorgis, *et coll.*, 1971; Genigeorgis et Sadler, 1966). Ce pouvoir inhibiteur dépend cependant de l'acide qui en est la cause : l'acide lactique est ainsi plus inhibiteur que l'acide chlorhydrique (Tatini, *et coll.*, 1971b) et les acides acétique et propionique sont eux-mêmes plus inhibiteurs que l'acide lactique (Charlier, *et coll.*, 2009).

Du fait de leur capacité à produire de l'acide lactique et/ou d'autres acides organiques, les bactéries lactiques peuvent ainsi inhiber fortement le développement de *S. aureus* dans les matrices alimentaires où elles sont utilisées : les produits de salaisons et les fromages. L'effet inhibiteur d'un large panel de bactéries lactiques isolées d'aliments a été évalué (Graves et Frazier, 1963; Haines et Harmon, 1973b; Iandolo *et coll.*, 1965; Kao et Frazier, 1966). Parmi les espèces les plus inhibitrices on trouve, entre autres, *Pediococcus cerevisiae* (renommée *Pediococcus acidilactici*), les lactobacilles des produits carnés et laitiers et *Lactococcus lactis*, utilisé dans les levains de fromagerie.

Dans les produits de salaison, l'addition de *P. acidilactici* et/ou de lactobacilles (*Lb. curvatus*, *Lb. sakei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. paracasei*) en tant que levain permet d'inhiber significativement la croissance de *S. aureus* et la production de toxines grâce à l'acidification du milieu (Barber et Deibel, 1972; Charlier, *et coll.*, 2009; Kaban et Kaya, 2006; Metaxopoulos *et coll.*, 1981; Niskanen et Nurmi, 1976; Sameshima *et coll.*, 1998).

Parmi les micro-organismes présents dans les produits laitiers, l'incidence de l'acidification par *L. lactis* ou encore *Enterococcus faecalis* a été démontrée en lait et en milieu de culture (Alomar *et coll.*, 2008b; Haines et Harmon, 1973b). Plusieurs études de production de fromages modèles ont montré l'importance de la valeur du pH au cours des premières heures de la fabrication sur la croissance de *S. aureus*. Lindqvist *et coll.* ont fait une évaluation quantitative des risques liés à *S. aureus* dans des fromages non affinés fabriqués à partir de lait cru et ont ainsi montré qu'une faible valeur de pH en début de fabrication, donc une acidification rapide, permet de réduire le risque lié à *S. aureus* (Lindqvist *et coll.*, 2002). Cette hypothèse a ensuite été confirmée expérimentalement au cours de fabrications de fromages à pâte pressée non cuite (Cantal, Tome de Savoie, Saint Nectaire et Salers) : la vitesse d'acidification du caillé au cours des 5 à 6 premières heures de la fabrication influence la croissance de *S. aureus*, plus le pH est élevé à ce stade de la fabrication plus la population de *S. aureus* dans le fromage est importante (Delbes *et coll.*, 2006; Lamprell, 2003). Plus récemment, Alomar *et coll.* ont modélisé le comportement de *S. aureus* en lait en co-culture avec *Lactococcus garviae*. Ce modèle a été validé au cours de fabrications de fromages à pâte pressée non cuite et a montré l'importance du contrôle du pH en début de fabrications fromagères (Alomar *et coll.*, 2008a). Tous ces résultats plaident en faveur d'une acidification rapide en début du procédé de fabrication des fromages.

La sensibilité de *S. aureus* au pH peut dépendre d'autres facteurs environnementaux tels que la concentration en sel comme Iandolo *et coll.* l'ont mis en évidence dans un milieu de culture (Iandolo *et coll.*, 1964) ou l'oxygénation du milieu comme Barber *et coll.* l'ont

montré dans des saucisses fermentées (Barber et Deibel, 1972). L'impact sur *S. aureus* des micro-organismes isolés d'aliments dépend aussi des conditions environnementales telles que la température et la proportion de *S. aureus* par rapport aux autres micro-organismes (Alomar, *et coll.*, 2008a; Haines et Harmon, 1973b; Kao et Frazier, 1966). Par exemple, plus la température et le ratio de *S. aureus* / aux espèces inhibitrices sont bas, plus l'effet inhibiteur de *P. acidilactici* et *L. lactis* sur la croissance et la toxigenèse de *S. aureus* est important (Haines et Harmon, 1973b).

Cependant, d'autres études ont montré que certaines espèces/souches conservent leur activité inhibitrice même lorsque le pH du milieu est maintenu à une valeur constante (milieu tamponné). C'est le cas notamment de *L. garviae* (Alomar, *et coll.*, 2008b) et de *L. lactis* (Charlier, *et coll.*, 2008; Even *et coll.*, 2009). Haines *et coll.* ont aussi montré que la production d'acide lactique n'avait un effet inhibiteur sur la croissance de *S. aureus* qu'en début de co-culture avec *P. acidilactici* et *L. lactis* et que la production de H₂O₂ par *P. acidilactici* et *L. lactis* ainsi que la compétition nutritionnelle pour la niacine et la biotine jouaient aussi un rôle dans l'inhibition de la croissance de *S. aureus* (Haines et Harmon, 1973a).

1.2. Incidence de la production de H₂O₂

La production de peroxyde d'hydrogène par les bactéries lactiques, particulièrement par les lactobacilles, ralentit le développement de *S. aureus*. Son rôle dans l'inhibition de *S. aureus* a été très étudié chez les lactobacilles de l'écosystème vaginal (Charlier, *et coll.*, 2009) mais beaucoup moins chez les micro-organismes des produits alimentaires.

Les bactéries lactiques des produits laitiers, telles que *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*, *Lb. lactis* ou encore *L. lactis*, sont capables de produire H₂O₂ (Batdorj *et coll.*, 2007; Collins et Aramaki, 1980; Gilliland et Ewell, 1983; Ito *et coll.*, 2003) et ainsi d'inhiber la croissance de certains pathogènes alimentaires comme *Listeria* ou *E. coli* (Batdorj, *et coll.*, 2007; Ito, *et coll.*, 2003). L'effet antagoniste de la production de H₂O₂ sur *S. aureus* a été reporté par Haines *et coll.* chez *P. acidilactici* et *L. lactis* (Haines et Harmon, 1973a) et par Dahiya *et coll.* chez *Lb. bulgaricus* et *Lb. lactis* (Dahiya et Speck, 1968). Plus récemment, Ito *et coll.* ont testé la capacité de bactéries lactiques isolées de produits alimentaires à produire H₂O₂. Ils ont montré que les souches de *L. lactis* sont parmi les plus productrices de H₂O₂ mais que leurs surnageants de culture filtrés de ces souches ne présentent qu'un très faible effet inhibiteur sur la croissance de *S. aureus* (Ito, *et coll.*, 2003).

1.3. Incidence de la production de bactériocine

La production de bactériocine par les bactéries lactiques présentes dans les produits alimentaires peut aussi être impliquée dans l'effet inhibiteur de celles-ci sur la croissance de *S. aureus*. Les bactériocines sont des peptides ou protéines synthétisés naturellement par certaines bactéries. Leurs propriétés permettent d'éliminer certains micro-organismes ou de ralentir leur croissance. Ces molécules ont donc un intérêt potentiel dans la préservation naturelle des aliments et elles constituent notamment une alternative à l'utilisation de conservateurs chimiques ou encore au traitement thermique des matières premières (Galvez *et coll.*, 2007). La plus étudiée est la nisine produite par *L. lactis* et efficace contre *S. aureus*. A ce jour, elle est couramment utilisée comme conservateur dans un large panel d'aliments dans une cinquantaine de pays (Delves-Broughton *et coll.*, 1996). Elle est notamment mise en œuvre dans la fabrication des fromages fondus (Delves-Broughton, *et coll.*, 1996; Zottola *et coll.*, 1994) ou de desserts lactés tels que le Cuajada (Arques *et coll.*, 2008).

Plusieurs études ont permis de caractériser les bactériocines produites par des bactéries lactiques des produits de salaison et leurs effets sur *S. aureus* (Ammor *et coll.*, 2006a; Ammor *et coll.*, 2006b; Mataragas *et coll.*, 2002; Sobrino *et coll.*, 1991; Sudirman *et coll.*, 1993; Vignolo *et coll.*, 1993).

Dans les fromages, l'utilisation de bactéries lactiques productrices de bactériocines efficaces contre *S. aureus* a été peu rapportée. Au cours de la fabrication d'un fromage italien, le Montasio, une bactériocine produite par *Lb. plantarum* a réduit de manière significative la population de *S. aureus* après 10 jours de stockage (Stecchini *et coll.*, 1991). Une souche de *L. lactis*, productrice de nisine, a permis d'éliminer *S. aureus* dans des fromages frais marocains (Jben) lorsque la population initiale de *S. aureus* était de 10^3 ufc/ml (Hamama *et coll.*, 2002). Combinées à un traitement à haute pression du lait, les bactériocines produites par différentes souches de *L. lactis*, *Ec. faecium* et *Ec. faecalis* (nisine, lacticine, entérocin ou bactériocine non caractérisée) permettent d'inhiber la croissance de *S. aureus* au cours de fabrication de fromages au lait cru (Arques *et coll.*, 2005).

1.4. Incidence de la compétition nutritionnelle

Dans la revue de Charlier *et coll.*, les nutriments indispensables ou permettant la croissance de *S. aureus* ont été répertoriés. La croissance de *S. aureus* nécessite une source d'énergie organique complexe telle que les sucres (fructose, glucose, galactose, mannose,

ribose, maltose, sucrose, trehalose), les alcools (mannitol), les acides organiques (acide acétique) et, dans certaines conditions, les acides aminés (glutamine, arginine) (Charlier, *et coll.*, 2009). Parmi 80 souches de *S. aureus* de différentes origines, quatre acides aminés (arginine, cystéine, proline et valine) sont presque toujours indispensables à la croissance de la bactérie alors que d'autres (alanine, aspartate, histidine, isoleucine, lysine, sérine, thréonine et tryptophane) sont rarement nécessaires (Charlier, *et coll.*, 2009). L'arginine et la valine sont aussi indispensables à la production d'entérotoxines (Onoue et Mori, 1997).

La consommation des nutriments essentiels à la croissance de *S. aureus* et à la production de SE par d'autres micro-organismes apparaît donc, au même titre que la production d'acides organiques, de H₂O₂ ou de bactériocines, comme un facteur important dans l'inhibition de la croissance et de la toxinogénèse de *S. aureus* par les bactéries lactiques des produits fermentés. Dans des co-cultures avec *P. acidilactici* et *L. lactis*, la compétition pour des vitamines telles que la biotine, la niacine ou la nicotinamide, le glucose ou d'autres nutriments non identifiés, est impliquée dans le mécanisme d'inhibition de *S. aureus* (Charlier, *et coll.*, 2008; Even, *et coll.*, 2009; Haines et Harmon, 1973a; Iandolo, *et coll.*, 1965; Nouaille *et coll.*, 2009).

Malgré l'effet antagoniste des bactéries lactiques présentes dans les fromages sur le développement de *S. aureus*, cette bactérie demeure responsable d'un grand nombre de cas de TIAC par ce type d'aliment. De nombreuses études décrivent le comportement de *S. aureus* dans les fromages et les conditions de la toxinogénèse.

2. Comportement de Staphylococcus aureus dans les fromages

Comme le montre le Tableau 5, *S. aureus* est capable de se développer et de produire des SE dans la plupart des grandes familles de fromages, y compris dans les fromages à pâte pressée cuite, même si pour ces derniers, les cas sont plutôt rares du fait de la cuisson des grains de caillé en cuve de fabrication, qui élimine généralement *S. aureus* du produit. Les fromages à pâte pressée non cuite et à pâte molle sont les plus sensibles au risque lié à *S. aureus* (De Buyser, *et coll.*, 2001; Meyrand et Vernozzy-Rozand, 1999).

Type de technologie	Fromage	Croissance de <i>S. aureus</i>	Présence d'entérotoxines	Références
Pâte fraîche	Cottage	Elimination de <i>S. aureus</i> quand chauffage important	Non déterminée	(Tuckey <i>et coll.</i> , 1964)
	Jben	Croissance au cours des premières 24h de la fabrication	SEA détectée dans les laits inoculés avec 10^5 <i>S. aureus</i> /ml - Non détectée avec 10^3 <i>S. aureus</i> /ml	(Hamama, <i>et coll.</i> , 2002)
	Au lait de brebis	Croissance jusqu'à 10^8 ufc/g avec un inoculum de 10^3 ou 10^5 ufc/ml	Non détectée	(Otero <i>et coll.</i> , 1988)
	Autre	Faible	Non détectée	(Aoyama <i>et coll.</i> , 2008)
Caillé en saumure	Feta	Croissance jusqu'à la mise en saumure et diminution de la population en cours du stockage	Non déterminée	(Erkmen, 1995)
Pâte filée	Mozarella	Croissance (4 générations)	Non détectée	(Tatini <i>et coll.</i> , 1973)
Pâte molle	Camembert au lait de chèvre à coagulation lactique	Croissance rapide jusqu'au salage	SEA détectée et quantifiée dans les laits inoculés avec 10^5 ou 10^6 ufc/ml - Non quantifiable avec 10^4 ufc/ml	(Meyrand <i>et coll.</i> , 1999; Vernozy-Rozand <i>et coll.</i> , 1998)
	Camembert au lait de chèvre à coagulation présure	Croissance rapide jusqu'au salage	SEA détectée et quantifiée dans les laits inoculés avec 10^4 , 10^5 ou 10^6 ufc/ml	(Meyrand, <i>et coll.</i> , 1999)
	Camembert au lait de chèvre	Croissance au cours des premières 24 h	SEA détectée dans les laits inoculés avec un 10^3 , 10^4 , 10^5 ou 10^6 ufc/ml - non détectée avec 10^2 ufc/ml	(Meyrand <i>et coll.</i> , 1998)
	Autre	Faible croissance	Non détectée	(Aoyama, <i>et coll.</i> , 2008)
Pâte pressée non cuite	Manchego	Croissance rapide au cours de la fabrication puis diminution de la population en cours d'affinage	SEA et SED détectée mais pas SEB ou SEC alors que la population de souches productrices de SEB ou SEC était supérieure à 10^7 ufc/g	(Gaya <i>et coll.</i> , 1988; Gomez-Lucia <i>et coll.</i> , 1992; Nunez <i>et coll.</i> , 1988; Otero <i>et coll.</i> , 1993)
	Cantal, Tome de Savoie, Reblochon	Croissance en début de fabrication – population maximale 4 h après le moulage, 1 ou 4 jours après l'ensemencement selon les technologies – Population > 10^4 ufc/g avec un inoculum de 10^2 ou 10^3 ufc/ml	SEA et SED détectées en faible quantité dans les reblochons uniquement	(Lamprell, 2003)
		Croissance en début de fabrication	Non déterminée	(Arques, <i>et coll.</i> , 2005)
	Autre	Croissance au cours des premières 48 h de la fabrication	Détectée dans les fromages âgés de 48 h, dans une des conditions : pH initial haut (6,8) et concentration en <i>L. graviae</i> de 7,5 log ₁₀ ufc/ml	(Alomar, <i>et coll.</i> , 2008a)
	Faible croissance	Non détectée	(Aoyama, <i>et coll.</i> , 2008)	
Pâte pressée non cuite type Cheddar	Brick	Croissance rapide au cours des premières 24 h de la fabrication – accélérée si défaut d'acidification du levain	Production de SEA – accélérée si défaut d'acidification du levain	(Cords et Tatini, 1973; Tatini <i>et coll.</i> , 1971a; Tatini, <i>et coll.</i> , 1973; Tuckey, <i>et coll.</i> , 1964)
	Cheddar Colby			
Pâte pressée cuite	Montasio	Croissance au cours de la fabrication	Non détectée malgré une population supérieure à 10^7 ufc/g	(Stecchini, <i>et coll.</i> , 1991)
	Fromage suisse	Croissance pendant les premières 24 h de la fabrication	SEA détectée	(Tatini, <i>et coll.</i> , 1973)

Tableau 5. Résultats d'études du comportement de *Staphylococcus aureus* au cours de fabrication fromagères expérimentales

Les études rapportées dans le Tableau 5 concernent des fabrications de fromages réalisées avec du lait artificiellement contaminé par des souches de *S. aureus* productrices de SE. Quelques études se sont intéressées à la fabrication de fromages naturellement contaminés (fromage au lait cru de vaches) (Delbes, *et coll.*, 2006) ou à l'analyse de la fabrication de fromages type Cheddar après leur implication dans des cas de TIAC (Zehren et Zehren, 1968). Cette dernière étude a mis en évidence que les lots de Cheddar contenant des SE provenaient de cuves dans lesquelles l'acidification avait été anormale (Zehren et Zehren, 1968). Tatini *et coll.* ont eux aussi rapporté une augmentation de la population de *S. aureus* et de la quantité de SE dans des fromages fabriqués avec des levains dont l'activité était défaillante (Tatini, *et coll.*, 1971a). Delbes *et coll.* ont montré l'importance du pH dans le développement de la population de *S. aureus* naturellement présente dans le lait cru utilisé pour la fabrication de Saint Nectaire (fermiers ou modèles) et de Salers fermiers et ont conclu que le pH 6 heures après emprésurage devrait être contrôlé de manière à atteindre une valeur proche ou inférieure à 5,8 dans le Saint Nectaire et 6,3 dans le Salers pour limiter la croissance de *S. aureus* (Delbes, *et coll.*, 2006). D'autres études ont fait varier la concentration des bactéries lactiques du levain pour montrer qu'une concentration élevée inhibe la croissance de *S. aureus* dans les fromages à pâte pressée non cuite type Manchego (Gaya, *et coll.*, 1988; Otero, *et coll.*, 1993). Meyrand *et coll.* ont comparé la production d'entérotoxines dans des fromages à pâte molle type Camembert préparés soit par coagulation présure soit par coagulation lactique et mesuré une production moindre d'entérotoxines dans les fromages à coagulation lactique comparés aux fromages à coagulation présure (Meyrand, *et coll.*, 1999) suggérant une inhibition de *S. aureus* par les bactéries lactiques mises en œuvre pour la coagulation du lait. Tous ces résultats confirment l'incidence des bactéries lactiques utilisées dans les levains fromagers sur le développement de *S. aureus* évoquée dans le § II – 1.

Dans les fromages, la population de *S. aureus* croît pendant les premiers jours de leur fabrication puis elle diminue au cours de l'affinage ou du stockage (Tableau 5). Cependant, bien que la population de *S. aureus* atteigne souvent le seuil de 10^5 *S. aureus* / g de fromage fixé par la législation européenne (Anonymous, 2007), les SE ne sont pas toujours détectées dans les fromages (Tableau 5). Parmi les SE détectables par des méthodes commercialisées, les entérotoxines A et D sont les plus souvent détectées dans des fromages impliqués dans des cas de TIAC, alors que SEB et SEC le sont plus rarement. Les études sur *S. aureus* en fabrication fromagère confirment pour la plupart cette observation. On remarque en effet que même avec des populations de souches productrices de SEA, SEB, SEC et/ou SED atteignant

plus de 10^6 ufc/g de fromages, SEB et SEC ne sont pas produites en quantité détectable (Gomez-Lucia, *et coll.*, 1992; Meyrand, *et coll.*, 1998; Nunez, *et coll.*, 1988; Otero, *et coll.*, 1988; Otero, *et coll.*, 1993) alors que SEA et SED le sont dans des fromages où la population de *S. aureus* n'atteint pas toujours 10^6 ufc/g (Cords et Tatini, 1973; Gomez-Lucia, *et coll.*, 1992; Lamprell, 2003; Meyrand, *et coll.*, 1998; Meyrand, *et coll.*, 1999; Tatini, *et coll.*, 1971a; Tatini, *et coll.*, 1973; Vernozy-Rozand, *et coll.*, 1998). Le travail de Hamama *et coll.* fait exception à ces observations puisque SEC a été détectée dans des fromages frais Jben (Hamama, *et coll.*, 2002).

Certains fromages apparaissent plus favorables à la croissance et à la toxinogénèse de *S. aureus*. Au cours de ces travaux, Lamprell a ainsi montré qu'une souche de *S. aureus* inoculée dans les mêmes conditions dans des laits utilisés pour fabriquer soit du Cantal, soit du Reblochon, soit de la Tome de Savoie ne produisait des quantités détectables de SEA et de SED que dans le Reblochon (Lamprell, 2003). La croissance et la toxinogénèse de *S. aureus* varient donc en fonction de la technologie utilisée, notamment de la cinétique d'acidification. Elles sont aussi fonction du type d'isolat de *S. aureus* (Lamprell, 2003). D'autres études en fabrication fromagère ont démontré que la croissance de *S. aureus* était accélérée par une élévation de la température du lait en cuve ou de la température d'affinage (Alomar, *et coll.*, 2008a; Gaya, *et coll.*, 1988), des pH élevés (proche de 6) dans les premières heures de la fabrication (Alomar, *et coll.*, 2008a; Delbes, *et coll.*, 2006; Lindqvist, *et coll.*, 2002; Tatini, *et coll.*, 1971a; Zehren et Zehren, 1968), une faible quantité de levain (Alomar, *et coll.*, 2008a; Gaya, *et coll.*, 1988; Meyrand, *et coll.*, 1999; Otero, *et coll.*, 1993). La croissance de *S. aureus* est aussi fonction du type de levain utilisé (producteur de bactériocine ou de H_2O_2 , compétiteur pour des éléments nutritifs indispensables) (§ II – 1.). Tous ces paramètres variant d'une technologie à l'autre, le comportement de *S. aureus* est différent d'une technologie à l'autre.

Synthèse

Le fromage est un milieu complexe constitué principalement d'eau, de protéines coagulées et de matières grasses du lait dans lequel, entre autres, le pH, l'activité de l'eau, le potentiel d'oxydoréduction, la teneur en sel et l'activité des micro-organismes présents dans les levains utilisés constituent une forme de protection contre les pathogènes. Des agents et facteurs technologiques tels que la présure, les levains d'acidification ou d'affinage, les opérations mécaniques et physiques, les températures de fabrication et les conditions

d'affinage peuvent aussi influencer la croissance de *S. aureus* et la production de SE. Certaines technologies fromagères sont ainsi plus favorables au développement de *S. aureus*.

S. aureus semble capable d'atteindre une population de plus de 10^5 ufc/g dans toutes les grandes familles de fromages à partir d'une contamination initiale faible (10^2 - 10^3 ufc/ml). Malgré ce niveau observé de population, la détection d'entérotoxines dans les fromages n'est pas systématique.

Afin de mieux comprendre la présence ou non des SE actuellement quantifiables dans les fromages, il apparaît nécessaire d'étudier leur production au cours des étapes de la transformation du lait en fromage en s'intéressant notamment à l'expression de leurs gènes et ce en fonction de facteurs génétiques (biotypes, régulation) ou technologiques (paramètres de fabrication) identifiés ou contrôlés.

L'expression des gènes de SE (*se*) a été peu étudiée. Récemment, Lee *et coll.* ont comparé l'expression des *se* dans différents isolats de *S. aureus* et ont montré que le niveau d'expression de ces gènes dépend de la souche et du type d'entérotoxines (Lee *et coll.*, 2007). Une autre étude a mis en évidence, en utilisant des puces à ADN et en confirmant les résultats obtenus par RT-PCR quantitative, une incidence différente de *L. lactis* sur l'expression des *se* lors de co-culture de *S. aureus* et de *L. lactis* en milieu chimiquement défini à pH régulé à 6,6 et en modèle fromager préparé à partir de lait microfiltré, concentré par ultrafiltration, emprésuré à 30°C, acidifié par *L. lactis* et affiné 7 jours à 30°C (Cretenet *et coll.*, 2009; Even, *et coll.*, 2009). C'est, à ce jour, la seule étude de l'expression des *se in situ*.

III – LA RT-PCR QUANTITATIVE, UN OUTIL POUR MESURER L'EXPRESSION DES GENES

Le séquençage du génome complet de nombreuses espèces bactériennes permet maintenant d'envisager plus globalement l'étude du fonctionnement de ces espèces en étudiant leur génome, leur transcriptome et/ou leur protéome. L'étude du transcriptome complet ou partiel nécessite l'utilisation de puces à ADN qui permettent d'évaluer le niveau de transcription de l'ensemble des gènes étudiés d'un organisme grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques qui couvrent tout ou partie du génome. Cette approche est intéressante pour comparer le niveau d'expression de l'ensemble des gènes d'un organisme dans un nombre limité de conditions. Pour étudier l'expression d'un nombre limité de gènes dans un grand nombre de conditions, il est plus approprié d'utiliser la RT-PCR quantitative (VanGuilder *et coll.*, 2008). Cette technique permet de mesurer le niveau d'expression d'un ou plusieurs gènes d'intérêt grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques pour ces gènes dans l'organisme étudié. Etant plus sensible que les puces à ADN, la RT-PCR quantitative est couramment utilisée pour valider les résultats obtenus en utilisant des puces à ADN (Dallas *et coll.*, 2005; Provenzano et Mocellin, 2007). De multiples contrôles sont nécessaires pour assurer l'intégrité de chaque étape de l'analyse d'expression des gènes (Nolan *et coll.*, 2006) et donc pour obtenir des résultats fiables et précis. Le processus pour analyser l'expression des gènes inclut différentes étapes dont l'extraction d'ARN, les mesures d'efficacité de la RT et des étapes de PCR, la quantité d'ARN introduit.

1. Outils d'analyse de la qualité des ARN

La première étape d'une étude transcriptomique ou transcriptionnelle est l'extraction et la purification des ARN. Les analyses par puces à ADN ou par RT-PCR quantitative nécessitent des ARN de bonne qualité, exempts notamment de tout inhibiteur pour les réactions enzymatiques ultérieures et non dégradés.

1.1. Les méthodes d'extraction d'ARN

Les méthodes classiques d'extraction d'ARN microbien consistent généralement à casser les cellules mécaniquement puis à purifier les ARN en utilisant soit des colonnes d'affinité soit des produits organiques.

Les colonnes combinent l'utilisation d'agents chaotropiques qui permettent de rompre les structures moléculaires et l'utilisation de membranes de silice sur lesquelles les ARN se fixent en présence de forte concentration en sels chaotropiques. Après plusieurs lavages de la membrane, les ARN sont élués en diminuant la concentration en sels.

Parmi les produits organiques, le phénol, généralement associé au chloroforme et parfois à l'alcool isoamylique ou à des agents chaotropiques, permet d'isoler les ARN des autres composants cellulaires (protéines, débris cellulaires) et d'une partie de l'ADN : après centrifugation, les ARN se retrouvent dans la phase aqueuse et l'ADN, les protéines et autres débris cellulaires dans la phase organique ou à l'interface des deux phases. Après extraction, les ARN sont généralement précipités à l'isopropanol et lavés à l'éthanol avant d'être repris dans de l'eau traitée contre les RNases.

Ces deux méthodes d'extractions présentent des avantages et des inconvénients résumés dans le Tableau 6.

Méthode de purification des ARN	Purification sur colonne d'affinité	Purification organique
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Facile et rapide à mettre en œuvre - Absence de produits organiques 	<ul style="list-style-type: none"> - Efficace quelque soit la taille de l'échantillon - Coût faible - Meilleur rendement
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Efficace sur une taille donnée d'échantillon (pour les bactéries généralement 10^9 ufc) - Coût élevé - Rendement faible 	<ul style="list-style-type: none"> - Mise en œuvre lourde - Utilisation de produits organiques

Tableau 6. Avantages et inconvénients des méthodes classiques d'extraction d'ARN

1.2. Pureté chimique des ARN

La vérification de la pureté des ARN est importante notamment après une extraction impliquant des produits organiques. Cette pureté peut être évaluée par mesure de l'absorbance des échantillons en spectrométrie. L'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm (A_{260nm}) représente la concentration en acides nucléiques, l' A_{280nm} la concentration en protéines et l' A_{230nm} la concentration en composés organiques. La mesure des rapports A_{260nm}/A_{280nm} et A_{260nm}/A_{230nm} permet d'estimer respectivement la contamination protéique et la contamination en composés organiques de l'échantillon analysé (Manchester, 1996).

Des ARN correctement extraits et purifiés doivent avoir ces deux ratios compris entre 1,8 et 2. Un ratio inférieur à 1,8 indique la présence de contaminants (Imbeaud *et coll.*, 2005). Imbeaud *et coll.* ont cependant montré que des échantillons d'ARN contaminés par des produits organiques ($A_{260nm}/A_{230nm} < 1,8$) ne présentaient pas d'inhibition au cours des étapes d'analyse du transcriptome comme la synthèse d'ADNc (RT) (Imbeaud, *et coll.*, 2005).

1.3. Intégrité des ARN

L'intégrité des ARN est en revanche essentielle pour obtenir des résultats fiables sur des puces à ADN ou par RT-PCR quantitative. Ces deux méthodes permettent de mesurer la quantité de transcrits ou ARN messagers (ARNm) soit de l'ensemble soit d'une partie des gènes. Par les méthodes d'extraction décrites ci-dessus (§ III – 1. 1.1), on obtient les ARN totaux (ARNt) des cellules. Les ARNm ne représentent que 1 à 5% de l'ARNt. Pour vérifier l'intégrité des ARN, on évalue le taux de dégradation des ARN ribosomaux (ARNr), composants majeurs de l'ARNt.

Ce taux de dégradation peut être observé par analyse, après électrophorèse sur gel d'agarose, des 2 bandes correspondants aux ARNr 23S et 16S pour les procaryotes ou aux ARNr 28S et 18S pour les eucaryotes. La netteté et l'intensité de ces deux bandes reflètent le taux de dégradation de l'échantillon analysé : plus les bandes sont nettes (absence de traînée sur le gel) moins l'ARN est dégradé et le rapport d'intensité des deux bandes est un moyen de quantifier le niveau d'intégrité des ARN.

Grâce à la miniaturisation des techniques, des électrophorèses sur puces (technologie « Lab on Chip », Figure 2) sont maintenant réalisables pour évaluer l'intégrité des ARN. Elles utilisent une faible quantité de matériel et les résultats de l'électrophorèse sont analysés sur ordinateur. L'échantillon d'ARN est déposé dans un puits de la puce et migre à travers des micro-canaux (étape 1, Figure 2) avant d'être injecté dans le canal de séparation (étape 2, Figure 2). Les différents composants de l'échantillon d'ARN sont finalement séparés par électrophorèse (étape 3, Figure 2), détectés en fluorescence à l'aide de marqueur de fluorescence (étape 4, Figure 2) et représentés sous forme d'image de gel d'électrophorèse et d'électrophorégramme (Figure 3).

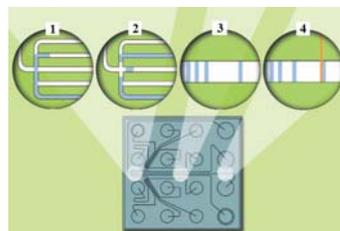


Figure 2. Principe de la technologie « Lab on Chip »

D'après la brochure du BioAnalyzer 2100 d'Agilent

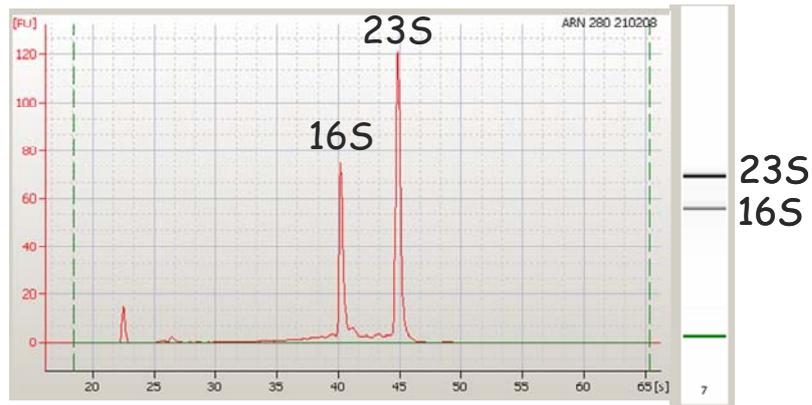


Figure 3. Electrophorégramme et image du gel d'électrophorèse associé

A partir de cet électrophorégramme, le logiciel associé à la technologie « Lab on Chip » calcule le RNA Integrity Number (RIN) (Schroeder *et coll.*, 2006). Le RIN est un nombre compris entre 0 et 10, où 10 correspond à un ARN non dégradé. Il est fortement recommandé que les échantillons d'ARN présentent un RIN supérieur à 8 pour des études transcriptomiques par puces à ADN ou transcriptionnelles par RT-PCR quantitative (Fleige et Pfaffl, 2006).

2. Extraction des ARN bactériens à partir d'une matrice fromagère

Parallèlement à l'essor des études transcriptomiques pour l'analyse des mécanismes de fonctionnement des micro-organismes, diverses méthodes ont été développées pour extraire les ARN microbiens de matrices complexes comme les fromages. Une attention particulière a été portée à la qualité des ARN obtenus et à la rapidité de l'extraction. Dans les cellules, le niveau d'expression des gènes peut varier très rapidement du fait des différents stress appliqués aux cellules. En conséquence, il est essentiel de mettre au point des protocoles rapides pour extraire les ARN de la matrice fromagère et de stopper ou ralentir l'activité des cellules en travaillant à basse température. Deux approches ont été abordées : l'extraction directe des ARN d'échantillons de fromage ou l'extraction d'ARN à partir de cellules microbiennes séparées de la matrice fromagère.

2.1. Méthode directe

L'ARN microbien a été extrait d'une matrice fromagère avec succès pour la première fois dans le but d'étudier la dynamique des écosystèmes bactériens à la surface des fromages (Bonaiti *et coll.*, 2006). Cette méthode a permis d'extraire les ARN microbiens directement à

partir de la croûte de fromage type pâte molle à croûte lavée en combinant l'effet de différents agents chimiques (chaotropiques, chélateurs et détergents) et une action mécanique pour casser les cellules. La qualité et la pureté des ARN ribosomiaux (ARNr) ont été vérifiées, respectivement, sur gel d'agarose et par spectrométrie. Cette méthode a permis d'obtenir des ARN de bonne qualité malgré les macromolécules (caséines, matière grasse,...) du fromage qui peuvent interférer tout au long du protocole d'extraction des ARN. Cependant, la croûte de ces fromages possède une densité de population très élevée et une structure différente du cœur du fromage ou du caillé frais. L'application de cette méthode à tout type de fromage reste donc à confirmer.

De ce fait, pour étudier l'expression des gènes des espèces microbiennes intervenants dans d'autres parties du fromage, d'autres étapes de la fabrication de fromage ou d'autres fromages, il était nécessaire de mettre au point de nouvelles méthodes d'extraction d'ARN. Une méthode a été développée sur des modèles fromagers réalisés à partir de rétentat ($\times 5$) d'ultrafiltration du lait,ensemencé avec *Lactococcus lactis* à 10^7 ufc/ml (Monnet *et coll.*, 2008). L'ARN a été extrait directement de petits échantillons de fromages (125 mg) broyés dans du TRIzol (Invitrogen) à l'aide de billes de verre et d'un homogénéisateur. L'ARN purifié s'est avéré de bonne qualité (RIN > 8,3) dans les échantillons extraits de fromages jusqu'à 14 jours après fabrication. La première étape de cette méthode réalisée à partir de broyats de 125 mg de fromage est l'inconvénient majeur de cette technique. Cette faible masse ne permet d'obtenir qu'une faible quantité d'ARN avec le risque de ne pas être représentative de ce qui se passe dans la masse d'un fromage de plusieurs grammes ou kilogrammes. Cet inconvénient peut être pallié en regroupant les broyats d'un même fromage (Monnet, *et coll.*, 2008) solution qui alourdit considérablement la mise en œuvre de la méthode.

2.2. Méthode indirecte

La méthode indirecte d'extraction des ARN du fromage consiste à séparer les cellules bactériennes de la matrice, avant d'en extraire l'ARN.

Afin d'étudier le transcriptome d'*Ec. faecalis*, un des composants de la flore naturelle des fromages artisanaux, Makhzami *et coll.* ont séparé les cellules bactériennes de la matrice fromagère en deux étapes :

- une première étape, mécanique, consistait à broyer le fromage et à récupérer les cellules bactériennes après centrifugation,

- une seconde étape consistait à séparer les cellules bactériennes des particules de fromages restantes sur un gradient de densité chimique (Makhzami *et coll.*, 2008).

Ces deux étapes ont permis d'obtenir un culot cellulaire exempt de toutes matières grasses, caséines et autres protéines du fromage. Les ARN ont ensuite été extraits et purifiés par des méthodes classiques (cassage des cellules, purification au phénol/chloroforme et avec un kit). Ils présentaient un bon niveau de pureté ($A_{260/280} > 1,6$) et d'intégrité (RIN $> 9,3$). Cette méthode a été développée sur des fromages fabriqués à partir de lait microfiltré acidifié avec de la glucono- δ -lactoneensemencé uniquement avec *Ec. faecalis*. L'extraction a été réalisée 7 jours après l'ensemencement quand la population bactérienne (ici *Ec. faecalis*) était supérieure à 10^8 ufc / g de fromage.

Par ailleurs, afin d'étudier l'expression des gènes de *L. lactis*, la bactérie souvent utilisée pour l'acidification, la texture et le goût des fromages, Ulvé *et coll.* ont extrait les cellules bactériennes de morceaux de fromage congelés à -80°C en broyant ces derniers à 4°C dans une solution de citrate de sodium et en centrifugeant le broyat (Ulvé *et coll.*, 2008). Aucune information sur la pureté des ARN ensuite extraits et purifiés avec une méthode classique n'a été fournie. Les ARN extraits de fromages modèles fabriqués à partir de rétentat d'ultrafiltration du lait, ainsi que ceux extraits de cheddar 1 jour ou 1 mois après l'inoculation du levain, présentaient un bon degré d'intégrité (RIN $> 8,9$) alors que les ARN extraits de fromages commerciaux ou du cheddar après 6 mois d'affinage présentaient un état de dégradation plus ou moins important (RIN compris entre 6,7 et 2,6).

3. La RT-PCR quantitative

3.1. Pourquoi la PCR quantitative ?

La Polymerase Chain Reaction (PCR) est une technique qui a été mise au point en 1985 par Kary MULLIS (Saiki *et coll.*, 1985) (récompensé en 1993 par le prix Nobel de Chimie) et qui consiste à amplifier de manière exponentielle et sélective une courte séquence d'ADN (amplicon) par l'action d'une ADN polymérase. Cette réaction enzymatique de polymérisation a lieu lorsqu'on met en présence substrats et catalyseurs, dans des proportions bien définies, c'est-à-dire :

- De l'ADN (matrice),
- Des nucléotides dNTP (déoxyribonucléotide triphosphate) (dATP, dCTP, dGTP et dTTP),

- Les amorces « sens » et « antisens » qui sont des oligonucléotides de synthèse, généralement de 20 à 25 nucléotides, complémentaires à l'ADN cible à amplifier et qui délimiteront l'amplicon,
- L'ADN polymérase, enzyme thermostable dont le niveau de fidélité doit être choisi en fonction de l'application,
- Et le tampon spécifique à cette enzyme contenant notamment des ions magnésium Mg^{2+} nécessaires à l'activité de l'enzyme.

La réaction se déroule en trois étapes :

- La dénaturation : étape au cours de laquelle les brins d'ADN (matrice) sont dénaturés, par chauffage à $94^{\circ}C$ généralement pendant environ 1 minute. Cette étape est parfois prolongée de quelques minutes, notamment pour permettre l'activation de polymérases protégées par des anticorps ou agents chimiques (« HOT START »). C'est le cas pour la PCR en temps réel.
- L'hybridation : étape au cours de laquelle les deux amorces se collent aux brins simples d'ADN. La température à laquelle se déroule cette étape est un paramètre essentiel : elle dépend de la taille et de la composition des amorces et doit être optimisée pour tout couple d'amorces afin d'avoir une efficacité et une spécificité maximales (plus la température est élevée, plus les amorces se lieront spécifiquement au brin d'ADN cible jusqu'à une température limite où elles ne s'hybrideront plus).
- L'extension : étape au cours de laquelle l'ADN polymérase synthétise le brin d'ADN complémentaire à partir de l'amorce. Elle ajoute les nucléotides complémentaires au brin d'ADN à partir de l'extrémité 3' de l'amorce. La température à laquelle se fait cette étape est en général proche de $70-72^{\circ}C$. La durée est proportionnelle à la taille du fragment à amplifier et dépend de la polymérase utilisée.

La PCR consiste à répéter plusieurs fois ces trois étapes. Au cours de chaque cycle thermique, la théorie veut que l'on double la quantité de fragments d'ADN cible dans le milieu réactionnel (Cf. Figure 4).

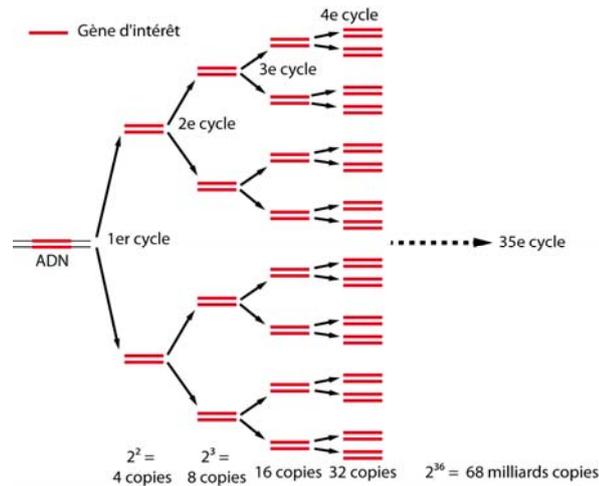


Figure 4. Amplification exponentielle de l'ADN par PCR

Toute séquence d'acides nucléiques présente dans un échantillon complexe peut donc être amplifiée par ce processus cyclique qu'est la PCR et qui génère un grand nombre de copies identiques facilement analysables. Cela a permis, par exemple de manipuler l'ADN à des fins de clonage, d'ingénierie génétique ou encore de séquençage. En théorie, il serait possible de mesurer la quantité initiale d'ADN, sachant qu'à chaque cycle, la quantité d'amplicons est doublée dans le milieu réactionnel. Les produits de PCR sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose et marquage de l'ADN par le bromure d'éthidium (BET) par exemple. Ce type d'analyse est long à mettre en œuvre et la quantification sur gel n'est pas très fiable (VanGuilder, *et coll.*, 2008). Par ailleurs, au regard de la courbe d'amplification par PCR (Cf. Figure 5), il apparaît que la réaction de PCR est divisée en trois phases d'efficacité décroissante :

- une première phase exponentielle, au cours de laquelle l'efficacité de la réaction est proche de 100 %,
- une seconde phase linéaire au cours de laquelle l'efficacité de la réaction commence à diminuer
- et une phase « plateau » pendant laquelle la réaction est inhibée pour différentes raisons (activité de l'enzyme plus faible et/ou limitation en substrats) (VanGuilder, *et coll.*, 2008).

De ce fait, la quantité finale de produit ne reflète pas la quantité initiale d'ADN.

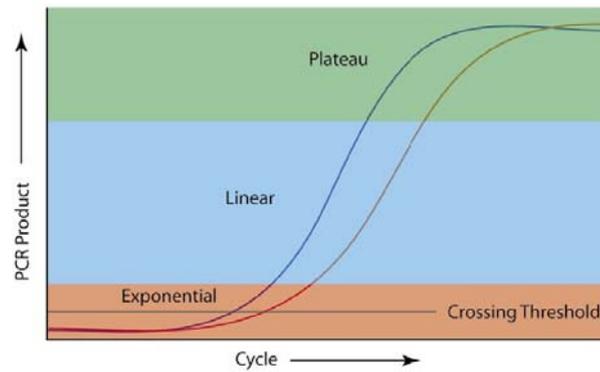


Figure 5. Suivi en temps réel de l'amplification d'ADN par PCR

C'est dans ce contexte que la PCR quantitative ou PCR en temps réel a été développée (Higuchi *et coll.*, 1992). Cette technologie, qui permet de détecter et de suivre en temps réel la quantité d'amplicons générés au cours de la réaction enzymatique, a récemment atteint un niveau de sensibilité, de précision et de simplicité pratique lui permettant d'être utilisée en routine notamment pour la détection de micro-organismes pathogènes et l'analyse de l'expression des gènes (Bustin *et coll.*, 2005; Kubista *et coll.*, 2006; VanGuilder, *et coll.*, 2008; Wong et Medrano, 2005). Pour cette dernière application, la PCR en temps réel est couplée à la Reverse Transcription (RT) pour rétro-transcrire les ARNm en ADN complémentaire (ADNc).

3.2. Les différentes technologies utilisées pour la PCR quantitative

Le suivi en temps réel est mis en œuvre dans des thermocycleurs qui permettent de suivre par fluorescence la quantité d'ADN amplifié dans le milieu réactionnel. A ce jour, quatre types de technologies sont utilisés :

- L'agent intercalant fluorescent, généralement le SyBR green, est une molécule capable d'émettre un signal fluorescent une fois « liée » à l'ADN double brin. Ce type de molécule permet de révéler l'accumulation des amplicons synthétisés au terme de chaque étape d'extension de la PCR (moment où les fragments sont sous forme double brin). Dans ce système, la spécificité de la réaction ne repose que sur la spécificité des amorces, sans contrôle de la taille des amplicons. Pour vérifier qu'un seul produit PCR a été amplifié, on réalise une courbe de fusion en fin de réaction (Cf. § III – 3. 3.3). La technique utilisant le SybrGreen est économique et facile.

- La sonde d'hydrolyse : en plus des deux amorces utilisées classiquement, une sonde est dessinée de manière à ce qu'elle s'hybride spécifiquement au fragment d'ADN cible entre

les deux amorces. A son extrémité 5' se trouve un fluorochrome (reporter) et à son extrémité 3' se trouve un groupement extincteur qui absorbe toute émission du fluorochrome (quencher). Lorsque le fluorochrome et le quencher sont proches, la fluorescence est absorbée par le quencher. Durant l'étape d'élongation de la PCR, il y aura séparation du fluorochrome de la sonde suite à l'activité 5'-3' exonucléase de la polymérase thermostable. Le fluorochrome ainsi séparé du quencher émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées au moment de l'élongation. La spécificité de la réaction est liée à la fois à celle des amorces et à celle de la sonde réduisant significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mésappariements ou à des dimères d'amorces. Cette technique est très sensible, très spécifique, rapide et elle permet le multiplexage (étude simultanée de plusieurs gènes en utilisant différents fluorochromes).

- Les sondes d'hybridation : dans ce système, on utilise deux sondes dont l'une est porteuse en 3' d'un fluorochrome émetteur et l'autre en 5' d'un fluorochrome accepteur. Les sondes sont choisies de façon à s'hybrider à leurs séquences cibles en n'étant séparées que de 1 à 5 bases. Lorsque les deux sondes sont séparées, le fluorochrome donneur n'émet qu'un bruit de fond de fluorescence. Lorsqu'elles sont hybridées à moins de 10 nucléotides de distances, le rapprochement des 2 fluorochromes permet le transfert de l'énergie du fluorochrome donneur vers le fluorochrome accepteur provoquant l'émission fluorescente de ce dernier (FRET : fluorescent resonance energy transfer). On mesure alors l'acquisition de la fluorescence, proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée, au moment de l'hybridation. Comme avec l'agent intercalant, il est possible de réaliser une courbe de fusion en fin de réaction (Cf. **III – 3. 3.3**). Ces sondes sont d'une excellente sensibilité et d'une excellente spécificité et elles sont dotées d'une grande capacité de multiplexage mais leur prix est élevé.

- Les sondes d'hybridation en épingle à cheveux : elles portent comme les sondes d'hydrolyse, deux fluorochromes, un reporter et un quencher. Repliées à l'état libre, elles n'émettent pas de fluorescence en raison de la proximité des 2 fluorochromes. Lorsque les sondes sont hybridées, l'éloignement suffisant des 2 fluorochromes libère le reporter permettant ainsi l'émission d'une fluorescence. La lecture de la fluorescence se fait au moment de l'hybridation. Ces sondes présentent elles aussi une grande spécificité et sensibilité, et permettent aussi le multiplexage mais leur prix est très élevé.

3.3. Comment analyser les résultats de RT-PCR ?

Comme évoqué précédemment (§ III – 3. 3.2), à la fin de la réaction, une courbe de fusion peut être réalisée en soumettant les amplicons à une température croissante de 55°C à 95°C par palier de 0,5°C en mesurant l'intensité de fluorescence en continu. Elle correspond à la variation de la fluorescence en fonction de la température. La température de fusion des amplicons appelée T_m est représentée par un pic unique sur la dérivée primaire de cette courbe. L'obtention de plusieurs pics à des températures différentes ou de pics décalés par rapport au T_m attendu indique la présence d'un mélange d'amplicons ou celle d'amplicons ayant une séquence différente de celle attendue, ce qui invalide le résultat.

Cependant l'information qui permet de quantifier l'ADN de départ est le C_t , « treshold cycle », appelé aussi C_q , « quantification cycle » selon la nomenclature proposée par Bustin *et coll.* (Bustin *et coll.*, 2009). Ce C_q est le nombre de cycles de PCR réalisés pour atteindre un certain seuil de fluorescence soit une certaine quantité d'amplicons (Cf. Figure 5, le « Crossing Treshold »). Il peut être calculé de différentes manières selon le logiciel associé au thermocycleur utilisé mais il est généralement calculé au point d'inflexion de la courbe d'amplification c'est-à-dire au cours de la phase exponentielle, quand l'efficacité de la réaction est maximale. Ce point d'inflexion peut être évalué visuellement (seuil de fluorescence fixé manuellement) ou par un calcul mathématique (annulation de la dérivée seconde de chaque courbe d'amplification par exemple).

La quantification peut ensuite être absolue ou relative. Pour la quantification absolue, l'établissement d'une courbe standard de l'ARN du gène d'intérêt est nécessaire pour calculer le nombre de copies de ce transcrit dans l'échantillon analysé. Dans ce cas, des dilutions en série d'une quantité connue (nombre de copies) de l'ARN pur sont réalisées et amplifiées par RT-PCR quantitative. Le signal de l'échantillon inconnu est comparé à cette courbe pour extrapoler la concentration initiale du transcrit. La courbe standard peut aussi être réalisée à partir d'ADNg ou d'ADN plasmidique.

La quantification relative consiste à mesurer l'expression de gènes d'intérêt dans un échantillon par rapport au niveau d'expression de ces gènes dans un échantillon de référence (calibrateur). Pour permettre cette comparaison de quantité d'ARNm dans différents échantillons et avoir des résultats fiables et précis, il est essentiel de normaliser les résultats afin de contrôler les variations possibles du rendement de l'extraction d'ARN, de l'efficacité de la purification de l'ARN, de l'efficacité de la RT et de l'efficacité de l'amplification (Bustin, 2002; Bustin, *et coll.*, 2009). Les stratégies les plus courantes sont : la normalisation

par rapport à la taille de l'échantillon (nombre de cellules), la normalisation par rapport à la quantité d'ARN total et la normalisation par rapport à un contrôle interne. L'utilisation de gènes de référence comme contrôle interne est la méthode la plus populaire et la plus appropriée (Huggett *et coll.*, 2005). L'expression de ces gènes de référence doit être constante dans tous les échantillons et être proportionnelle à la quantité d'ARNm dans l'échantillon étudié.

Différents modèles mathématiques ont été proposés pour calculer l'expression relative d'un gène d'intérêt par rapport à un gène de référence. La méthode la plus utilisée est la méthode de $2^{-\Delta\Delta C_q}$ (Livak et Schmittgen, 2001). En supposant que l'efficacité de la PCR est identique et optimale (quantité d'ADN doublée à chaque cycle) à la fois pour le(s) gène(s) d'intérêt et le gène de référence, l'expression relative d'un gène d'intérêt dans l'échantillon i serait alors :

$$N_i = 2^{-(\Delta C_{q,i} - C_{q,cal})} = 2^{-((C_{q,i,goi} - C_{q,i,ref}) - (C_{q,cal,goi} - C_{q,cal,ref}))}$$

Avec N_i la quantité relative du gène d'intérêt (goi) dans l'échantillon i , $C_{q,i,goi}$, $C_{q,i,ref}$, $C_{q,cal,goi}$, et $C_{q,cal,ref}$ les C_q mesurés par RT-PCR quantitative respectivement pour le gène d'intérêt (goi) dans l'échantillon i , le gène de référence (ref) dans l'échantillon i , le gène d'intérêt goi dans l'échantillon calibrateur (cal) et le gène de référence (ref) dans l'échantillon calibrateur (cal).

Cependant, si l'efficacité de la PCR n'est pas optimale, l'expression relative du gène d'intérêt peut être sur- ou sous- estimée. Ce problème peut être facilement résolu en tenant compte de l'efficacité de la réaction dans les calculs d'expression. L'efficacité de la PCR en temps réel pour un couple d'amorces donné (un gène) est généralement calculée à partir de dilutions en série d'ADNc. L'efficacité de la PCR est alors égale à $10^{-1/pente}$ où la pente est celle de la droite représentant le logarithme de la concentration initiale en ADNc en fonction du C_q obtenu par PCR (Bustin, *et coll.*, 2009). D'autres méthodes, plus complexes, ont été développées pour mesurer l'efficacité à partir de la courbe d'amplification obtenue pour chaque échantillon et/ou gène étudié (Liu et Saint, 2002; Ramakers *et coll.*, 2003).

En tenant compte de l'efficacité, l'expression relative d'un gène d'intérêt dans l'échantillon i est :

$$N_i = \frac{(1 + E_{goi})^{C_{q,cal,goi} - C_{q,i,goi}}}{(1 + E_{ref})^{C_{q,cal,ref} - C_{q,i,ref}}}$$

Avec E_{goi} et E_{ref} les efficacités de la PCR quantitative pour le gène d'intérêt (*goi*) et le gène de référence (*ref*) (Pfaffl, 2001).

3.4. Les gènes de référence pour la normalisation de résultats de RT-PCR quantitative

Un seul gène de référence est généralement utilisé pour normaliser les résultats de RT-PCR quantitative mais des études ont montré que des gènes de référence très largement utilisés variaient en fonction des conditions expérimentales (Dheda *et coll.*, 2004; Thellin *et coll.*, 1999). Or, l'utilisation d'un gène de référence inapproprié conduit à des résultats différents et erronés (Dheda *et coll.*, 2005). La stabilité de l'expression des gènes devrait donc être vérifiée dans les conditions étudiées. L'utilisation de plusieurs gènes de référence permet une normalisation des données plus précise et plus fiable (Vandesompele *et coll.*, 2002). Dans ce cas, l'expression des gènes d'intérêt est normalisée par la moyenne géométrique de l'expression d'un nombre optimal de gènes de référence de manière à lisser les variations individuelles de chacun des gènes de référence (Vandesompele, *et coll.*, 2002).

Trois programmes ont été développés sous Excel pour sélectionner ces gènes de référence à partir d'une série de gènes considérés comme ayant une expression stable quelles que soient les conditions expérimentales et choisis dans des voies métaboliques différentes pour éviter qu'ils ne soient co-régulés :

Le programme geNorm (Vandesompele, *et coll.*, 2002) est le premier programme à avoir été développé. Ce programme n'utilise pas directement les valeurs de C_q mais des valeurs relatives (ΔC_q). A partir de ces valeurs, il calcule une valeur de stabilité M pour chacun des gènes étudiés, cette valeur correspond à la variation moyenne du rapport de l'expression de ce gène par rapport à tous les autres. Le rapport de l'expression de deux gènes de référence idéaux est censé être identique dans tous les échantillons. Le programme classe donc les gènes de référence en fonction de leur stabilité d'expression en considérant que ceux qui ont le plus petit M ont l'expression la plus stable. Il permet aussi de déterminer le nombre optimal de gènes de référence nécessaires pour une bonne normalisation.

Le programme BestKeeper (Pfaffl *et coll.*, 2004) utilise directement les C_q . Il compare l'expression de gènes candidats deux à deux dans, au minimum, 5 conditions et calcule pour chaque comparaison le coefficient de corrélation de Pearson et la probabilité associée à ce coefficient. Il calcule le « BestKeeper index » qui permet de déterminer si ces gènes sont régulés de façon différente dans les différentes conditions. Pour utiliser ce logiciel, il est

nécessaire d'avoir, au préalable, normaliser les expériences (même quantité d'ADNc ou d'ARN par exemple).

NormFinder (Andersen *et coll.*, 2004), comme geNorm, utilise des valeurs relatives au lieu des C_q . Contrairement aux deux autres programmes, il ne compare pas les gènes deux à deux. Les échantillons étudiés sont regroupés en plusieurs sous-groupes et le programme mesure une valeur de stabilité des gènes candidats qui rend compte de la variation intra- et inter-groupes. Les gènes les plus stables sont ceux qui présentent les variations intra-groupe et les variations inter-groupes les plus faibles. Cette méthode est moins sensible que les deux autres à la co-régulation des gènes.

Chez *S. aureus*, de nombreux gènes de référence ont été utilisés seuls pour normaliser des résultats d'analyse transcriptionnelle. Parmi eux, on trouve *ftsZ* (Schwan *et coll.*, 2006) qui code une protéine impliquée dans la division cellulaire, *pta* (Pereira *et coll.*, 2007) qui code la phosphate acetyltransferase, *hu* (Chien *et coll.*, 1999; Fournier *et coll.*, 2001; Schmidt *et coll.*, 2003) qui code une protéine fixée à l'ADN, *gyrB* (Goerke *et coll.*, 2001; Goerke *et coll.*, 2000; Valle *et coll.*, 2003; Wolz *et coll.*, 2002) qui code la sous-unité B de la gyrase de l'ADN et l'ARNr 16S (Lee, *et coll.*, 2007; Vaudaux *et coll.*, 2002; Yarwood *et coll.*, 2002a). Bien que souvent utilisé, l'ARNr représente 95% de l'ARNt et il n'est donc pas représentatif de la quantité d'ARNm.

A ce jour et à ma connaissance, une seule étude s'est intéressée à la sélection de plusieurs gènes de référence pour normaliser les résultats de la RT-PCR quantitative. Cette étude concernait *S. aureus* et la résistance aux médicaments (Theis *et coll.*, 2007). La stabilité de l'expression de onze gènes candidats a été analysée en utilisant le programme geNorm. Cette analyse a montré que l'expression de *rho* (facteur de terminaison de la transcription), *pyk* (pyruvate kinase) et *proC* (pyrroline-5-carboxylate réductase) était la moins affectée en présence de rhodamine 6G et de cristal violet alors que *fabD* (protéine de la biosynthèse des acides gras), *tpiA* (triosephosphate isomérase A) et *gyrA* (sous-unité A de la gyrase de l'ADN) ou *fabD*, *proC* et *pyk* étaient exprimés de manière stable, respectivement, en présence d'éthidium ou de berbérine (Theis, *et coll.*, 2007). Différentes combinaisons de gènes de référence ont ainsi été utilisées pour normaliser l'expression des gènes d'intérêt suivant le médicament présent dans le milieu de culture. Ces résultats confirment donc l'importance de vérifier la stabilité des gènes de référence utilisés dans les conditions d'étude.

Synthèse

En l'espace de trois ans, quatre méthodes ont été développées pour extraire l'ARN microbien de matrice fromagère. Deux des ces méthodes sont basées sur l'extraction directe des ARN à partir de morceaux de fromages et les deux autres proposent d'extraire au préalable les cellules de la matrice pour ensuite extraire de manière classique les ARN à partir de culots cellulaires. Quelque soit la méthode, la rapidité de mise en œuvre et la qualité des ARN purifiés ont été les éléments indispensables à la validation de la méthode car ils sont nécessaires pour obtenir des résultats fiables par puces à ADN ou par RT-PCR quantitative.

De nombreuses méthodes sont disponibles à ce jour pour étudier l'expression de gènes par RT-PCR quantitative : quatre technologies pour suivre la quantité d'ADN amplifié par fluorescence et deux méthodes de quantification. La technologie la plus simple à mettre en œuvre pour suivre la quantité d'ADN dans le milieu réactionnel consiste à utiliser un agent intercalant. Et la méthode de quantification la plus couramment utilisée est la quantification relative des gènes de référence. L'obtention de résultats corrects et fiables en utilisant cette méthode nécessite de vérifier un certain nombre de paramètres tels que l'efficacité de la réaction de PCR et le choix de bons gènes de référence.

CONCLUSION DE LA SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE ET INTRODUCTION DU TRAVAIL DE THÈSE

S. aureus est une cause majeure de TIAC dans le monde, notamment par les produits laitiers en France. Du fait de sa capacité à coloniser la peau et les muqueuses des humains et des animaux à sang chaud, *S. aureus* peut se retrouver dans la matière première des aliments ou dans les aliments suite à une manipulation dans de mauvaises conditions d'hygiène. Une fois présente dans l'aliment, cette bactérie est capable de se développer et de produire des entérotoxines dans un large panel de conditions.

Ce sont les entérotoxines produites qui sont responsables de l'intoxication suite à la consommation de l'aliment contaminé. Parmi la vingtaine de SE identifiées et caractérisées, seules cinq (SEA à SEE) sont dosables par des méthodes commerciales et par une méthode de référence mise au point à l'AFSSA. SEA et SED sont les entérotoxines le plus souvent impliquées dans des cas de TIAC, suivies par SEB et SEC. Plus récemment l'implication de SEH, SER et SES a elle aussi été mise en évidence.

S. aureus étant la première cause de TIAC par les produits laitiers et, plus particulièrement, par les fromages, son développement a été largement étudié dans les fromages. Toutes les grandes familles de fromages sont concernées par le risque lié à *S. aureus* bien que les fromages à pâte molle et à pâte pressée non cuite y soient plus sensibles. Un grand nombre de paramètres physiques (température, pH, aération), chimiques (acides organiques, peroxyde d'hydrogène) ou biologiques (bactériocine, compétition nutritionnelle) ont une incidence sur le comportement de *S. aureus* dans les fromages.

En Europe, pour limiter le risque lié à *S. aureus* dans les fromages, la recherche de staphylocoques à coagulase positive est, depuis 2006, obligatoire dans les fromages et, si la population atteint le seuil de 10^5 ufc/g, les industriels doivent rechercher les SE. Quelque soit le niveau d'ensemencement, la population de *S. aureus* atteint généralement plus de 10^5 ufc/g de fromages au cours des premiers jours de fabrication expérimentale, sans pour autant produire des SE dans tous les cas. Les nombreuses études rapportant ce phénomène ne permettent pas, à ce jour, de l'expliquer. Il apparaît donc nécessaire d'étudier plus précisément la production de SE au cours des étapes des procédés de fabrication de fromages en s'intéressant à l'expression de leurs gènes.

Récemment, les outils nécessaires à la mise en œuvre d'une telle étude ont été développés. Plusieurs méthodes d'extraction d'ARN à partir de matrice fromagères ont été

mises au point et de nombreuses techniques sont maintenant à notre disposition pour étudier de manière fiable et précise l'expression de gènes d'intérêt par RT-PCR quantitative.

Dans le lait cru utilisé pour la fabrication fromagère, la contamination initiale par *S. aureus* est généralement inférieure à 10^3 ufc/ml alors que les levains sont inoculés à plus de 10^6 ufc/ml. L'analyse de l'expression des gènes *se in situ* nécessite donc une méthode d'extraction d'ARN très efficace pour s'assurer d'obtenir une quantité d'ARN staphylococcique suffisante pour être quantifiée par RT-PCR quantitative. Les méthodes d'extraction d'ARN publiées et développées, au cours mes années de thèse, par diverses équipes, ont été mises au point sur des fromages contenant au moins 10^7 ufc/g de fromage et n'abordent donc pas la question de la sensibilité de ces méthodes à des populations microbiennes plus faibles. Certaines de ces méthodes n'ont été validées que sur une partie des fromages (croûtes) (Bonaiti, *et coll.*, 2006) ou sur des fromages à faible taux de matière grasse (Monnet, *et coll.*, 2008) et elles sont parfois lourdes à mettre en œuvre (Makhzami, *et coll.*, 2008; Monnet, *et coll.*, 2008). Une autre méthode a donc été mise au point dans le cadre de la thèse.

Pour évaluer l'expression des gènes *se* au cours de fabrication fromagère, une méthode robuste de normalisation des données de RT-PCR quantitative a dû être développée car il n'existe, à l'heure actuelle, aucune sélection de bons gènes de référence pour l'étude des gènes de *S. aureus* au cours de croissance en fromage.

Une fois ces outils mis en place, il a été possible de suivre en parallèle l'expression des gènes et la production des SE au cours des différentes étapes de la fabrication de fromage type pâte pressée non cuite, qui est l'une des technologies les plus sensibles au risque lié à *S. aureus*. Nous avons choisi d'étudier, en conditions contrôlées, l'incidence de paramètres technologiques de fabrication de fromages sur le comportement de différentes souches de *S. aureus* isolées de fromage et productrices d'une ou plusieurs des entérotoxines dosables par les méthodes commercialisées. L'objectif était d'identifier des paramètres technologiques clés influençant la croissance de *S. aureus* ainsi que l'expression des gènes et la production d'entérotoxines au cours de la transformation du lait en fromage afin de mieux comprendre les mécanismes régulant la production des entérotoxines. Les paramètres à étudier ont été choisis à partir de résultats d'enquêtes réalisées par le Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL) sur les pratiques fromagères dans l'industrie et des données de la littérature identifiant des conditions pouvant favoriser ou inhiber l'expression des gènes *se*.

En utilisant un plan d'expériences fractionnaire, nous avons tout d'abord classé cinq paramètres de fabrication en fonction de leur effet sur la production de SE. Les deux

paramètres ayant le plus d'incidence ont ensuite été étudiés en utilisant la méthodologie des surfaces de réponses afin de donner des indications claires aux professionnels sur les conditions qui limitent le risque de production de SE au cours de la fabrication des fromages à pâte pressée non cuite. Ces études en fromages ont aussi permis de progresser dans la compréhension de la présence ou non des SE et d'émettre des hypothèses sur les systèmes de régulation des entérotoxines.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I – SOUCHES ET CONDITIONS DE CULTURE

1. Souches et conditions de stockage

Les cinq souches de *S. aureus* utilisées au cours de cette thèse (Tableau 7) ont été choisies selon les critères suivants : souches isolées de fromages, productrices d'une entérotoxine parmi A, B, C ou D détectables avec les technologies actuelles, une souche productrice de deux entérotoxines sous la dépendance ou non du système de régulation *agr*, biotype et gènes *se* connus.

Référence	Propriété	Origines	Matrice	Gènes <i>se</i>	Biotype
432G	AFSSA	TIAC	Fromage au lait cru de brebis	<i>sea</i>	ovin
CIM479	Arilait	Savoie	Fromage	<i>seb, seg, sei, sem, sen, seo</i>	humain
CIM441	Arilait	Massif central	Fromage	<i>sec, seg, sei, sel, sem, sen, seo</i>	bovin
CIM433	Arilait	Massif central	Fromage	<i>sed, sej, ser</i>	humain
361F	AFSSA	TIAC	Fromage au lait cru de brebis	<i>sea, sed, sej, ser</i>	humain

Tableau 7. Souches de *Staphylococcus aureus* utilisées

Nous avons également travaillé avec la souche *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL416 et la souche *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11. Pour les fabrications fromagères, les levains lyophilisés industriels MA400 et MY800 (Danisco, Dangé, Saint Romain, France) contenaient les espèces *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Les levains lyophilisés étaient stockés à -20°C et les souches de *S. aureus* et de *L. lactis* étaient stockées à -80°C respectivement en milieu liquide BHI (Brain Heart Infusion) ou en milieu liquide M17 contenant 20% de glycérol (v/v).

2. Conditions de culture

2.1. Croissance en lait

Après une pré-culture de 6 h en milieu liquide BHI à 37°C sous agitation (200 rpm), la souche 361F de *S. aureus* a été inoculé dans du lait reconstitué stérile (100 g de poudre de lait Régilait (Saint-Martin-Belle-Roche, France) par litre d'eau distillée, stérilisé à 110°C pendant 10 min). Lors des co-cultures avec *L. lactis*, le lait a étéensemencé avec la souche IL416 cultivée pendant 16 h à 30°C sans agitation en milieu liquide M17 supplémenté avec 1% de lactose (p/v). Les cultures de la souche 361F ont été réalisées dans cinq conditions différentes : *i*- à 37°C avec agitation (200 rpm), *ii*- à 37°C sans agitation, *iii*- à 30°C avec agitation, *iv*- à 37°C avec agitation en co-culture avec *L. lactis* IL416 et *v*- à 37°C avec agitation dans du lait acidifié avec de l'acide lactique (pH 5,5). La croissance bactérienne a été suivie pendant 24 h. Les dilutions des cultures ont été préparées dans de l'eau contenant 1% de peptone (p/v) et déposées à l'aide d'un ensementeur Spiral® (Spiral System, Cincinnati, Ohio) sur les boîtes de milieu gélosé BHI complémenté avec 5% de chlorure de sodium (NaCl) (p/v) pour la numération des staphylocoques et de milieu gélosé M17 complémenté avec 1% de lactose (p/v) pour la numération des lactocoques. Les boîtes ont été incubées pendant deux jours à 37°C (boîtes de BHI) ou à 30°C (boîtes de M17). En vue d'une extraction d'ARN, des culots cellulaires ont été prélevés *i*- au début de la phase exponentielle de croissance de *S. aureus*, *ii*- en milieu de phase exponentielle de croissance, *iii*- en fin de phase exponentielle de croissance et *iv*- en phase stationnaire de croissance.

2.2. Préparation pour l'inoculation dans les laits utilisés pour les fabrications fromagères

- Préparation de *L. lactis* SK11 pour une fabrication fromagère en mini-cuve de 7 l

L. lactis SK11 est inoculé à environ 10^6 ufc/ml dans les laits utilisés pour les fabrications fromagères après trois pré-cultures successives en lait reconstitué à 30°C sans agitation (une première pré-culture de 16 h, une seconde de 8 h et une dernière de 16 h).

- Préparation de MA400 et MY800 pour une fabrication fromagère en cuve automatisée de 20 l

Des aliquotes des cultures lyophilisées sont pesées dans des tubes stériles pour obtenir un inoculum de 0,5 U / 100 l de lait puis préparés, comme spécifié par le fabricant. Juste

avant l'utilisation, une aliquote est dissoute dans du lait pasteurisé prélevé de la cuve puis mélangée dans la cuve pour assurer une bonne homogénéisation.

- Préparation de *S. aureus* pour une fabrication fromagère en mini-cuve

S. aureus 361F est inoculé à environ 10^3 , 10^4 ou 10^6 ufc/ml dans les laits utilisés pour les fabrications fromagères après trois pré-cultures successives, une première sur milieu gélosé BHI à 37°C, puis deux en milieu liquide BHI à 37°C avec agitation pendant 8 puis 6 h.

- Préparation de *S. aureus* pour une fabrication fromagère en cuve automatisée

Les souches de *S. aureus* mises en œuvre pour une fabrication fromagère en cuve automatisée sont inoculées à environ 10^3 ufc/ml dans les laits après trois pré-cultures successives, la première sur milieu gélosé BHI à 37°C, la seconde et la troisième en milieu liquide BHI avec agitation pendant, respectivement, 8 h et 4 h.

3. Vérification de la présence des gènes des entérotoxines A, B, C et D

Afin de vérifier la présence des gènes *sea*, *seb*, *sec* et/ou *sed* dans les souches sélectionnées (Tableau 7) et dessiner des amorces appropriées pour étudier l'expression de ces quatre gènes par RT-PCR quantitative, nous avons amplifié une partie de ces gènes par PCR et séquencé les amplicons obtenus.

Dans ce but, nous avons extrait l'ADNg des cinq souches de *S. aureus* sélectionnées pour la thèse avec le « Tissue kit DNeasy » de Qiagen (Hilden, Germany) à partir de cultures de 8 h en milieu liquide BHI à 37°C avec agitation.

A partir de cet ADNg, nous avons amplifié les gènes *sea*, *seb*, *sec* et/ou *sed* par PCR avec des amorces décrites dans la littérature (Johnson *et coll.*, 1991; Lovseth *et coll.*, 2004). Les produits de PCR purifiés (PCR purification kit, Qiagen, Hilden, Germany) ont été séquencés par MWG-Biotech (Ebersberg, Germany).

II – FABRICATIONS FROMAGERES

Toutes les fabrications fromagères de cette thèse ont été mises en œuvre en conditions microbiologiques contrôlées dans la fromagerie expérimentale de niveau de sécurité P2 de UBLO à l'INRA de Jouy-en-Josas. Dans cette fromagerie, il est possible de fabriquer des fromages dans des mini-cuves, dont la contenance maximale est de 7 l de lait, et dans quatre cuves automatisées (température et agitation régulée et suivie par informatique) pouvant contenir jusqu'à 20 l de lait. Cette fromagerie est également équipée d'une écrémeuse, d'un module de pasteurisation et d'un module de microfiltration.

1. Fabrications en mini-cuve

Des fromages modèles, type pâte pressée non cuite, ont été fabriqués dans les mini-cuves. Six litres de lait microfiltré de grand mélange commercial Marguerite (Villefranche sur Saône, France) ont tout d'abord été réchauffés à 32°C puis inoculés avec les souches *S. aureus* 361F et *L. lactis* SK11 avant l'emprésurage du lait avec 40 ml d'extrait de présure filtré (520 mg de chymosin active/l, Berthelot, France) pour 100 l de lait. Le lait coagule en 45 min environ puis le caillé est découpé en petits cubes, brassé sous agitation lente pendant 20 min, puis pré-pressé dans son lactosérum pendant 30 min. Le caillé est finalement découpé en trois parts égales, moulées puis pressées. Au cours du pressage, la température de la salle de fabrication est programmée pour décroître lentement de 30°C à 16°C. Au démoulage (24 h après l'emprésurage), les fromages sont salés par immersion pendant 5 h dans une saumure stérile (pH 5, 10°C), ressuyés pendant 24 h et finalement conditionnés sous vide dans des sacs en plastique. Un fromage pèse environ 250 g.

2. Fabrications en cuve automatisée

2.1. Choix de paramètres technologiques à étudier

Le CNIEL a réalisé une enquête auprès des fabricants de fromages à pâte pressée non cuite au lait cru. Les questionnaires envoyés aux fromagers permettaient d'avoir un panorama assez complet des différentes étapes du procédé en demandant principalement des indications de pH, températures, durées mais aussi le mode de pressage, le type de salage ou encore les teneurs en sel ou en matière grasse. Quatorze questionnaires ont été envoyés et 7 réponses ont été reçues. Après centralisation et compilation anonyme de l'ensemble des questionnaires par le CNIEL, une synthèse des résultats a montré que, en ce qui concerne les levains, les

fromagers utilisent en grande majorité des mélanges commerciaux de levains mésophiles (MA400) ou thermophiles (MY800) voire les deux suivant le fromage fabriqué. Ils ne pratiquent pas de délactosage du caillé. Il vise un pH du fromage à 20 h autour de 5,2 et un taux de sel des fromages de l'ordre de 1%. Les pratiques des fromagers diffèrent essentiellement dans la température de stockage du lait avant fabrication, la phase de maturation du lait en cuve (température, durée, avec ou sans brassage), la température de travail en cuve, la durée du brassage après découpage ou « décaillage », le mode de pressage. Les 5 derniers paramètres ont été sélectionnés en retenant les valeurs extrêmes observées pour les essais en fabrication de fromage.

2.2. Plans d'expériences utilisés pour étudier l'effet des paramètres technologiques sélectionnés

Deux plans d'expériences ont été suivis pour mesurer l'incidence des cinq paramètres technologiques sélectionnés sur la croissance de *S. aureus*, l'expression des gènes *se* et la production de SE.

- Plan d'expériences fractionnaire

Le premier plan d'expériences, utilisé pour cibler les paramètres technologiques qui ont l'incidence la plus forte, est un plan d'expériences fractionnaire, appelé plan d'expériences de Taguchi ou encore matrice de Hadamard. Nous avons utilisé une table orthogonale standard $L_8 (2^7)$ (Tableau 8). L'indice attaché au L, 8 dans ce cas, désigne le nombre d'essais expérimentaux qui seront réalisés en suivant ce type de plan et le terme 2^7 signifie qu'avec cette table il est possible d'étudier 7 facteurs à 2 niveaux. Les deux niveaux de contrôle de nos cinq paramètres ont été codés par des 1 et des -1 comme indiqué ci-dessous :

	Niv. 1	Niv. -1
A. Température de maturation / Quantité de présure :	35°C	32°C
B. Durée de maturation :	45 min	15 min
C. Brassage au cours de la maturation :	Avec	Sans
D. Durée de brassage / Taille des grains de caillé:	45 min	5 min
E. Durée de pressage :	4 h	16 h

Les colonnes de la table orthogonale correspondent aux facteurs étudiés et les lignes correspondent aux essais qui doivent être mis en œuvre. La table est construite de manière à ce que chaque niveau de chaque facteur soit également représenté dans chaque colonne (4

fois le niveau (1) et 4 fois le niveau (-1)). De plus, la disposition des colonnes est telle que pour chaque niveau d'une colonne, chaque niveau d'une autre colonne est présent un même nombre de fois. C'est cette orthogonalité entre les colonnes qui permet le calcul précis de l'effet de chaque facteur étudié, indépendamment de l'effet des autres facteurs.

Essai n°	1 (A)	2 (B)	3	4 (C)	5	6 (E)	7 (D)
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	-1	-1	-1	-1
3	1	-1	-1	1	1	-1	-1
4	1	-1	-1	-1	-1	1	1
5	-1	1	-1	1	-1	1	-1
6	-1	1	-1	-1	1	-1	1
7	-1	-1	1	1	-1	-1	1
8	-1	-1	1	-1	1	1	-1

Tableau 8. Table $L_8(2^7)$

L'équation représentée ci-dessous permet de mesurer l'effet E_{FR} du facteur F sur la réponse R :

$$E_{FR} = \frac{\sum_{i=1}^8 \alpha_{Fi} \times R_i}{8}$$

Avec α_{Fi} le niveau du facteur F dans l'essai i et R_i la valeur de la réponse dans l'essai i .

Une analyse de variance peut ensuite être effectuée pour déterminer si les effets des facteurs sont statistiquement significatifs.

- Plan d'expériences central composite

A partir du plan d'expériences fractionnaire, les deux paramètres technologiques ayant le plus d'incidence sur le comportement de *S. aureus* ont été retenus et étudiés à l'aide d'un plan d'expériences central composite.

Le plan d'expérience central composite à deux facteurs (X et Y) est composé de dix essais au cours desquels cinq niveaux de chaque paramètre sont étudiés. Ces valeurs sont représentées dans le Tableau 9.

Essai	X	Y
1	X_{moy}	Y_{moy}
2	X_{moy}	Y_{moy}
3	X_{min}	Y_{moy}
4	X_{max}	Y_{moy}
5	X_{moy}	Y_{min}
6	X_{moy}	Y_{max}
7	$X_{moy} - (X_{moy} - X_{min}) \times \sqrt{2} / 2$	$Y_{moy} - (Y_{moy} - Y_{min}) \times \sqrt{2} / 2$
8	$X_{moy} - (X_{moy} - X_{min}) \times \sqrt{2} / 2$	$Y_{moy} + (Y_{moy} - Y_{min}) \times \sqrt{2} / 2$
9	$X_{moy} + (X_{moy} - X_{min}) \times \sqrt{2} / 2$	$Y_{moy} - (Y_{moy} - Y_{min}) \times \sqrt{2} / 2$
10	$X_{moy} + (X_{moy} - X_{min}) \times \sqrt{2} / 2$	$Y_{moy} + (Y_{moy} - Y_{min}) \times \sqrt{2} / 2$

Avec X_{min} le niveau minimum étudié de X, X_{max} le niveau maximum étudié de X, $X_{moy}=(X_{min} + X_{max})/2$, Y_{min} le niveau minimum étudié de Y, Y_{max} le niveau maximum étudié de Y, et $Y_{moy}=(Y_{min} + Y_{max})/2$.

Tableau 9. Plan central composite à deux facteurs

Le plan d'expériences central composite est l'un des moyens utilisables pour modéliser des surfaces de réponse, c'est-à-dire générer des modèles mathématiques décrivant les relations entre un certain nombre de variables explicatives et une ou plusieurs réponses. En appliquant la méthodologie des surfaces de réponses à deux variables explicatives (les paramètres technologiques sélectionnés suite au premier plan d'expériences), nous cherchons à obtenir une équation polynomiale du second degré qui décrit la relation entre les réponses étudiées et nos paramètres technologiques :

$$Z_i = f_i(X, Y) = a_i + b_i \cdot X + c_i \cdot Y + d_i \cdot X^2 + e_i \cdot Y^2 + g_i \cdot X \cdot Y$$

Avec Z_i la valeur estimée de la réponse i , f_i la fonction décrivant les relations entre les deux variables X et Y et la réponse i et a_i , b_i , c_i , d_i et g_i les coefficients de régression calculés (coefficients de corrélation linéaire, quadratique et d'interaction).

Une approximation de Z est obtenue en ajustant les données expérimentales au modèle quadratique en utilisant les techniques de régression. Les régressions et les graphiques représentant les surfaces de réponses ont été générés par le logiciel Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA). La qualité de l'ajustement du modèle polynomial est représentée par le coefficient de détermination R^2 et une analyse de variance (p -value) a été

effectuée pour la significativité statistique du modèle. Un essai supplémentaire a été mis en œuvre pour valider les équations obtenues.

2.3. Déroulement des fabrications

Le lait utilisé pour les fabrications fromagères en cuves automatisées provenait de la ferme de Viltain à Jouy-en-Josas. Cette ferme possède un troupeau de 300 vaches laitières dont la bonne qualité microbiologique autorise la vente de lait cru à la ferme. Le lait était transporté de la ferme à la fromagerie expérimentale, la veille de la fabrication. La matière grasse du lait était tout d'abord standardisée de manière à ce que le ratio matière grasse / matières protéiques soit égal à 0,95. Le lait était ensuite pasteurisé à 72°C pendant 30 s et stocké à 4°C jusqu'au début de la fabrication.

Les fromages ont été fabriqués en appliquant différentes combinaisons des cinq paramètres technologiques de fabrication étudiés (Figure 6). Après l'ajout de chlorure de calcium (15,7 g / 100 l de lait), 15 litres de lait pasteurisé préchauffé à une température T ont été inoculés avec *S. aureus* à une concentration de 10^3 ufc/ml et avec les levains lyophilisés MA400 et MY800 à une concentration de 0,5 U / 100 l de lait. Le lait a été maturé avec ou sans brassage pendant une durée t_1 puis emprésuré avec de l'extrait de présure filtré (Berthelot). Le lait coagule en 45 min environ puis le caillé est coupé en petits cubes. Après un brassage lent pendant une durée t_2 , le caillé est pré-pressé dans son lactosérum pendant 30 min et finalement découpé en huit parts égales qui sont moulées. Les fromages sont ensuite pressés pendant une durée t_3 . Au cours du pressage, la température décroît de la température T à 16°C en 4 h environ. Au démoulage, les fromages sont, s'il y a lieu en fonction de la durée du pressage, ressuyés jusqu'au lendemain (24 h après l'emprésurage) puis salés par immersion pendant 5 h dans une saumure stérile (pH 5, 10°C), ressuyés pendant 24 h et conditionnés sous vide dans des sacs en plastique. Un fromage pèse environ 250 g.

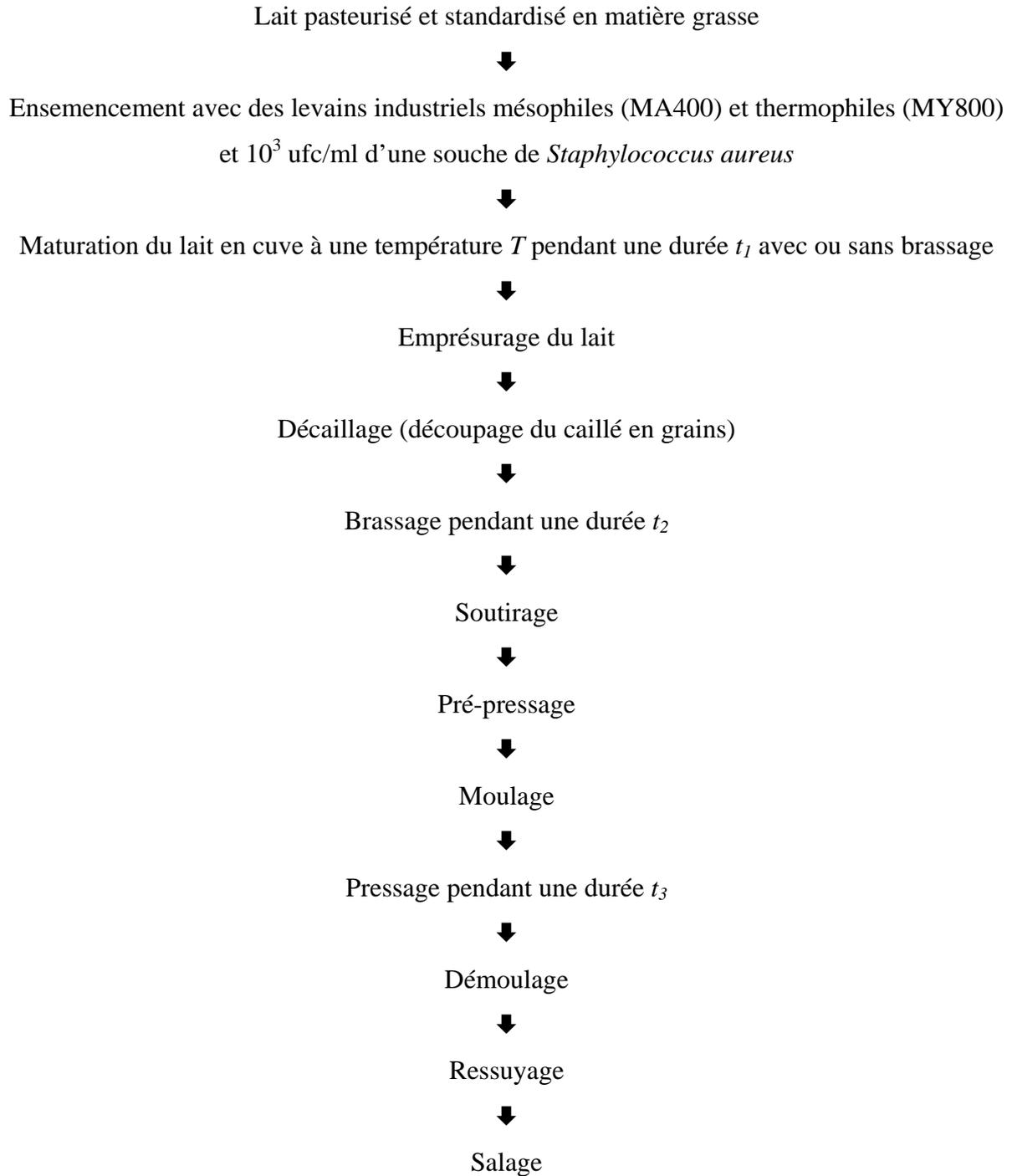


Figure 6. Diagramme de fabrication des fromages à pâte pressée non cuite

3. Analyses des fromages

3.1. Analyses physico-chimiques

Le pH du lait et des fromages a été mesuré avec un pH-mètre 1140 (Mettler-Toledo S.A., Viroflay, France) équipé d'une électrode de pénétration LoT406-M6-DXK-S7/25 (Mettler-Toledo S.A.). Des analyses chimiques ont été réalisées sur le lait cru, le lait pasteurisé et les fromages âgés de 24 h (avant le salage, sauf pour la teneur en sel). La teneur en matière grasse du lait a été mesurée par la méthode de Gerber, comme indiqué dans la norme IDF 105 (Anonymous, 1981) et la teneur en matière protéique a été mesurée par la méthode Noir Amido (Anonymous, 1985). La matière sèche du lait a été évaluée en utilisant le dessiccateur Precisa XM 60 (Precisa Instrument Ltd., Dietikon, Switzerland) et nous avons évalué la teneur en matière grasse des fromages par la méthode de Heiss (Heiss, 1966) modifiée par Pien (Pien, 1976). La teneur en sel a été déterminée avec un chloruremètre (Corning Ltd, Essex, England).

3.2. Analyse microbiologique

Nous avons mesuré les populations des staphylocoques et des levains jusqu'à 72 heures après l'emprésurage du lait au cours de la fabrication des fromages. Pour cela, 5 grammes de fromage, coupé en petits morceaux, sont ajoutés à 45 ml d'une solution de citrate de sodium (71,4 mmol/l) pour permettre la dissociation des agrégats de caséines. Après une incubation à température ambiante pendant 10 min, les échantillons sont homogénéisés en solution à l'aide d'un Ultra-Turrax (T-25 IKA, Labo Moderne, Paris, France) à 16 500 rpm pendant deux fois 30 s. Les dilutions de cet échantillon de fromage homogénéisé ou du lait (avant l'emprésurage du lait) et les conditions d'incubation pour la numération bactérienne sont mises en œuvres comme décrit dans le § I – 2. 2.1.

3.3. Préparation des culots cellulaires en vue de l'extraction des ARN

Pour étudier l'expression des gènes *se* au cours de la fabrication des fromages, il est nécessaire d'extraire l'ARN de la matrice fromagère. Dans un premier temps, les cellules sont rapidement séparées de la matrice, comme décrit ci-après. Les échantillons de fromages homogénéisés pour l'analyse microbiologique des fromages sont centrifugés à $4\,600 \times g$ pendant 10 min à 4°C. Après élimination de la couche de matière grasse en surface du

surageant et du surnageant lui-même, le culot, qui contient à la fois des bactéries et des particules de fromages, est lavé avec 1 ml de Tris-base-EDTA (TE) (10 mM Tris-base, 1 mM EDTA, pH 8) et congelé rapidement dans de l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite stockés à -80°C jusqu'à l'extraction d'ARN (moins d'une semaine de stockage).

3.4. Dosage des entérotoxines staphylococciques

Les entérotoxines A à E ont été recherchées dans des échantillons de fromages et de lactosérum en utilisant la méthode européenne de dépistage constituée d'une étape d'extraction-dialyse concentration couplée à une étape de détection par le kit Vidas SET2 (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Les échantillons trouvés positifs ont ensuite été analysés selon la méthode de confirmation du LCR des staphylocoques à coagulase positive (Hennekinne, *et coll.*, 2007) pour déterminer le type d'entérotoxines produites.

III – TRAITEMENT DE L'ARN

1. Extraction des ARN totaux à partir de culots cellulaires

Toutes les solutions utilisées dans ce protocole sont stockées à 4°C et les étapes de centrifugation sont mise en œuvre à 4°C pour limiter l'activité des RNases. Les ARN sont extraits sous une hotte chimique, avec du matériel dédié.

Les culots cellulaires sont tout d'abord repris dans de l'eau traitée au DiethylenePyrocarbonate (DEPC) (pour limiter l'action des RNases). Les suspensions cellulaires sont ensuite transférées dans des microtubes de 1,5 ml contenant 0,5 g de billes de verres de 0,1 mm de diamètre (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 30 µl d'une solution d'acétate de sodium 3M (pH 5,2), 30 µl de SDS à 10% (p/v) et 500 µl de phénol : chloroforme 5 : 1 (Sigma Aldrich), selon Hiron *et coll.* (Hiron *et coll.*, 2007). Les cellules sont ensuite cassées par trois cycles de FastPrep FP120 (Bio1001 Thermo Electron Corporation) à la vitesse maximale pendant 45 s. Après centrifugation (15 min à 15 000 × g à 4°C), la phase aqueuse a été récupérée et l'ARN a été purifiée avec du Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) selon les instructions du fabricant. Après précipitation à l'isopropanol, les ARN totaux extraits et purifiés ont été repris dans de l'eau traitée au DEPC.

2. Elimination de l'ADNg et analyse des échantillons d'ARN

La concentration des extraits a ensuite été ajustée à environ 0,2 µg/µl pour effectuer le traitement DNase rigoureux du kit DNA-freeTM kit (Ambion, Austin, TX, USA), comme indiqué par le fabricant. La concentration, la pureté et l'intégrité des ARN ont été mesurés par spectrophotométrie au NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) et par électrophorèse sur puce au BioAnalyzer 2100 (Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA). Ce dispositif permet de calculer le RIN de l'échantillon d'ARN. Pour l'analyse de l'expression des gènes par RT-PCR quantitative, nous n'avons utilisé que des extraits ayant un RIN compris entre 8,5 et 10.

3. RT-PCR quantitative

3.1. Transcription inverse (RT)

Dans un premier temps, 100 ng d'ARNt extrait de culture de *S. aureus* ou 500 ng d'ARNt extrait de co-culture de *S. aureus* avec d'autres espèces bactériennes ont été dénaturés (5 min à 65°C) puis incubés à 20°C pendant 10 min avec des nonanucléotides aléatoires (CyScribe cDNA Post labeling Kit, GE Healthcare Amersham Biosciences). La synthèse d'ADNc a été effectuée à 42°C pendant 1 h par l'enzyme PrimeScript Reverse Transcriptase en présence d'1 µl de nucléotides dNTP ultrapurs (Clontech-Takara Bio Europe, Saint Germain en Laye, France). Après la transcription inverse, l'enzyme a été inactivée par traitement thermique (15 min à 70°C). Les ADNc ainsi obtenus ont ensuite été utilisés comme matrice pour la PCR quantitative en temps réel.

3.2. Amorces utilisées pour la PCR quantitative

Les amorces utilisées pour mesurer l'expression des gènes par RT-PCR quantitative ont été dessinées en utilisant le logiciel Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ou Primer 3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) et ont été achetées chez Eurognetech (Seraing, Belgique). Le risque de formation de structures secondaires a été contrôlé avec Oligo Calc (Kibbe, 2007) et des BLAST ont été réalisés pour vérifier la spécificité de nos amorces. Les séquences de ces amorces et la taille de l'amplicon obtenu par PCR sont indiquées dans le Tableau 10.

Nom	Fonction	Séquence	Taille de l'amplicon (bp)
<i>Gènes de référence candidats</i>			
<i>gyrB</i>	Sous-unité B de la gyrase de l'ADN	F : CCAGGTAAATTAGCCGATTGC R : AAATCGCCTGCGTTCTAGAG	121
<i>ftsZ</i>	Protéine de la division cellulaire	F : ATCCAAATCGGTGAAAAATTAACAC R : CCATGTCTGCACCTTGGATTG	121
<i>hu</i>	Protéine fixée à l'ADN	F : TTTACGTGCAGCACGTTTAC R : AAAAAGAAGCTGGTTCAGCAGTAG	125
<i>rplD</i>	Protéine ribosomale 50S L4	F : TGAAAGATAATGCTGAGCGTAAAG R : ACAATCCGTGCTCCACAATG	121
<i>recA</i>	Recombinase A	F : GGGAGACACTCACGTTGGTTTAC R : AACTTTTTACGAATTTGGTTGATG	121
<i>sodA</i>	Superoxyde dismutase	F : TTAGGTAATAAGCGTGTTCATAC R : GGCTTGGTTAGTCGTAACAATG	125
<i>gap</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate déhydrogénase	F : AGTGAACCAGATGCAAGCAAATTAC R : TTTTAGCGCCTGCTTCAATATG	121
<i>rpoB</i>	RNA polymérase de chaîne beta	F : GCGAACATGCAACGTC AAG R : GACCTCTGTGCTTAGCTGTAATAGC	121
<i>pta</i>	Phosphate acetyltransférase	F : AAAGCGCCAGGTGCTAAATTAC R : CTGGACCAACTGCATCATATCC	121
<i>tpi</i>	Triose phosphate isomérase	F : TTCTGAACGTCGTGAATTATTCC R : TTCACGCTCTTCGTCTGTTT	121
<i>Gènes des entérotoxines</i>			
<i>sea</i>	Entérotoxine A	F : TCAATTTATGGCTAGACGGTAAACAA R : GAAGATCCAACCTCTGAACAGTTACA	93
<i>sea432</i>	Entérotoxine A (de la souche 432G)	F : TTCACAGATCACCCATGGTATAAC R : CCGCACATTGATAACCATAATAAG	
<i>seb</i>	Entérotoxine B	F : GTGCAGGCATCATGTCATAC R : TGACTGCTCAAGAATTAGATTACC	147
<i>sec</i>	Entérotoxine C	F : AATCAACCGTTTTATTGTCGTTG R : TTAACAGTTACCATATGAAACAGG	147
<i>sed433</i>	Entérotoxine D	F : GATCTCCTGTACTTTTTATTTCTCC R : AAACGTTAAAGCCAATGAAAAC	149
<i>sed</i>	Entérotoxine D	F : AAACGTTAAAGCCAATGAAAACA R : TGATCTCCTGTACTTTTTATTTCTCCTA	150

Tableau 10. Amorces utilisées pour la PCR quantitative

3.3. PCR quantitative

Les analyses des ADNc par PCR quantitative ont été effectuées sur deux thermocycleurs, l'ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System (SDS) (Applied Biosystems) et le LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France).

Pour l'ABI Prism 7900 HT SDS, le milieu réactionnel (20 µl final) contenait 10 µl de SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems), 1,2 µl de chaque amorce (300 nM final), 2,6 µl d'eau ultrapure et 5 µl d'ADNc dilué au 1/100 (ADNc issu de culture de *S. aureus* seul) ou au 1/10 (ADNc issu de co-culture de *S. aureus* avec d'autres espèces bactériennes). Le programme utilisé consiste en un premier palier à 50°C pendant 2 min puis un second à 95°C pendant 10 min, suivi de 40 cycles de 15 s à 95°C et 1 min à 60°C.

Pour le LightCycler 480, le milieu réactionnel contenait 2 µl de Mastermix (10 × conc.), 2 µl de MgCl₂ (25 mM), 8,6 µl d'eau ultrapure, 1,2 µl de chaque amorce (300 nM

final) et 5 µl d'ADNc dilué au 2/5. Le programme utilisé consiste en un premier palier à 95°C pendant 10 min, suivi de 45 cycles de 10 s à 95°C, 10 s à 60°C et 10 s à 72°C.

Sur les deux appareils, chaque échantillon a été analysé en double dans des plaques de 96 puits. Un blanc pour chaque couple d'amorces a été incorporé au cours de chaque analyse. L'absence d'ADNc dans les échantillons d'ARN a été vérifiée par PCR quantitative avant la Reverse Transcription. Une courbe de fusion a également été réalisée en fin de réaction pour s'assurer de la spécificité de l'amplification, notamment l'absence de dimères d'amorces. L'efficacité de la réaction a été déterminée par la méthode des dilutions en série d'ADNc (Bustin, *et coll.*, 2009).

4. Analyse des résultats de PCR quantitative

Les valeurs de C_q calculés par les logiciels associés aux deux appareils ont été exportées sous Excel pour la mesure de l'expression relative des gènes. Ces valeurs ont tout d'abord été transformées, comme indiqué dans le manuel d'utilisation du programme geNorm (libre d'accès sur le site <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>), en quantité relative Q par rapport à un échantillon de référence et en tenant compte de l'efficacité des amorces du gène étudié en PCR ($Q = E^{(refCq - echCq)}$). La normalisation des données de transcription des gènes des entérotoxines a été effectuée en divisant la quantité relative d'ARNm du gène d'intérêt par la moyenne géométrique des quantités relatives de transcrits des gènes de référence. L'écart-type des expressions normalisées a été calculé selon les indications du manuel d'utilisation du programme geNorm.

Le choix des gènes de référence parmi les 10 gènes candidats sélectionnés (Tableau 10) a été effectué en suivant les procédures décrites par Vandesompele *et coll.* (Vandesompele, *et coll.*, 2002). Nous avons ainsi évalué la stabilité de l'expression des gènes candidats par le programme geNorm, développé par Vandesompele *et coll.* (Vandesompele, *et coll.*, 2002). Ce programme calcule une mesure de la stabilité d'expression (M) de chaque gène, définie comme la moyenne des variations du gène par rapport à chacun des autres gènes. Deux gènes de référence idéaux sont supposés avoir un ratio d'expression identique dans tous les échantillons et quelles que soient les conditions expérimentales. Les gènes candidats sont donc classés, par le programme, en considérant que les gènes présentant la plus faible mesure de stabilité ont l'expression la plus stable. Pour indiquer le nombre de gènes nécessaires pour la normalisation, le programme inclut un par un les gènes les plus stables dans le calcul des facteurs de normalisation de chaque échantillon jusqu'à ce que le gène n+1 ne fasse plus varier significativement les facteurs de normalisation. Cela se traduit

par le calcul de $V_{n/n+1}$. Si ce $V_{n/n+1}$ est supérieure à 0,15, le $(n+1)^{\text{ième}}$ gène a un effet significatif sur la normalisation et devrait donc être inclus dans le calcul pour disposer d'un facteur de normalisation fiable. Les créateurs de geNorm recommandent l'utilisation, au minimum, des trois gènes les plus stables pour le calcul du facteur de normalisation.

Pour évaluer la proportion d'ARN staphylococcique par rapport à la proportion d'ARN de *L. lactis* dans les échantillons extraits de fromage, nous avons mesuré le niveau absolu d'expression d'un des gènes exprimés avec la plus grande stabilité. Pour cela, des courbes standard ont été établies à partir de quantités connues d'ARN staphylococcique et lactococcique avec des amorces spécifiques pour chacune des deux espèces. Les valeurs de C_q mesurées avec les amorces spécifiques à chacune des espèces dans l'échantillon analysé ont ainsi été comparées à ces courbes standard et il a été possible de calculer le ratio ARN staphylococcique / ARN lactococcique.

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

I – MISE AU POINT D’UNE BOITE A OUTILS POUR ETUDIER L’EXPRESSION DES GENES DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES AU COURS D’UNE FABRICATION DE FROMAGE

1. Contexte et objectifs

La synthèse bibliographique présentée en première partie de ce manuscrit met en évidence l’intérêt d’étudier l’expression des gènes des entérotoxines staphylococques au cours de la fabrication des fromages pour mieux comprendre les conditions de production des SE. Pour cela, il a été nécessaire de développer une méthode d’extraction d’ARN bactérien à partir de matrice fromagère qui permette d’extraire aussi efficacement l’ARN d’une espèce majoritaire comme le levain et l’ARN d’une espèce minoritaire comme *S. aureus* qui représente dans les fromages contaminés environ 1/1000^{ième} de la population totale de bactéries. La RT-PCR quantitative étant la technique la plus sensible pour détecter et quantifier les ARN peu abondants, elle a été utilisée pour évaluer le niveau d’expression des gènes des SE. Cependant, pour les raisons indiquées dans le § III – 3 de la synthèse bibliographique mais aussi parce qu’il est impossible de connaître *a priori* la quantité d’ARN staphylococcique dans les échantillons d’ARN purifié, il était indispensable de sélectionner des gènes de référence pertinents pour mesurer de manière fiable et précise la quantité relative de transcrits des gènes *se* par RT-PCR quantitative.

La première étape de cette thèse a donc été, d’une part, de développer une méthode efficace pour extraire l’ARN bactérien de fromage présentant une qualité suffisante pour la RT-PCR quantitative et, d’autre part, d’adapter une méthode simple, sensible et reproductible pour la détermination de l’expression relative du niveau de transcription des gènes *se* de *S. aureus* au cours de fabrication fromagère. La méthode d’extraction d’ARN a été mise au point sur des fromages à pâte pressée non cuite et à pâte molle (les plus sensibles au risque lié à *S. aureus*). Elle a été validée en évaluant la qualité des ARN extraits et en comparant la proportion d’ARN staphylococcique dans l’ARN total et la proportion de la numération de *S. aureus* dans la population microbienne totale. Nous avons, en parallèle, étudié l’expression de 10 gènes de référence potentiels de *S. aureus* par RT-PCR quantitative au cours de

croissances en lait et en fromage et analysé leur expression à l'aide du programme geNorm pour sélectionner des gènes de référence pour nos travaux.

Les résultats obtenus font l'objet d'un premier article publiée en mars 2010 dans le journal « Applied and Environmental Microbiology ».

2. Article 1 : Tool for quantification of staphylococcal enterotoxin gene expression in cheese

Résumé

Le fromage est un écosystème microbien dynamique et complexe caractérisé par la présence d'une grande variété de bactéries, de levures et de moisissures. Certains micro-organismes tels que les lactobacilles ou les lactocoques contribuent à la qualité organoleptique des fromages alors que la présence d'autres espèces peut conduire à leur altération ou peut constituer un risque pour la santé. *Staphylococcus aureus* est mondialement reconnu comme un important pathogène alimentaire du fait de sa capacité à produire des entérotoxines dans les matrices alimentaires. Pour étudier l'expression des gènes des entérotoxines au cours de la fabrication de fromage, nous avons développé une méthode efficace pour récupérer l'ARN total à partir de fromage et nous avons appliqué une stratégie robuste pour étudier l'expression de gènes par RT-PCR quantitative. La méthode d'extraction d'ARN permet d'obtenir des préparations pures d'ARN non dégradé appropriées pour la RT-PCR quantitative. Pour normaliser les données de RT-PCR quantitative, l'expression de dix gènes de référence potentiels a été étudiée au cours de croissances de *S. aureus* en lait et au cours de fabrication fromagère. Les trois gènes de référence, exprimés avec la plus grande stabilité au cours de la fabrication de fromage, étaient *ftsZ*, *pta* et *gyrB*. Ces trois gènes ont été utilisés comme contrôles internes pour mesurer l'expression des gènes *sea* et *sed*, codant pour les entérotoxines staphylococciques A et D, par RT-PCR quantitative. L'expression de ces gènes a été suivie pendant les 72 premières heures de la fabrication du fromage et ces données ont été corrélées avec la production d'entérotoxines.

Tool for Quantification of Staphylococcal Enterotoxin Gene Expression in Cheese[∇]

Manon Duquenne,^{1,2} Isabelle Fleurot,¹ Marina Aigle,¹ Claire Darrigo,¹ Elise Borezée-Durant,¹
Sylviane Derzelle,² Marielle Bouix,³ Véronique Deperrois-Lafarge,²
and Agnès Delacroix-Buchet^{1*}

UMR 1319, Institut Micalis, Microbiologie de l'Alimentation au Service de la Santé, INRA, AgroParisTech, Jouy en Josas, France¹;
Unité Hygiène et Microbiologie des Produits Alimentaires, AFSSA LERQAP, Maisons Alfort, France²; and
UMR782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, INRA, AgroParisTech, Thiverval-Grignon, France³

Received 22 July 2009/Accepted 24 December 2009

Cheese is a complex and dynamic microbial ecosystem characterized by the presence of a large variety of bacteria, yeasts, and molds. Some microorganisms, including species of lactobacilli or lactococci, are known to contribute to the organoleptic quality of cheeses, whereas the presence of other microorganisms may lead to spoilage or constitute a health risk. *Staphylococcus aureus* is recognized worldwide as an important food-borne pathogen, owing to the production of enterotoxins in food matrices. In order to study enterotoxin gene expression during cheese manufacture, we developed an efficient procedure to recover total RNA from cheese and applied a robust strategy to study gene expression by reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR). This method yielded pure preparations of undegraded RNA suitable for RT-qPCR. To normalize RT-qPCR data, expression of 10 potential reference genes was investigated during *S. aureus* growth in milk and in cheese. The three most stably expressed reference genes during cheese manufacture were *ftsZ*, *pta*, and *gyrB*, and these were used as internal controls for RT-qPCR of the genes *sea* and *sed*, encoding staphylococcal enterotoxins A and D, respectively. Expression of these staphylococcal enterotoxin genes was monitored during the first 72 h of the cheese-making process, and mRNA data were correlated with enterotoxin production.

Staphylococcus aureus is a significant bacterial pathogen producing a variety of proteins and toxins that contribute to its ability to colonize and cause diseases (15). Some *S. aureus* strains are able to produce staphylococcal enterotoxins (SEs) in food matrices and are responsible for food poisoning, characterized by such symptoms as nausea, vomiting, abdominal cramps, and diarrhea (2). In France *S. aureus* is reported as the most frequent pathogen involved in food-borne diseases associated with dairy products (12) and especially with raw milk cheeses (9). It is generally accepted that SE production constitutes a risk when *S. aureus* bacteria exceed a threshold of 10⁵ *S. aureus* CFU per gram of cheese during manufacture. Numerous studies have reported on *S. aureus* behavior during cheese manufacturing, focusing only on *S. aureus* growth and enterotoxin production (1, 8, 11, 18, 21, 22, 31, 32, 34–36, 42, 43, 49). To our knowledge, no study has investigated the expression of the genes encoding SEs in foods or during food production. Numerous parameters, such as pH, aeration, or temperature, could, indeed, affect the expression of these genes. During the cheese-making process, natural staphylococcal contamination is minor in the total microbial population. The initial *S. aureus* contamination is usually below 10³ CFU/ml of raw milk, while bacterial starters are inoculated at least at 10⁶ CFU/ml of milk. Analysis of SE gene expression *in situ* thus requires an efficient method of extract-

ing bacterial RNA from cheese to ensure recovery of quantifiable amounts of staphylococcal RNA. A precise method is also needed to quantify minor transcripts in the extracted bacterial RNA.

Two main strategies were initially used to extract bacterial RNA from cheese, one based on separation of cells from the cheese matrix prior to RNA extraction (29, 45) and the other using a direct method (4, 33). The method of Bonaïti et al. (4), which was developed to analyze the surface of cheese curd, is not directly applicable for all cheese fractions. Two methods were developed on model semifat cheeses, and these either have not been applied to cheese with standard fat content (33) or gave bad results with commercial cheese (45). Makhzami et al. separated cells from the cheese matrix using a Nycodenz density gradient, but cheeses contained more than 10⁸ CFU/g of cheese (29), which is not always the case at the beginning of cheese processing. In the absence of a reliable method, there was still a need to develop an efficient bacterial RNA extraction method usable at any time in the cheese-making processing and applicable to any fraction of the cheese.

Real-time reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) is the most sensitive method for the detection of low-abundance mRNA and is therefore the method of choice for our studies. A good normalization strategy is needed to correct for sample-to-sample variations due to the different steps of the real-time RT-qPCR process from the RNA extraction to the PCR step (5, 6). Moreover, in our studies, one drawback is that staphylococcal RNA extracted from the cheese matrix cannot be quantified. However, relative measurements of mRNA expression changes can be determined by using internal reference genes. Ideally, reference genes used in relative RT-qPCR

* Corresponding author. Mailing address: UMR 1319, Institut Micalis, Microbiologie de l'Alimentation au Service de la Santé, INRA, AgroParisTech, Jouy en Josas, France. Phone: 33 1 34 65 20 92. Fax: 33 1 34 65 20 65. E-mail: Agnes.Delacroix-Buchet@jouy.inra.fr.

[∇] Published ahead of print on 8 January 2010.

studies are controls equally expressed under different conditions. Several housekeeping genes have already been used in *S. aureus* gene expression studies as single internal reference genes, including *ftsZ* (41), *pta* (37), *hu* (7, 17, 39), and *gyrB* (19, 20, 46, 50). However, previous studies have shown that the expression of many housekeeping genes is differentially regulated, depending on experimental conditions (14, 44). The use of multiple reference genes results in a more accurate and reliable normalization of gene expression data (47). A Visual Basic Application (VBA) for Microsoft Excel called geNorm makes it possible to determine the most stably expressed genes from a series of candidate reference genes and the number of genes required for accurate normalization (47).

In the present study we developed an efficient method to extract bacterial RNA accessible for RT-qPCR from cheese and adapted a simple, sensitive, and reproducible method for quantification of relative transcript levels in order to study *S. aureus* enterotoxin gene expression during cheese manufacture. The method was applied to semihard cheeses and soft cheeses. We investigated the expression of 10 potential reference genes in *S. aureus* during growth in milk and in cheese to define good internal controls for experiments. The RNA extraction method was validated for RNA purity and quality. The method was used to determine the proportion of staphylococcal RNA in total RNA extracted from cheeses, which was then compared with the proportion of staphylococcal cells in the bacterial population. Finally, we studied the expression of two SE genes over the first 72 h of cheese making and compared the transcript levels with SE protein production.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. *S. aureus* strain 361F, which was used throughout this study, was isolated by De Buyser et al. in 1985 (10) from raw ewe milk cheese that was implicated in staphylococcal food poisoning. This strain can produce enterotoxins A and D. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (IL-416) and *L. lactis* subsp. *cremoris* (SK11) were grown in coculture with *S. aureus*, respectively, in milk and in cheese.

Growth conditions in milk and cell sampling. Once *S. aureus* strain 361F had been precultured in brain heart infusion (BHI) broth (Difco Laboratories, Detroit, MI) at 37°C with shaking (200 rpm) for 6 h, it was inoculated into 200 ml of sterile reconstituted milk (100 g of skim milk powder [Régilait, Saint-Martin-Belle-Roche, France] per liter of distilled water, sterilized at 110°C for 10 min). For the coculture with *L. lactis*, milk was also inoculated with strain IL-416 grown in M17 (Difco Laboratories) broth complemented with 1% (wt/vol) lactose at 30°C without shaking for 16 h. *S. aureus* strain 361F cultures were performed under the following conditions: (i) at 37°C with shaking (200 rpm), (ii) at 37°C without shaking, (iii) at 30°C with shaking, (iv) at 37°C with shaking in coculture with *L. lactis* IL-416, and (v) at 37°C with shaking in milk acidified with lactic acid (pH 5.3). Bacterial growth was monitored for 24 h. Serial dilutions of milk cultures were prepared in sterile 1% (wt/vol) peptone water and plated using a spiral plater (Spiral System, Cincinnati, OH) on BHI medium supplemented with 5% (wt/vol) NaCl for staphylococcus cell enumeration and on M17 medium supplemented with 1% (wt/vol) lactose for lactococcus cell enumeration. Plates were incubated for 2 days at 37°C (BHI medium plates) and at 30°C (M17 medium plates). Bacterial samples were collected in two independent experiments at four growth phases for RT-qPCR analysis: at the beginning of the exponential growth phase (2 h), at mid-exponential growth phase (6 h), at the end of the exponential growth phase (10 h), and at stationary phase (24 h). After a rapid centrifugation (3,000 × g at 4°C for 5 min), cell pellets were recovered and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction.

Semihard cheese process and commercial cheeses. Experimental semihard cheeses were prepared under controlled bacteriological conditions according to a protocol adapted from semihard cheese technology. Once *S. aureus* strain 361F and *L. lactis* strain SK11 had been precultured, respectively, in BHI broth at 37°C with shaking (200 rpm) for 6 h and in sterile reconstituted milk at 30°C without

shaking for 16 h, 6 liters of commercial full-fat, microfiltered milk (Marguerite, Villefranche sur Saône, France) preheated at 32°C was inoculated with *S. aureus* to a final concentration of 10³, 10⁴, or 10⁶ CFU/ml and with *L. lactis* before the addition of 40 ml of filtered rennet extract (520 mg of chymosin/liter; Berthelot, France) for 100 liters of milk. Coagulation proceeded for about 45 min, and the curd was then cut into cubes and, after a slow stirring for 20 min, prepressed in whey for 30 min. The curd was finally cut into three equal parts, poured into molds, and pressed. Then, the temperature was slowly decreased to 16°C in 4 h. Whey draining was continued for almost 24 h. After the cheeses were taken out of the molds, they were salted for 5 h in sterile brine (pH 5 at 10°C), dried for 24 h, and conditioned in a plastic bag under vacuum. Model cheeses were approximately 250 g. Ripening took place at 12°C. Each cheese was manufactured twice using two different milk batches. The other cheeses used in the present study (Vieux Pané, Roquefort, and Munster) were purchased commercially from local cheese suppliers.

Bacterial enumeration in cheese samples. The staphylococcus and lactococcus cell growth in cheeses was estimated for the first 3 days of the cheese-making procedure. Five grams of cheese, cut into small pieces, was added to 45 ml of trisodium citrate solution (71.4 mmol/liter). After incubation at room temperature for 10 min, the samples were homogenized using an Ultra-Turrax mechanical blender (T-25 IKA; Labo Moderne, Paris, France) at 16,500 rpm for two 30-s sequences. Serial dilutions of milk (before rennet addition) or homogenized cheese (after rennet addition) and incubation conditions for bacterial enumeration were then performed as described in the protocol for growth in milk.

Bacterial cell recovery from the cheese matrix. Homogenized cheeses in trisodium citrate solution (10 ml) were centrifuged at 4,600 × g for 10 min at 4°C. After the fat layer on the top and the supernatant had been discarded, the pellet (containing bacteria and cheese particles) was washed with 1 ml of cold Tris base-EDTA (TE; 10 mM Tris base, 1 mM EDTA, pH 8) buffer and frozen in liquid nitrogen. The sample was then stored at -80°C until the RNA extraction, which was performed within 1 week. The yield of the recovery was measured by cell counts, as described above, before the first centrifugation and just before freezing.

RNA purification and quantification. All solutions used for this procedure were stored at 4°C, and centrifugation steps were performed at 4°C to limit RNase activity. Cell pellets were suspended in diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated water before being transferred into 1.5-ml microtubes containing 0.5 g of 0.1-mm diameter glass beads (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), 30 µl of 3 M sodium acetate (pH 5.2), 30 µl of 10% (wt/vol) SDS, and 500 µl of water-saturated phenol-chloroform (5:1) (Sigma Aldrich), as described by Hiron et al. (24). Cells were then disrupted three times using a Fast Prep FP120 system (Bio1001; Thermo Electron Corporation) at maximum speed for 45 s, with chilling on ice for 1 min between pulses. After centrifugation (at 4°C 15 000 × g for 15 min), the aqueous phase was recovered, and RNA was purified with Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. After isopropanol precipitation, total RNA was suspended in DEPC-treated water.

Extracts were adjusted to about 0.2 µg/µl to perform rigorous DNase treatments using a DNA-free kit (Ambion, Austin, TX) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration, purity (represented by the $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ and $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ ratios [30]) and integrity (RNA integrity number [RIN]) (40) were assessed using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) and an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology, Palo Alto, CA).

Reverse transcription and real-time qPCR. Oligonucleotides for real-time qPCR (Table 1) were designed using Primer Express, version 2.0, software (Applied Biosystems, Foster City, CA) and purchased from Eurogentec SA (Seraing, Belgium). Secondary structures were controlled with Oligo Calc (27), and a BLAST analysis was performed to check primer specificity.

Annealing of 100 ng of total RNA extracted from *S. aureus* pure culture or 500 ng of total RNA extracted from coculture of *S. aureus* and *L. lactis* with random nonamers (CyScribe cDNA postlabeling kit; GE Healthcare Amersham Biosciences) was performed for 10 min at 20°C after denaturation of RNA secondary structures (5 min at 65°C). cDNA was synthesized by a 1-h reverse transcription at 42°C using PowerScript Reverse Transcriptase and Ultra pure dNTP (Clontech-Takara Bio Europe, Saint Germain en Laye, France), followed by enzyme inactivation (15 min at 70°C).

The cDNA levels were then analyzed by quantitative PCR using an ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System (SDS) (Applied Biosystems). Each sample was tested in duplicate in a 96-well plate (Applied Biosystems). The reaction mixture (final volume, 20 µl) consisted of 10 µl of SYBR green PCR Mastermix (Applied Biosystems), 1.2 µl of each primer (300 nM final), 2.6 µl of ultrapure H₂O, and 5 µl of a 1/100 (cDNA from *S. aureus* pure culture) or 1/10 (cDNA

TABLE 1. Candidate reference genes and genes of interest

Gene group and name	Molecular function	Primer name and sequence ^a	Amplicon length (bp)	Efficiency ^b	r ²
Candidate reference genes					
<i>gyrB</i>	DNA gyrase, subunit B	F: CCAGGTAAATTAGCCGATTGC R: AAATCGCCTGCGTTCTAGAG	121	95	0.994
<i>ftsZ</i>	Cell division protein	F: ATCCAAAATCGGTGAAAAATTAACAC R: CCATGCTGCACCTTGGATTG	121	96	0.998
<i>hu</i>	DNA-binding protein	F: TTTACGTGCAGCACGTTTAC R: AAAAAGAAGCTGGTTCAGCAGTAG	125	92	0.999
<i>rplD</i>	50S Ribosomal protein L4	F: TGAAAAGATAATGCTGAGCGTAAAG R: ACAATCCGTGCTCCACAATG	121	104	0.998
<i>recA</i>	Recombinase A	F: GGGAGACACTCACGTTGGTTTAC R: AACTTTTTACGAATTTGGTTGATG	121	86	0.996
<i>sodA</i>	Superoxide dismutase	F: TTAGGTAATAAGCGTGTTCCTATAC R: GGCTTGGTTAGTCGTAACAATG	125	83	0.994
<i>gap</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: AGTGAACCAGATGCAAGCAAATTAC R: TTTAGCGCCTGCTTCAATATG	121	96	0.999
<i>rpoB</i>	RNA polymerase beta chain	F: GCGAACATGCAACGTCAAG R: GACCTCTGTGCTTAGCTGTAATAGC	121	98	0.999
<i>pta</i>	Phosphate acetyltransferase	F: AAAGCGCCAGGTGCTAAATTAC R: CTGGACCAACTGCATCATATCC	121	98	0.994
<i>tpi</i>	Triose phosphate isomerase	F: TTCTGAACGTCGTGAATTATCC R: TTCACGCTCTTCGTCTGTTT	121	100	0.996
Enterotoxin genes					
<i>sea</i>	Enterotoxin A	F: TCAATTTATGGCTAGACGGTAAACAA R: GAAGATCCAACCTCTGAACAGTTACA	93	101	0.994
<i>sed</i>	Enterotoxin D	F: AAACGTTAAAGCCAATGAAAAACA R: TGATCTCCTGTACTTTTATTTCTCCTA	150	98	0.997

^a F, forward; R, reverse.

^b PCR amplification efficiency was determined from the standard curves, using the formula $10^{(-1/\text{slope})}$. For the calculations, the base of the exponential amplification function is used (e.g., 1.94 means 94% amplification efficiency).

from coculture of *S. aureus* and *L. lactis*) dilution of cDNA. The absence of genomic DNA in RNA samples was checked by real-time qPCR before cDNA synthesis (minus RT control).

A blank (no-template control) was incorporated in each assay. The thermocycling program consisted of one hold at 50°C for 2 min and one hold at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Melting curve data were then collected to check PCR specificity, contamination, and the absence of primer dimers. The PCR efficiency (E) of each primer pair was determined by the dilution series method using cDNA as a template. To minimize interrun variations, a calibrator sample was used to determine and fix the fluorescence threshold. The threshold cycle (C_T) values calculated by the SDS software were exported to Excel for the relative quantification analysis.

Real-time RT-qPCR data analysis. The C_T values of each sample were transformed as described in the freely distributed geNorm user manual into relative quantities (Q) with a reference (ref) sample and using the gene-specific PCR efficiency, calculated as follows: $Q = E^{(\text{ref}C_T - \text{sample}C_T)}$. Normalization was applied by dividing the relative quantities of genes of interest by the geometric mean of the relative quantities of selected reference genes (normalization factor [NF]). Standard deviation of the normalized expression was calculated as described in the geNorm user manual.

The stability of mRNA expression of the potential reference genes was evaluated by using the geNorm VBA applet for Microsoft Excel (47). This program calculates the gene expression stability measure (M) for a potential reference gene as the average pairwise variation for that gene with all other tested genes. Two ideal reference genes are expected to have an identical expression ratio in all samples, whatever the experimental conditions. Therefore, candidate reference genes are ranked on the assumption that those with the lowest M value have the most stable expression. Finally, the program determines the optimal number of genes for accurate normalization by calculating the pairwise variation ($V_{n/n+1}$) between two normalization factors, NF_n (normalization factor based on the geometric mean of the n most stable genes) and NF_{n+1} , such that if $V_{n/n+1}$ is superior to 0.15, the $(n+1)^{\text{th}}$ gene has a significant effect on normalization and should preferably be included for calculation of a reliable normalization factor. Authors of geNorm nevertheless recommend the minimal use of the three most stable internal control genes for calculation of the nor-

malization factor (NF_3) and stepwise inclusion of more control genes until the $(n+1)^{\text{th}}$ gene has no significant contribution to the newly calculated normalization factor.

The absolute quantification of the expression of the most stably expressed gene in *S. aureus* during growth in milk was assessed with specific primers for *S. aureus* and *L. lactis* in an RNA sample extracted from cheese to evaluate the proportions of *S. aureus* and *L. lactis* RNAs. The amplification of target gene transcript in the sample was compared to a standard curve obtained with specific primers for both species and prepared with known concentrations of RNA extracted independently from pure culture of *S. aureus* or *L. lactis*.

Analysis of enterotoxin production in cheese. Cheese samples (25 g) were tested for the presence of enterotoxins (A to E) 72 h after milk inoculation by using a European Union extraction method for screening, followed by dialysis concentration coupled to a Vidas SET2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) detection kit. Samples found positive for enterotoxins were further analyzed by using the European Union Community Reference Laboratory with the coagulase-positive staphylococci confirmatory method described by Hennekinne et al. (23) to determine the type of enterotoxin produced.

RESULTS

Bacteria growth in milk and cheese. Potential reference gene transcript levels were measured during growth of *S. aureus* strain 361F in milk under conditions that might occur during the cheese-making process and during the first 72 h of cheese manufacture. Cell counts in milk for 24 h are reported in Fig. 1. The increase in staphylococcal cell numbers and the pH reduction in semihard cheeses manufactured with *L. lactis* strain SK11 during the first 24 h are reported in Fig. 2. Although pHs finally reached the same values under all conditions (5 ± 0.1), the decrease in cheeses inoculated with 10^6 *S. aureus* CFU/ml was faster than in other cheeses, suggesting

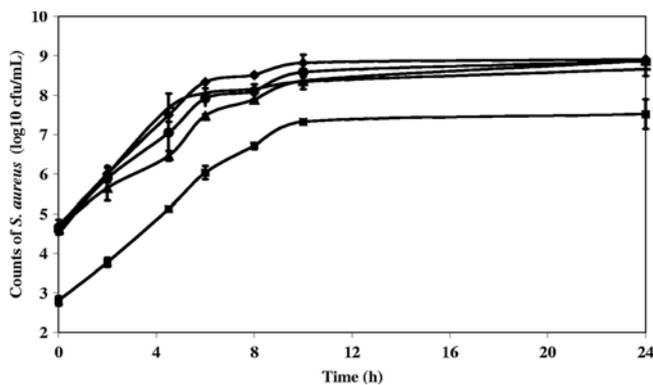


FIG. 1. Growth of *S. aureus* strain 361F in reconstituted milk. Data are expressed as the means of two biological repetitions at 37°C with shaking (filled diamond), 30°C with shaking (filled triangle), 37°C without shaking (filled horizontal bar), 37°C with shaking and lactic acid (filled circle), and 37°C with shaking and *L. lactis* strain IL-416 (filled square). When interval bars are not visible they fall within plot symbols.

that *S. aureus* in that concentration may facilitate the acidifying activity and growth of *L. lactis* (data not shown). We noticed, however, an early growth slowdown in milk cultures inoculated with 10^6 *S. aureus* CFU/ml, which may be due to faster acidification and/or to nutritional competition between *L. lactis* and *S. aureus*. Bacterial RNA was extracted, and microbiological analysis was performed on molding samples until 72 h after inoculation of the milk, using the method developed in the present study.

RNA extraction from cheese. The first step in the development of tools to quantify enterotoxin gene expression in cheese was the cheese RNA extraction strategy. After many attempts to directly extract bacterial RNA from cheeses (data not shown), we succeeded in separating the bacterial cells from the cheese matrix before RNA extraction. During the first step, casein and fat were eliminated from the cheese matrix by combining mechanical and chemical treatments known to destabilize the cheese matrix. Next, bacteria were recovered and washed. Bacterial recovery yield was around 100%. The RNA extraction yield was $(6.1 \pm 1.6) \times 10^{-5}$ ng/cell when the total bacterial population was around 10^7 CFU/g of cheese and $(2.9 \pm 0.9) \times 10^{-5}$ ng/cell when the population was greater than 10^7 CFU/g of cheese. Better yields [$(8.1 \pm 1.7) \times 10^{-5}$ ng/bacterial cell] were obtained with cheese inoculated with 10^6 *S. aureus* CFU/ml of milk when the population reached more than 10^7 CFU/g. The average A_{260}/A_{230} and A_{260}/A_{280} ratios were, respectively, 1.80 ± 0.50 and 2.06 ± 0.14 . The RIN of the RNA samples was around 9.5 ± 0.5 , which means that they were not degraded and could be used for real-time RT-qPCR. From Vieux Pané, Roquefort, and Munster we obtained, respectively, 76 μ g of RNA/g of cheese with a RIN of 8.2, 39 μ g of RNA/g with a RIN of 7.6, and 190 μ g of RNA/g with a RIN of 8.7.

Selection of potential internal controls for RT-qPCR experiments on *S. aureus* RNA. A total of 10 housekeeping genes known to be involved in different aspects of cellular functions were evaluated for their potential as good internal controls for *S. aureus* gene expression experiments (Table 1). Primers were designed, and their efficiency (E) was controlled using sample

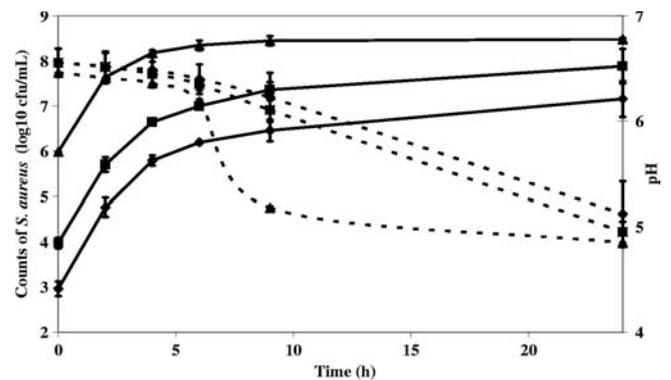


FIG. 2. Growth of *S. aureus* strain 361F and pH evolution in cheese. Data are expressed as the means of two biological repetitions. *S. aureus* bacteria were inoculated at 10^3 CFU/ml (\blacklozenge), 10^4 CFU/ml (\blacksquare), and 10^6 CFU/ml (\blacktriangle). The dashed line indicates pH, and the solid line indicates the *S. aureus* count. When interval bars are not visible, they fall within plot symbols.

standard curves, generated by serial 10-fold dilutions and calculated according to the equation $E = 10^{-1/\text{slope}}$. Their specificity was checked using BLAST against NCBI databases and confirmed on RNA extracted from a complex ecosystem (data not shown).

Transcription profiling from real-time RT-qPCR assays on the 82 samples of this study was carried out for the 10 candidate reference genes. Using geNorm VBA (see the Materials and Methods section) for each independent series and combination of cultures, the 10 genes were ranked according to their stability of gene expression measure (M) (Table 2), with the lowest M value indicating the greatest stability. All the genes presented M values below 1.5, which is the default limit defined by Vandesompele et al. (47) and means that they all presented rather good expression stability. *ftsZ*, *recA*, *pta*, and *rpoB* were the four most stably expressed genes in *S. aureus* during growth in milk under the different conditions of pH, temperature, and aeration that might occur during the cheese-making process. During growth in cheese, *ftsZ*, *pta*, and *gyrB* showed the greatest stability. Finally, to determine the optimal number of reference genes required for accurate normalization, geNorm provided the pairwise variation ($V_{n/n+1}$) values between each combination of sequential normalization factors (Fig. 3). Based on criteria of Vandesompele (47), the use of the three most stably expressed genes, namely, *gyrB*, *ftsZ*, and *pta*, as internal controls for samples extracted from cheese would suffice for reliable data normalization.

Proportion of staphylococcal RNA in total RNA. We studied the expression of one of the candidate reference genes, *recA* (among the four most stably expressed genes during *S. aureus* growth in milk) in *S. aureus* and *L. lactis* RNAs extracted from cheese samples to check that proportions of each species are the same in RNA samples and microbiological counts. Starting from equal amounts of RNA as the reaction template, standard curves for each species-specific primer were plotted. The efficiency of *L. lactis* primers was 91% ($r^2 = 0.997$), and that of *S. aureus* primers was 89% ($r^2 = 0.999$). Using standard curves made it possible to calculate *recA* expression levels in each species and thus to estimate the ratio of *L. lactis* to *S. aureus* RNA in samples extracted from cheese by real-time RT-qPCR.

TABLE 2. Internal control gene stability value M for all potential reference genes

Growth condition and replicate no.	M for the indicated gene ^a									
	<i>gyrB</i>	<i>ftsZ</i>	<i>hu</i>	<i>rplD</i>	<i>recA</i>	<i>sodA</i>	<i>gap</i>	<i>rpoB</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>
In milk										
Replicate 1	0.923	0.481	1.174	0.834	0.642	1.094	1.020	0.734	0.481	0.972
Replicate 2	0.814	0.595	1.242	0.904	0.595	1.063	1.144	0.766	0.729	0.972
Both replicates ^b	0.859	0.613	1.213	0.930	0.721	1.128	1.058	0.779	0.613	0.984
In cheese										
Replicate 1	0.370	0.370	0.636	0.438	0.920	0.842	0.758	0.693	0.497	0.581
Replicate 2	0.309	0.511	0.459	0.664	0.698	0.851	0.607	0.373	0.309	0.561
Both replicates ^b	0.392	0.464	0.609	0.681	0.790	0.876	0.730	0.556	0.392	0.647

^a A low M value corresponds to high expression stability of the particular control gene.

^b Analysis performed on both replicates.

The ratio based on the *recA* standard was 2.6 times greater than what was determined by microbiological counts in the first 9 h of manufacture (Fig. 4). After that time, this ratio continued to increase. It is therefore of major concern to use good reference genes to normalize this kind of variation.

***sea* and *sed* expression in *S. aureus* during cheese manufacture.** We examined *sea* and *sed* RNA and protein levels during cheese manufacture. Normalized expression levels of *sea* and *sed* genes in *S. aureus* strain 361F during the first 72 h of cheese manufacture are reported in Fig. 5. Regardless of the inoculation level of *S. aureus* in milk or bacterial growth phase, *sea* expression levels remained essentially unchanged, while *sed* expression was statistically lower in cheese inoculated with 10^6 *S. aureus* CFU/ml of milk than in cheeses inoculated with 10^3 ($P < 0.001$) or 10^4 ($P < 0.05$) *S. aureus* CFU/ml.

Relative to the staphylococcal counts in cheese, SEA and SED production rates are lower in cheese inoculated with 10^6 *S. aureus* CFU/ml of milk than in cheeses inoculated with 10^3 or 10^4 *S. aureus* CFU/ml (Table 3). In the case of SED, we attribute this difference to lower expression of the *sed* gene in cheese in the higher-density inoculation. However, low-level

production of SEA does not seem to be explained at the *sea*-transcriptional level.

DISCUSSION

The RNA extraction method we developed was applied to semihard cheeses and soft cheeses during the first 3 days of cheese manufacture and after ripening. The RNA extraction method we developed gave the necessary quality for transcriptional analysis studies by real-time RT-qPCR. As explained by Imbeaud et al. (25), an $A_{260/280}$ ratio above 1.8 indicates limited protein contamination, whereas the $A_{260/230}$ ratio below 1.8 in some samples is indicative of the presence of residual organic compounds. Studies by Imbeaud et al. demonstrated that samples presenting organic compound contamination did not cause inhibition in downstream applications such as cDNA synthesis (25). In this study, RNA samples were of high quality, as reflected by high RIN values (above 9 when extractions were during the first 3 days of cheese manufacture and above 7 for commercial cheeses). Moreover, the RNA extraction method provided a sufficient amount of good-quality RNA for tran-

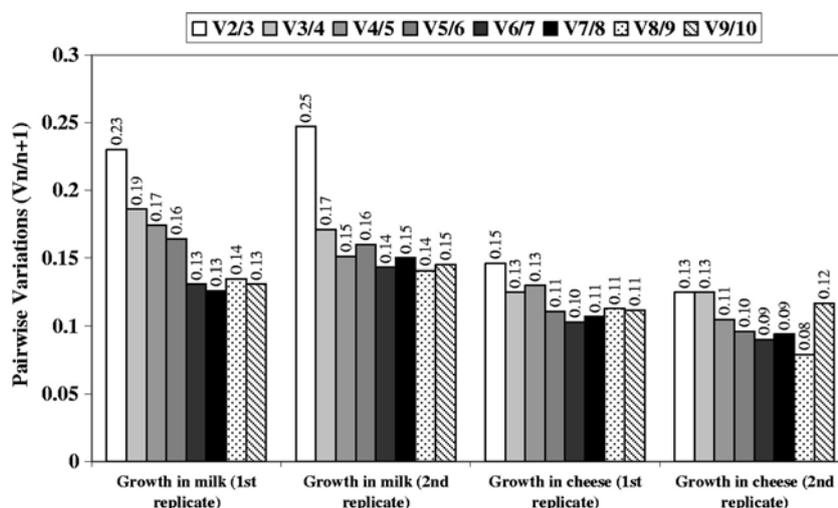


FIG. 3. Pairwise variations ($V_{n/n+1}$) for all the samples during growth in milk and in cheese (two replicates). Pairwise variations between every combination of sequential normalization factors were calculated to determine the minimum number of housekeeping genes required for accurate normalization in the different samples. The cutoff value, below which the inclusion of an additional reference gene does not result in a significant improvement of normalization, was set at 0.15.

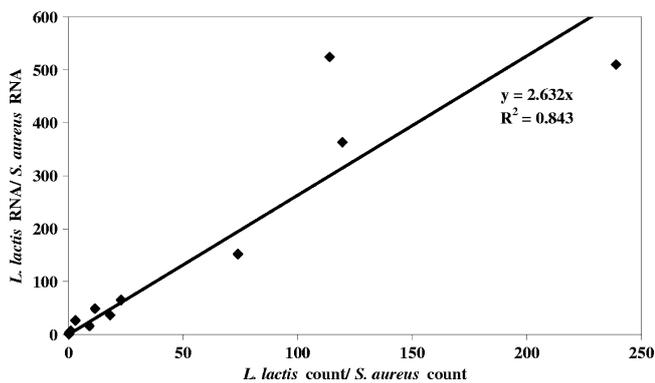


FIG. 4. Correlation between *L. lactis* and *S. aureus* microbiological counts and RNA proportions in samples extracted from cheese during the first 9 h of manufacture.

scriptural analysis at all stages of the cheese-making process, from the molding until the end of ripening, even when the bacterial population was below 10^7 CFU/g of cheese. We checked that the RNA level of the minor species (*S. aureus*) in RNA extracted from cheese corresponded to levels measured by microbiological analysis of the cheese. The proportions of staphylococci to lactococci by RNA comparisons and by microbiological counts were comparable for the first 9 h of cheese

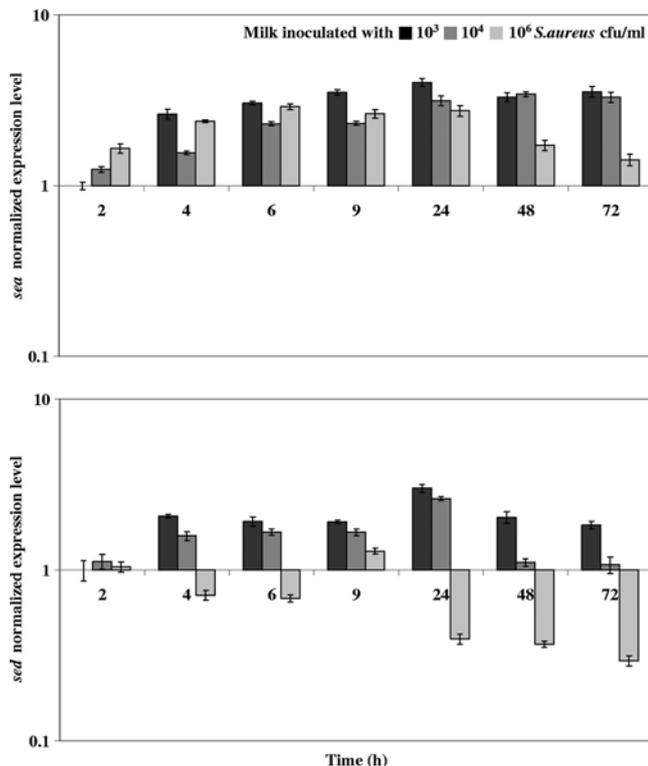


FIG. 5. *sea* and *sed* expression levels in cheese. Data are expressed as the means of two biological repetitions. Gene expression levels were quantified using real-time RT-qPCR. Normalization was provided using the geometric mean expression levels of three reference genes (*ftsZ*, *pta*, and *gyrB*). The expression level at 2 h after inoculation of milk with 10^3 *S. aureus* CFU/ml was used as the calibrator. Vertical bars indicate standard deviations.

TABLE 3. SEA and SED production in cheese

<i>S. aureus</i> inoculation level (CFU/ml of milk)	Amt of protein produced (ng/g of cheese) ^a	
	SEA	SED
10^3	0.065	0.26
10^4	0.325	1.425
10^6	0.445	1.235

^a Data are the means of two biological repetitions.

manufacture and then differed. It is thus important to use a normalization strategy for transcript quantification. Compared to previously reported cheese RNA extraction strategies (4, 29, 33, 45), our method presents the advantage of being efficient at any stage of cheese manufacture, and cell pellet preparation can be performed quickly together with microbiological analysis of the cheese sample. The procedure also allows a larger amount of cheese to be processed if greater amounts of RNA are needed.

The RT-qPCR protocol we present contains the necessary information to repeat the experiments and was validated by checking primer specificity and efficiency. The limit of detection was not calculated, but we always worked within the range of standard curves developed to determine primer PCR efficiency. We selected and used multiple reference genes to achieve an accurate and reliable normalization of RT-qPCR data (47). We thus fulfilled criteria recently reported by Bustin et al. in the MIQE (minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments) guidelines (6).

We investigated the expression stability of 10 potential reference genes under different environmental conditions. While many studies used the amount of 16S rRNA as an internal control (28, 48, 52), this was not our choice, as the rRNA molecules are not representative of the mRNA fraction. Among the 10 candidates, according to geNorm analysis of expression (47), *ftsZ*, *recA*, *pta*, and *rpoB* were the four most stably expressed genes in *S. aureus* during growth in milk under different conditions, and *ftsZ*, *recA*, and *rpoB* were found to be stably expressed in BHI broth (13). However, during growth in cheese, transcriptional stability of the reference genes differed substantially, indicating that expression has to be validated under each experimental condition (6). Each of the three genes chosen to normalize our RT-qPCR data during *S. aureus* growth in cheese (*ftsZ*, *pta*, and *gyrB*) had already been used separately in previous studies (37, 41, 50). We used the geometric mean of expression results using all three genes to normalize expression of our gene of interest (47).

The tools we developed allowed us to follow enterotoxin A and D gene expression levels during cheese manufacture for the first time. A reliable measure of their expression was possible when the ratio of *S. aureus* to *L. lactis* starter culture was below 10^{-3} , i.e., with at least 10^3 *S. aureus* per ml of milk at the beginning of cheese manufacture. At a higher ratio of *S. aureus* to *L. lactis*, the C_T values obtained with RT-qPCR were too high and resulted in unusable data for evaluation of transcript abundance (data not shown). SE gene expression has already been explored in tryptic soy or BHI broth to compare the expression levels of these genes in different strains (13, 28). Studies of *S. aureus* 361F in BHI broth (13) showed that, as in

the cheese matrix, the *S. aureus* growth phase has no significant impact on the *sea* expression pattern. During growth in BHI broth, the *sed* expression pattern presented a modest postexponential induction ratio (<10-fold) (13) that we did not observe during growth in cheese. SED production is maximal during the transition from the exponential to the stationary phases of growth, a consequence of its regulation by the staphylococcal two-component regulatory element known as the *agr* (accessory gene regulator) system that responds to a quorum-sensing octapeptide (3, 26, 53). In a model of continuous culture technique, Wright et al. showed that the minimum cell density predicted to promote specific *agr* expression was 1.2×10^8 CFU/ml (51). In cheeses the staphylococcal population rarely reaches this value, and this threshold may vary when we work under different conditions. This situation can thus explain why we did not see any induction, compared to results in BHI medium, when the population reached 4×10^8 to 2×10^9 CFU/ml (13).

When *S. aureus* was inoculated at 10^6 CFU/ml, the population reached the threshold of 10^8 CFU/g of cheese, and *sed* expression was not induced. An effect of the starter culture on staphylococcal gene expression might be hypothesized, as suggested by a recent study reporting that *L. lactis* was able to dramatically impair *S. aureus* expression of several virulence genes (16). Under mixed cultures performed in a chemically defined medium held at a constant pH, the induction of the *agr* system, as well as of the *agr*-regulated enterotoxin gene *sec*, was strongly impaired (38), while *sea*, which is not under the control of the *agr* system, was not affected (16). The reason for *agr* downregulation resulting from the interaction between the two species (*S. aureus* and *L. lactis*) inoculated at the same level, i.e., 10^6 CFU/ml) was not clearly elucidated (16), but this observation might partly explain the curiously low *sed* expression level monitored in cheeses inoculated with 10^6 *S. aureus* CFU/ml of milk compared to those inoculated with smaller amounts. Our data suggest that the interaction between the two species in cheese could be more important at equal inoculation ratios (10^6 CFU/ml) than under other conditions. Growth of both species was indeed faster, and the acidifying activity was higher under these conditions (Fig. 2). Whether such interactions with *L. lactis* could have an impact on *agr*-regulated *sed* gene expression in cheese remains to be confirmed.

Results of this study make it possible to correlate enterotoxin D gene expression and production for the first time. This correlation should be further investigated by following enterotoxin production together with gene expression in cheeses to determine whether enterotoxin D regulation occurs at the transcriptional or posttranscriptional level. A correlation between enterotoxin A production and gene expression was not observed in this study, suggesting that enterotoxin A regulation may occur at the posttranscriptional level.

In conclusion, this study highlights the importance of investigating and characterizing enterotoxin gene regulation. Understanding the dynamics of SE gene expression in cheese could help cheese manufacturers to anticipate the conditions under which SE production is activated during the cheese-making process. Moreover, this work presents an easily transferable set of tools to study gene expression of minor species in a complex ecosystem, providing RNA extraction methods and a means to accurately calculate expression of the gene of in-

terest. The approach can be applied to other microorganisms by designing specific primers and, in particular, to other complex ecosystems containing *S. aureus*. We stress the importance of validating reference gene expression stability under the specific test conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the PICT platform at INRA Jouy-en-Josas for the use of the ABI Prism SDS 7900 HT and the 2100 BioAnalyzer Agilent. We are grateful to M. L. De Buyser for providing strain 361F, P. Quéneé for *L. lactis* strains IL-416 and SK11, J. A. Hennekinne and I. Papinaud for enterotoxin quantification, and D. White and A. Gruss for reading the manuscript.

This work was carried out as part of the SEFRO project, with financial support from the Agence Nationale de la Recherche (the French National Research Agency) under the Programme National de Recherche en Alimentation et Nutrition Humaine, project ANR06-PNRA029. The P2-level experimental cheese plant acquisition was supported by Ile-de-France.

REFERENCES

1. Aoyama, K., C. Takahashi, Y. Yamauchi, F. Sakai, H. Igarashi, S. Yanahira, and H. Konishi. 2008. Examination of *Staphylococcus aureus* survival and growth during cheese-making process. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. **49**:116–123. (In Japanese.)
2. Balaban, N., and A. Rasooly. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* **61**:1–10.
3. Bayles, K. W., and J. J. Iandolo. 1989. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J. Bacteriol.* **171**:4799–4806.
4. Bonaiti, C., S. Parayre, and F. Irlinger. 2006. Novel extraction strategy of ribosomal RNA and genomic DNA from cheese for PCR-based investigations. *Int. J. Food Microbiol.* **107**:171–179.
5. Bustin, S. A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**:23–39.
6. Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele, and C. T. Wittwer. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**:611–622.
7. Chien, Y., A. C. Manna, S. J. Projan, and A. L. Cheung. 1999. SarA, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for *sar*-dependent gene regulation. *J. Biol. Chem.* **274**:37169–37176.
8. Cords, B. R., and S. R. Tatini. 1973. Applicability of heat-stable deoxyribonuclease assay for assessment of staphylococcal growth and the likely presence of enterotoxin in cheese. *J. Dairy Sci.* **56**:1512–1519.
9. De Buyser, M.-L., B. Dufour, M. Maire, and 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.
10. De Buyser, M. L., F. Janin, and F. Dilasser. 1985. Contamination of ewe cheese with *Staphylococcus aureus*: study of an outbreak of food poisoning. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* **1**(Suppl. 14):677–678.
11. Delbes, C., J. Alomar, N. Chougui, J. F. Martin, and M. C. Montel. 2006. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows' raw milk. *J. Food Prot.* **69**:2161–2167.
12. Delmas, G., A. Gally, E. Espié, S. Haeghebaert, N. Pihier, F. X. Weill, H. De Valk, V. Vaillant, and J. C. Désenclos. 2006. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *BEH* **51–52**:418–422.
13. Derzelle, S., F. Dilasser, M. Duquenne, and V. Deperrois. 2009. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. *Food Microbiol.* **26**:896–904.
14. Dheda, K., J. F. Huggett, S. A. Bustin, M. A. Johnson, G. Rook, and A. Zumla. 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* **37**:112–114, 116, 118–119.
15. Dinges, M. M., P. M. Orwin, and P. M. Schlievert. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**:16–34.
16. Even, S., C. Charlier, S. Nouaille, N. L. Ben Zakour, M. Cretenet, F. J. Cousin, M. Gautier, M. Coccagn-Bousquet, P. Loubiere, and Y. Le Loir. 2009. *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:4459–4472.
17. Fournier, B., A. Klier, and G. Rappoport. 2001. The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **41**:247–261.
18. Gaya, P., M. Medina, L. Bautista, and M. Nunez. 1988. Influence of lactic starter inoculation, curd heating and ripening temperature on *Staphylococcus aureus* behaviour in Manchego cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **6**:249–257.

19. Goerke, C., M. G. Bayer, and C. Wolz. 2001. Quantification of bacterial transcripts during infection using competitive reverse transcription-PCR (RT-PCR) and LightCycler RT-PCR. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* **8**:279–282.
20. Goerke, C., S. Campana, M. G. Bayer, G. Doring, K. Botzenhart, and C. Wolz. 2000. Direct quantitative transcript analysis of the *agr* regulon of *Staphylococcus aureus* during human infection in comparison to the expression profile in vitro. *Infect. Immun.* **68**:1304–1311.
21. Gomez-Lucia, E., J. Goyache, J. A. Orden, A. Domenech, F. Javier Hernandez, J. A. Ruiz-Santa Quiteria, B. Lopez, J. L. Blanco, and G. Suarez. 1992. Growth of *Staphylococcus aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental Manchego-type cheese. *J. Dairy Sci.* **75**:19–26.
22. Hamama, A., N. El Hankouri, and 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.
23. Hennekinne, J. A., F. Guillier, S. Perelle, M. L. De Buysier, S. Dragacci, S. Krys, and B. Lombard. 2007. Intralaboratory validation according to the EN ISO 16 140 standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. *J. Appl. Microbiol.* **102**:1261–1272.
24. Hiron, A., E. Borezee-Durant, J. C. Piard, and V. Juillard. 2007. Only one of four oligopeptide transport systems mediates nitrogen nutrition in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**:5119–5129.
25. Imbeaud, S., E. Graudens, V. Boulanger, X. Barlet, P. Zaborski, E. Eveno, O. Mueller, A. Schroeder, and C. Auffray. 2005. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res.* **33**:e56.
26. Ji, G., R. C. Beavis, and R. P. Novick. 1995. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**:12055–12059.
27. Kibbe, W. A. 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* **35**:W43–W46.
28. Lee, Y. D., B. Y. Moon, J. H. Park, H. I. Chang, and W. J. Kim. 2007. Expression of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates based on mRNA analysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**:461–467.
29. Makhzami, S., P. Quénéé, E. Akary, C. Bach, M. Aigle, A. Delacroix-Buchet, J. C. Ogier, and P. Serror. 2008. In situ gene expression in cheese matrices: application to a set of enterococcal genes. *J. Microbiol. Methods* **75**:485–490.
30. Manchester, K. L. 1996. Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. *Biotechniques* **20**:968–970.
31. Meyrand, A., S. Boutrand-Loei, S. Ray-Gueniot, C. Mazuy, C. E. Gaspard, G. Jaubert, G. Perrin, C. Lapeyre, and 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.
32. Meyrand, A., and C. Vernozy-Rozand. 1999. Croissance et entérotoxigenèse de *Staphylococcus aureus* dans différents fromages. *Rev. Med. Vet.* **150**:601–616.
33. Monnet, C., V. Ulve, A. S. Sarthou, and F. Irlinger. 2008. Extraction of RNA from cheese without prior separation of microbial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:5724–5730.
34. Nunez, M., L. Bautista, M. Medina, and P. Gaya. 1988. *Staphylococcus aureus*, thermostable nuclease and staphylococcal enterotoxins in raw ewes' milk Manchego cheese. *J. Appl. Bacteriol.* **65**:29–34.
35. Otero, A., M. C. Garcia, M. L. Garcia, M. Prieto, and B. Moreno. 1988. Behaviour of *Staphylococcus aureus* strains, producers of enterotoxins C1 or C2, during the manufacture and storage of Burgos cheese. *J. Appl. Bacteriol.* **64**:117–122.
36. Otero, A., M. C. Garcia, M. L. Garcia, J. A. Santos, and 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.
37. Pereira, S. F., A. O. Henriques, M. G. Pinho, H. de Lencastre, and A. Tomasz. 2007. Role of PBP1 in cell division of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**:3525–3531.
38. Regassa, L. B., J. L. Couch, and M. J. Betley. 1991. Steady-state staphylococcal enterotoxin type C mRNA is affected by a product of the accessory gene regulator (*agr*) and by glucose. *Infect. Immun.* **59**:955–962.
39. Schmidt, K. A., A. C. Manna, and A. L. Cheung. 2003. SarT influences *sarS* expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **71**:5139–5148.
40. Schroeder, A., O. Mueller, S. Stocker, R. Salowsky, M. Leiber, M. Gasmann, S. Lightfoot, W. Menzel, M. Granzow, and T. Ragg. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* **7**:3.
41. Schwan, W. R., L. Lehmann, and J. McCormick. 2006. Transcriptional activation of the *Staphylococcus aureus putP* gene by low-proline-high osmotic conditions and during infection of murine and human tissues. *Infect. Immun.* **74**:399–409.
42. Tatini, S. R., J. J. Jezeski, H. A. Morris, J. C. Olson, Jr., and E. P. Casman. 1971. Production of staphylococcal enterotoxin A in cheddar and Colby cheese. *J. Dairy Sci.* **54**:815–825.
43. Tatini, S. R., W. D. Wesala, J. J. Jezeski, and H. A. Morris. 1973. Production of staphylococcal enterotoxin A in blue, brick, mozzarella, and Swiss cheeses. *J. Dairy Sci.* **56**:429–435.
44. Thellin, O., W. Zorzi, B. Lakaye, B. De Borman, B. Coumans, G. Hennen, T. Grisar, A. Igout, and E. Heinen. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* **75**:291–295.
45. Ulve, V. M., C. Monnet, F. Valence, J. Fauquant, H. Falentin, and S. Lortal. 2008. RNA extraction from cheese for analysis of in situ gene expression of *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Microbiol.* **105**:1327–1333.
46. Valle, J., A. Toledo-Arana, C. Berasain, J. M. Ghigo, B. Amorena, J. R. Penades, and I. Lasa. 2003. SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **48**:1075–1087.
47. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**:RESEARCH0034. <http://genomebiology.com/2002/3/7/RESEARCH/0034>.
48. Vaudaux, P., P. Francois, C. Bisognano, W. L. Kelley, D. P. Lew, J. Schrenzel, R. A. Proctor, P. J. McNamara, G. Peters, and C. Von Eiff. 2002. Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by *hemB* mutants of *Staphylococcus aureus* expressing small colony variant phenotypes. *Infect. Immun.* **70**:5428–5437.
49. Vernozy-Rozand, C., A. Meyrand, C. Mazuy, M. L. Delignette-Muller, G. Jaubert, G. Perrin, C. Lapeyre, and 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.
50. Wolz, C., C. Goerke, R. Landmann, W. Zimmerli, and U. Fluckiger. 2002. Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during device-related infection. *Infect. Immun.* **70**:2758–2762.
51. Wright, J. D., and K. T. Holland. 2003. The effect of cell density and specific growth rate on accessory gene regulator and toxic shock syndrome toxin-1 gene expression in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **218**:377–383.
52. Yarwood, J. M., J. K. McCormick, M. L. Paustian, V. Kapur, and P. M. Schlievert. 2002. Repression of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator in serum and in vivo. *J. Bacteriol.* **184**:1095–1101.
53. Zhang, S., and G. C. Stewart. 2000. Characterization of the promoter elements for the staphylococcal enterotoxin D gene. *J. Bacteriol.* **182**:2321–2325.

3. Conclusion

La méthode d'extraction de l'ARN bactérien de matrice fromagère développée au cours de cette première partie de la thèse est basée, comme les méthodes de Bonaiti *et coll.* (Bonaiti, *et coll.*, 2006) et Ulvé *et coll.* (Ulve, *et coll.*, 2008), sur la séparation des cellules de la matrice fromagère avant l'extraction et la purification de l'ARN à partir des culots cellulaires (méthode indirecte). Nous avons obtenu, à partir de fromages expérimentaux (caillé frais) et commerciaux (fromages affinés), des préparations d'ARN non dégradé et exemptes de protéines et composés organiques qui peuvent être utilisées pour la RT-PCR quantitative.

L'expression des 10 gènes de référence candidats a été analysée par RT-PCR quantitative au cours de croissances en lait dans diverses conditions (différentes température, différents pH, différents niveaux d'aération et en présence ou non d'une bactérie acidifiante *L. lactis*) et en fromage à partir d'inoculum de tailles différentes (10^3 , 10^4 ou 10^6 ufc/ml de lait). L'analyse de ces données par le programme geNorm a permis de sélectionner les meilleurs gènes de référence (exprimés de manière stable) au cours de croissances en lait et au cours de croissances en fromage. La combinaison de gènes de référence différait dans ces deux conditions, rappelant ainsi l'importance de la vérification de la stabilité d'expression des contrôles internes dans les conditions étudiées.

Les meilleurs gènes de référence sélectionnés au cours de croissances de *S. aureus* en fromage ont été utilisés pour normaliser et suivre, pour la première fois, l'expression des gènes *sea* et *sed* au cours des 72 premières heures de la fabrication de fromage à pâte pressée non cuite. Cette étude a permis de corréler l'expression du gène *sed* à la production de SED. On a notamment remarqué que l'expression du gène, tout comme la production de la toxine, étaient inhibées quand *S. aureus* et *L. lactis* étaient inoculés à un même niveau dans les laits utilisés pour la fabrication fromagère, ce qui pourrait être dû à l'effet antagoniste de *L. lactis* sur le système *agr* de *S. aureus* (Even, *et coll.*, 2009) qui régule l'expression de *sed* (Bayles et Iandolo, 1989; Zhang et Stewart, 2000).

Les outils développés au cours de cette première partie de la thèse semblent donc adaptés à l'évaluation du niveau de transcription des gènes *se* de *S. aureus* pendant la fabrication de fromages.

II – EXPRESSION DES GENES ET PRODUCTION D'ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES AU COURS DE LA FABRICATION DE FROMAGES A PATE PRESSEE NON CUITE

1. Contexte et objectifs

La croissance et la toxinogénèse de *S. aureus* ont été largement étudiées dans les fromages. Dans la partie bibliographique de ce manuscrit, l'incidence que peuvent avoir différents paramètres technologiques tels que le levain utilisé, la température de fabrication ou d'affinage ou encore les conditions d'aération sur le comportement de *S. aureus* pendant la fabrication de fromage a été démontrée. Mais, à ce jour, il n'est pas possible d'expliquer pourquoi certaines entérotoxines sont plus fréquemment détectées dans les fromages et pourquoi les SE ne sont pas détectées alors que la population de *S. aureus* est supérieure à 10^5 ufc/g de fromage au cours des premiers jours de la fabrication.

Le développement des outils nécessaires à l'évaluation de l'expression des gènes des entérotoxines va nous permettre d'apporter un éclairage nouveau sur ce point en analysant l'impact de différents paramètres technologiques à la fois sur l'expression des gènes et sur la production des SE pendant la fabrication de fromages.

L'objectif de cette seconde partie de la thèse était double : *i-* d'une part, identifier les paramètres technologiques clés que les fabricants de fromages pourraient contrôler pour limiter le risque de production de SE et *ii-* d'autre part, étudier plus en détail ceux agissant comme facteurs de régulation des gènes *se* au cours du procédé de fabrication.

Pour cela, nous avons ciblé l'une des technologies les plus sensibles au risque lié à *S. aureus*, les fromages à pâte pressée non cuite, et étudié quatre souches isolées de fromages et productrices, respectivement, de SEA, SEB, SEC ou SED. Le CNIEL a mené une enquête auprès des fabricants de fromages à pâte pressée non cuite pour connaître les modalités dans lesquelles les différentes étapes du procédé sont réalisées. Les pratiques des fromagers diffèrent essentiellement dans la température de stockage du lait avant fabrication, la phase de maturation du lait en cuve (température, durée, avec ou sans brassage), la température de travail en cuve, la durée du brassage après découpage ou « décaillage » et le mode de pressage. Les cinq derniers paramètres ont été sélectionnés en retenant les valeurs extrêmes observées pour les essais en fabrication de fromage. Leur impact sur l'expression des gènes et la production de SE pendant la fabrication a été analysé en utilisant un plan d'expériences

fractionnaire. Trente deux fabrications ont été réalisées à partir de lait pasteurisé inoculé à 10^3 ufc/ml avec une des quatre souches sélectionnées.

Les résultats obtenus font l'objet d'une seconde publication, soumise en décembre 2009 au journal « International Journal of Food Microbiology ».

2. Article 2 : Staphylococcal enterotoxin gene expression and production during the manufacturing of uncooked semi-hard cheese

Résumé

En France, *Staphylococcus aureus* est le micro-organisme pathogène le plus souvent incriminé dans des cas de toxi-infections alimentaires collectives par le lait et les produits laitiers. L'intoxication alimentaire résulte de l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques (SE) produites dans les aliments par des souches de *S. aureus* productrices de SE. Dans le but d'identifier les principaux paramètres technologiques qui affectent la croissance de *S. aureus*, l'expression des gènes et la production d'entérotoxines pendant la fabrication de fromage à pâte pressée non cuite, l'impact de différents paramètres du procédé a été étudié à l'aide d'un plan d'expériences fractionnaire. En se basant sur les résultats d'une enquête sur les pratiques des fabricants de fromages à pâte pressée non cuite, cinq paramètres technologiques du procédé de fabrication et leurs deux valeurs extrêmes ont été sélectionnés pour cette étude : la température de maturation du lait, la durée de maturation du lait, le brassage au cours de la maturation, le brassage du caillé après découpage et la durée du pressage des fromages. Le comportement de quatre souches productrices, respectivement, des entérotoxines A, B, C ou D, indépendamment inoculées à 10^3 ufc/ml dans le lait a été suivi au cours des 72 premières heures de la fabrication. Quels que soient les paramètres testés ou les souches étudiées, la population de *S. aureus* atteint au moins 10^5 ufc/g de fromage 4 heures après le moulage. Au cours des 32 fabrications fromagères, SED était la seule entérotoxine détectée, en quantité très faible et variable en fonction des paramètres étudiés. La quantité maximale a été mesurée 4 heures après le moulage et était corrélée à une expression précoce du gène au cours de la fabrication (moins de 6 heures après l'emprésurage du lait). En outre, l'analyse des résultats du plan d'expériences fractionnaire a montré que la température de maturation du lait était le paramètre technologique clé pour contrôler la production de SED au cours de fabrications de fromages à pâte pressée non cuite.

**STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN GENE EXPRESSION AND PRODUCTION
DURING THE MANUFACTURING OF UNCOOKED SEMI-HARD CHEESE**

Manon Duquenne^{a,d}, Isabelle Fleurot^a, Marina Aigle^a, Claire Darrigo^a, Jacques Antoine Hennekinne^b, Isabelle Papinaud^b, Sylviane Derzelle^d, Marielle Bouix^c, Véronique Deperrois-Lafarge^d, Agnès Delacroix-Buchet^{a*}

^a UR888 Bactéries Lactiques et Pathogènes Opportunistes, INRA, Jouy en Josas, France

^b Unité Caractérisation des Toxines, AFSSA LERQAP, Maisons Alfort, France

^c UMR782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, INRA, AgroParisTech,
Thiverval-Grignon, France

^d Unité Hygiène et Microbiologie des Produits Alimentaires, AFSSA LERQAP, Maisons
Alfort, France

* Corresponding author: E-mail: Agnes.Delacroix-Buchet@jouy.inra.fr; Tel.: +33 1 34 65 20
92; Fax: +33 1 34 65 20 65

ABSTRACT

In France *Staphylococcus aureus* is reported to be the most frequent pathogen involved in food-borne diseases associated with milk and dairy products. Food poisoning results from ingestion of staphylococcal enterotoxins (SE) preformed in food by enterotoxigenic strains of *S. aureus*. In order to identify key technological parameters affecting *S. aureus* growth, enterotoxin gene expression and enterotoxin production during cheese manufacture, the impact of varying certain process parameters was studied with a fractional factorial experimental design. Based on a survey of practices performed amongst semi-hard cheese manufacturers, five technological parameters of the cheese-making process and their two reported extreme values were selected for the present study, i. e. milk maturation temperature, milk maturation time, stirring during maturation, curd stirring time and pressing time. The behavior of four enterotoxigenic strains producing enterotoxin A, B, C or D, respectively, and independently inoculated at 10^3 cfu/ml in milk was monitored. Whatever the parameters and the strains tested, the *S. aureus* population was found to exceed 10^5 cfu/g of cheese four hours after molding. In the 32 different cheese productions, SED was the only enterotoxin detected, and then in very low and variable quantities depending on the parameters studied. Its maximal amount was quantified four hours after molding, suggesting that SED production is correlated with an early gene expression during cheese processing (less than 6 hours after milk renneting). Moreover, the fractional factorial design analysis showed that milk maturation temperature is the key technological parameter for SED production control during semi-hard cheese processing.

Keywords

Staphylococcus aureus, gene expression, enterotoxin, cheese manufacture

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is a ubiquitous bacterium and also the most important pathogen of the staphylococci genus. This bacterium is isolated from both community-acquired and nosocomial infections and is recognized as being the second cause of food-poisoning worldwide. In France *S. aureus* is reported as the most frequent pathogen involved in foodborne diseases associated with dairy products (Delmas, Gallay et al. 2006) and especially with raw milk cheeses (De Buyser, Dufour et al. 2001). Soft and uncooked semi-hard cheeses are the types of cheese most often involved in food-poisoning outbreaks (Meyrand and Vernozy-Rozand 1999; De Buyser, Dufour et al. 2001). For example, *S. aureus* has recently been responsible for foodborne diseases associated with mashed potatoes made with raw milk in Norway (Jorgensen, Mathisen et al. 2005), pasteurized milk products in Austria (Schmid, Fretz et al. 2009), reconstituted milk in Japan (Ikeda, Tamate et al. 2005) and Minas cheese in Brazil (Simeão do Carmo, Dias et al. 2002).

S. aureus can be carried by healthy humans and warm-blooded animals on mucous membranes and skin (Williams 1963). When infecting the udders of cows and other mammals (goats, sheeps), it causes mastitis and may result in raw milk or raw milk cheeses contamination. Staphylococcal contamination can also occur during the manufacture of cheese with pasteurized milk under inadequate hygienic conditions. Once in the milk, the bacterium can produce staphylococcal enterotoxins (SEs) responsible, after consumption, for food poisoning characterized by symptoms such as nausea, vomiting, abdominal cramps and diarrhea (Balaban and Rasooly 2000). The European Community regulation N°2073/2005 modified by the Regulation N°1441/2007 (Anonymous 2007), relative to microbiological criteria applicable to foodstuffs, imposes the enumeration of the coagulase-positive staphylococci at the cheese-making stage where their number is expected to be the highest. Above a threshold of 10^5 coagulase-positive staphylococci per gram of cheese, industrialists

are obliged to screen for SEs. If SEs are detected, products have to be destroyed, recalled or withdrawn from the market resulting in substantial economic loss. It is therefore of major interest to both limit the production of SEs during the cheese-making process and determine the peak level of *S. aureus* during cheese manufacturing.

At the present, in addition to the 5 well-known SEs, SEA to SEE, for which commercial detection kits are available (Hennekinne, Guillier et al.), 6 confirmed SEs (SEG to SEI, SER to SET) (Su and Wong 1995; Munson, Tremaine et al. 1998; Lina, Bohach et al. 2004; Ono, Omoe et al. 2008) and 10 staphylococcal enterotoxin-like superantigens (SEIs) (Zhang, Iandolo et al. 1998; Fitzgerald, Monday et al. 2001; Jarraud, Peyrat et al. 2001; Orwin, Leung et al. 2001; Orwin, Leung et al. 2002; Letertre, Perelle et al. 2003; Orwin, Fitzgerald et al. 2003; Lina, Bohach et al. 2004; Omoe, Imanishi et al. 2005; Thomas, Jarraud et al. 2006) have been described. Only SEA, SEB, SEC, SED and SEH have been clearly involved in staphylococcal food-poisoning outbreaks. Many studies have investigated the conditions in which *S. aureus* is capable of producing SEA, SEB, SEC and SED in laboratory media or in foodstuffs, including a few concerning the cheese-making process. Different technological parameters, such as starter culture, milk and curd heating temperature or stirring conditions, are applied throughout the cheese-making process and induce different environmental conditions (i.e. pH, temperature or oxygen disponibility) that affect *S. aureus* growth and enterotoxin production (Genigeorgis and Sadler 1966; Genigeorgis, Foda et al. 1971; Barber and Deibel 1972; Haines and Harmon 1973; Jarvis, Lawrence et al. 1973). Among them, the pH at 6 h during cheese manufacturing has been pointed out to be an important factor in controlling *S. aureus* growth (Delbes, Alomar et al. 2006). *S. aureus* growth has been shown to occur mainly during the first 24 hours of cheese manufacturing (Otero, García et al. 1993; Meyrand, Boutrand-Loei et al. 1998; Hamama, El Hankouri et al. 2002; Delbes, Alomar et al. 2006). However, SEs are not always detected in the final product

even if the staphylococci population reaches a value above 10^5 cfu/g of cheese (Nunez, Bautista et al. 1988; Otero, Garcia et al. 1988; Otero, García et al. 1993; Delbes, Alomar et al. 2006; Aoyama, Takahashi et al. 2008).

There is, however, a strong need to investigate the impact of technological parameters on enterotoxin gene expression and production during cheese manufacturing. We have recently developed a rapid and efficient toolbox to extract and monitor bacterial RNA in cheese (Duquenne, Fleurot et al.). The objective of the present study was to identify the key technological parameters manufacturers can use to limit the risk of SE production. An additional goal was to gain more information on staphylococcal enterotoxin gene (*ses*) regulation during this process. A survey on industrial practices amongst uncooked semi-hard cheese French manufacturers has been conducted to identify the “potentially interesting” technological parameters to work with. This survey underscored that milk maturation temperature, milk maturation time, stirring during maturation, curd stirring time and pressing time were among the variable parameters. These parameters have been selected on the basis of the known environmental conditions that can inhibit or induce *S. aureus* development and their impact on enterotoxin gene expression and production during the cheese-making process of uncooked semi-hard cheese has been analyzed using a fractional factorial experimental design. Thirty two cheese manufacturing cycles were run using pasteurized milk inoculated at 10^3 cfu/ml with one out of four enterotoxigenic strains. The strains used were isolated from cheeses. Each produces one of the 4 well-known SEs, SEA, SEB, SEC or SED.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

Four *Staphylococcus aureus* strains isolated from cheese were used throughout this study. *S. aureus* 432G, CIM479, CIM441 and CIM433 possessed respectively, among others, the enterotoxin A gene (*sea*), the enterotoxin B gene (*seb*), the enterotoxin C gene (*sec*) and the enterotoxin D gene (*sed*) (Table 1). These four enterotoxins were those that we could quantify using the confirmatory method (Hennekinne, Guillier et al. 2007) of the European Union Community Reference Laboratory for coagulase-positive staphylococci (EU CRL for CPS).

The industrial lyophilized starter culture (Ezal MA400 and MY800, Danisco, Dangé, Saint Romain, France), stored at -20°C, included *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Inoculum preparation for cheese manufacture

Once *S. aureus* strains, stored at -80°C, had been grown on BHI agar plate at 37°C overnight, one colony was pre-cultured into 10 ml BHI broth at 37°C with shaking for 8 h. 100 µl of this pre-culture was then added into 100 ml of BHI broth and the culture was incubated 4 h at 37°C without shaking so that *S. aureus* was in exponential growth phase at the time of milk inoculation for cheese manufacture.

Aliquots of the lyophilized starter culture were weighed and distributed in sterile tubes to obtain an inoculum of 0.5 U / 100 l of milk, then prepared according to the manufacturer's instructions. Just before use, the aliquot was dissolved in pasteurized milk taken from the cheese vat and then poured back into the vat to ensure good homogenization.

Uncooked semi-hard cheese process

Raw cow's milk cooled at 4°C was collected from the Viltain farm in Jouy-en-Josas (bulk milk from one herd of 300 dairy cows, with good microbiological quality; licensed to sell raw milk). It was transported to the P2-level experimental cheese plant at INRA Jouy-en-Josas, the day before cheese-making. Once the milk fat and protein composition had been standardized so that fat content was equal to 95% of the total nitrogen content, the milk was pasteurized 30 s at 72°C and stored at 4°C pending cheese manufacturing.

Uncooked semi-hard cheeses were prepared in controlled bacteriological conditions in the P2-level experimental plant in which 4 automated 20-l tanks made it possible to perform 4 simultaneous manufacturing cycles with the 4 *S. aureus* strains under study. Cheeses were manufactured using different combinations of the 5 technological parameters under study (Tables 3 and 4). Following the addition of CaCl₂ (15.7 g/100 l of milk), 15 l of pasteurized milk pre-heated at 32 or 35°C were inoculated with *S. aureus* to a final concentration of 10³ cfu/ml and with starter culture to a final level of 0.5 U/100 l of MA400 and MY800. Milk was then matured for 15 or 45 min before renneting. The equivalent of 25 ml of filtered rennet extract (520 mg of chymosin/l, Berthelot, France) for 100 l of milk was added when the milk was matured at 35°C while the equivalent of 30 ml of extract was added when the milk was matured at 32°C. Coagulation then proceeded for about 45 min before the curd was cut into small cubes and, after slow stirring for 5 or 45 min, pre-pressed in whey for 30 min. The curd was finally cut into 8 equal parts, poured into molds and pressed. Whey draining was continued for 4 or 24 h while temperature slowly decreased to 16°C in 4 h. After they were taken out of the moulds, cheeses were salted for 5h in sterile brine (pH 5, 10°C), dried for 24 h and conditioned in plastic bags under vacuum. Model cheeses were approximately 250 g.

Physico-chemical, bacteriological, enterotoxin gene expression and enterotoxin production analyses were performed as described in figure 1.

Bacterial enumeration in cheeses

The staphylococci and starter growth in cheeses was estimated, as described by Duquenne *et al.* (Duquenne, Fleurot *et al.*), for the first three days of the cheese-making procedure.

Physico-chemical analysis

Milk and cheese pH were determined for each cheese at each time of sampling with an 1140 pH meter (Mettler-Toledo S.A., Viroflay, France) equipped with a LoT406-M6-DXK-S7/25 penetration electrode (Mettler-Toledo S.A.). Chemical analyses were performed on raw milk, on milk after pasteurization and on 1-day-old cheeses (before brining except for chloride measurement). Milk fat content was obtained using the acido-butyrometric method of Gerber, according to IDF Norm 105 (Anonymous 1981) and the milk protein rate was determined by the amido-black dye-binding method (Anonymous 1985). Cheese dry matter content was measured using a halogen moisture analyzer (Precisa XM 60, Precisa Instrument Ltd., Dietikon, Switzerland), and the cheese fat content was determined using the Heiss butyrometric method (Heiss 1966) modified according to Pien (Pien 1976). NaCl cheese content was determined with a potential chloride analyzer (Corning Ltd, Essex, England).

Enterotoxin genes expression analysis

Enterotoxin gene expression was analyzed by RT-qPCR analysis of RNA extracted from cheese as described by Duquenne *et al.* (Duquenne, Fleurot *et al.*) with the use of the 3 reference genes, *pta*, *gyrB* and *rpoB*, shown to be stably expressed during cheese

manufacturing. Oligonucleotides for real-time qPCR (Table 2) had already been described (Duquenne, Fleurot et al.) or were designed using Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) or Primer 3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) and purchased from Eurogentec SA (Seraing, Belgium). Secondary structures were controlled with Oligo Calc (Kibbe 2007) and a BLAST analysis was performed to check primer specificity.

The cDNA levels were measured by real-time quantitative PCR using a LightCycler 480 Instrument System (Roche Diagnostics, Meylan, France) and the FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostiques). Each sample was tested in duplicate in a 96-well plate (Roche Diagnostiques). The reaction mix (20 μ l final) consisted of 2 μ l Mastermix (10 \times conc.), 2 μ l MgCl₂ (25 mM), 8.6 μ l PCR grade water, 1.2 μ l of each primer (300 nM final) and 5 μ l 2/5 dilution of cDNA. The absence of genomic DNA in RNA samples was checked by real-time qPCR before cDNA synthesis (minus RT control). A blank (No Template Control) was incorporated into each assay. The thermocycling program consisted of one hold at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 10 s at 95°C, 10 s at 60°C and 10 s at 72°C. Melting-curve data were then collected to check PCR specificity, contamination and the absence of primer dimers. The PCR efficiency (E) of each primer pair was determined by the dilution series method using cDNA as a template.

Each run was independently analyzed but we used a reference sample for each strain (RNA extracted from pure culture of the correspondent strain (data not shown)) so that results could be compared to each other. The C_T values calculated by the LightCycler software were exported to Excel for relative quantification analysis. The C_T values of each sample were transformed as described in the freely distributed geNorm user manual and by Duquenne *et al.* (Duquenne, Fleurot et al.).

Enterotoxin determination

Cheese samples (25 g) were tested for the presence of enterotoxins (A to E) 4 hours after molding and 24 and 72 hours after milk inoculation by using the European Screening Method-extraction followed by dialysis concentration coupled to a detection by Vidas SET 2 kit (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Samples found positive for enterotoxins by this test were further analyzed by using the EU CRL for CPS confirmatory method described by Hennekinne *et al.* (Hennekinne, Guillier *et al.* 2007) to determine the type of enterotoxin produced.

Experimental design and analysis

A fractional factorial experimental design was used to study the impact of 5 technological parameters on *S. aureus* during the first 3 days of the cheese manufacturing. Table 3 displays the value of the 5 control factors of the cheese-making process selected in this study. A standard orthogonal array $L_8(2^7)$ (Table 4) was used to examine this five-factor system. The L subscript, 8 in this case, denotes the number of experimental runs that would be conducted using this design and the 2^7 means that the array makes it possible to study 7 factors at 2 levels. The dual level of the 5 control factors were coded as 1 and -1. Columns of the orthogonal array correspond to control factors and rows correspond to the experiments to be carried out. The orthogonal array distributes the factor in a balanced manner; each level has an equal number of occurrences within each column. Moreover the relationship between one column and another is arranged so that for each level within one column, each level with any other column occurs an equal number of times. This orthogonality among columns is the basis of the statistical independence of orthogonal arrays and enables the effect of each factor to be separated from the others and the effects to be accurate and reproducible because the estimated effect does not include the effects of other factors.

The equation below illustrates the method of evaluating the effect E_{FR} of factor F on a response R where α_{Fi} is the level of factor F in the run i and R_i the value of the response R in the run i.

$$E_{FR} = \frac{\sum_{i=1}^8 \alpha_{Fi} \times R_i}{8} \quad (1)$$

A variance analysis can then be performed to determine which factors' effects were statistically significant. Staphylococcal population, enterotoxin gene expression and enterotoxin production were considered to be the responses.

RESULTS

Experimental design

Impact of the 5 selected technological parameters was examined using a fractional factorial experimental design. Table 3 displays the two-level values (corresponding to the extremes data reported in the industrial practice survey) of each control factor evaluated in this study. A standard orthogonal array $L_8(2^7)$ was used to classify this five-factor system (Table 4). Eight experimental runs have to be conducted for each *S. aureus* strain using this design. A total of 32 cheese productions were performed in a P2-level experimental plant in order to provide industrial conditions.

Physico-chemical properties of milk and uncooked semi-hard cheeses

After standardization and pasteurization, the milk used for the cheese manufacturing contained on average 29.7 ± 1.6 g protein /l and 31.7 ± 3.1 g fat /l. Its initial pH was 6.5 ± 0.1 . The mean dry matter, fat content and moisture on fat-free basis (MFFB) of the 32 resulting one-day-old cheeses were respectively 48.1 ± 2.4 % (w/w), 22.9 ± 1.9 % (w/w) and 67.2 ± 1.9 % (w/w). They contained on average 2.1 ± 0.4 % (w/w) of NaCl. The pH decrease

of all cheeses was slow during milk coagulation, accelerated from the molding to reach values between 5.1 and 5.8 in 6 hours (Figure 2 and Additional file 1) and finally slowed down to reach the pH usually obtained by industrialists for uncooked semi-hard cheese, around 5 ± 0.1 .

S. aureus growth during uncooked semi-hard cheese manufacture

S. aureus absence was checked in all pasteurized milk samples collected just before inoculation. No differences between the counts of 432G, CIM479, CIM441 and CIM433 were observed during the different experimental runs (Figure 3 and Additional file 2). Even between the different runs, the staphylococcal count 4 h after molding reached similar values, around $1.4 \times 10^6 \pm 4.6 \times 10^5$ cfu/g of cheese inoculated with the strain CIM433 (Figure 3), despite different pH values, from 5.4 in the run 2 to 6.1 in the last run (8th) (Figure 2). *S. aureus* grew rapidly during the first 6 hours of the cheese manufacturing. Afterward, once the population had reached a peak value, it remained stable until 72 h after milk inoculation.

Staphylococcal enterotoxin gene expression and production during the manufacturing of uncooked semi-hard cheese

Total bacterial RNAs were extracted from cheeses at 7 steps of each experimental run and found to be suitable for RT-qPCR analyses. The average $A_{260}:A_{230}$ and $A_{260}:A_{280}$ ratios of the 224 samples were respectively 2.1 ± 0.4 and 2.1 ± 0.1 . Their RIN value measured was around 9.7 ± 0.5 . Raw qPCR data of the 3 reference genes used (i.e. *gyrB*, *pta* and *rpoB*) were similar in the 224 samples (e.g. *pta* C_t were around 28.2 ± 1). In contrast, the *sec* average absolute abundance was 40 times lower than the one of *sed*. The *sed* mean expression level during cheese manufacturing was the highest among the 4 enterotoxin genes analyzed. *sea* and *seb* average absolute abundances were slightly lower (less than 10 times) than that of *sed*.

Normalized expression level of *sea*, *seb*, *sec* and *sed* genes is reported on figure 4. The results were calculated relative to calibrator samples obtained from independent and pure culture of each *S. aureus* strains used in this study (data not shown). The amount of *sea* transcripts remained relatively unchanged whatever the growth phase or the technological step of the cheese-making process in the 8 runs. *seb* expression was slightly induced in late stationary growth phase, at least 24 h after cheese molding. The *sec* transcription profile throughout the cheese-making process did not present any common pattern in the different runs. In contrast, the *sed* expression profile was the same in 7 of the 8 runs, with a 2.4 ± 0.5 fold raise of the transcript abundance at the beginning of the stationary growth phase, 4 to 6 h after molding, followed by an expression level decrease during the well-established stationary growth phase. In the last run (run 8), the mRNA level induction occurred only 24 h after molding.

Concerning SEs production, SED was the only enterotoxin detected in the cheeses. Cheeses inoculated with *S. aureus* CIM433 contained from 0.06 ng SED/g of cheese in the first run to non detectable quantities in the last (8th) run 4 h after molding (Table 5). The concentration of SED in cheeses was slightly lower 24 and 72 hours after molding.

Results of the experimental design

As SED was the only detected enterotoxin, we focused our analyses on cheeses inoculated with the strain CIM433. The effect of the 5 parameters studied was calculated on data obtained 4 h after molding since it was at this point in time that the *S. aureus* population as well as *sed* gene expression and SED production reached maximal values. As represented in figure 5, the milk maturation temperature (A) and time (B) during uncooked semi-hard cheese manufacturing were found to significantly affect SED production (p-value < 0.05). The observed effect is maximal 4 h after molding but much lower 24 to 72 hours later. Two

other factors, i.e. stirring during maturation (C) and curd stirring time (D), were also found to act slightly on SED production. The positive values obtained for these four technological parameters indicate that the first trial level (coded as 1) of each factor (i.e. a maturation temperature of 35°C, a maturation time of 45 min, no stirring during maturation and a curd stirring of 45 min) tends to increase the value of the response, i.e. SED production. The 5 technological factors had no statistically significant impact on *S. aureus* growth or on *sed* gene expression level. Consequently, to limit SED production during the cheese-making process, it is better to work with a short maturation time (15 min instead of a longer duration) and at a lower temperature (32°C instead of 35°C).

DISCUSSION

In this work we examined the influence of 5 technological parameters on the enterotoxigenic behavior of *S. aureus* inoculated at the beginning of uncooked semi-hard cheese manufacturing. *S. aureus* was inoculated with a pre-culture in exponential growth phase to reduce the re-growth phase. As a result, whatever the experimental run and in less than 3 h, from an inoculum of 10^3 cfu/ml the *S. aureus* population reached the threshold of 10^5 cfu/g of cheese stated by the European Community Regulation. Although this increase might be partly explained by a concentration effect resulting from the physical entrapment of cells in the cheese curd (Tatini, Jezeski et al. 1971), the exponential growth of *S. aureus* and the peak level occurred within less than 6 hours after cheese molding. Similar observations have previously been pointed out for other cheese models: the uncooked semi-hard cheeses Saint-Nectaire (Meyrand and Vernozy-Rozand 1999; Delbes, Alomar et al. 2006), Reblochon (Meyrand and Vernozy-Rozand 1999) and Salers (Delbes, Alomar et al. 2006). The population remained stable thereafter for the next 3 days. Consequently, to “respond” to the

European Community Regulation, it can be recommended that enumeration of *S. aureus* (by industrialists) be performed within the first 3 days.

A second important observation, which concords with previous studies (Nunez, Bautista et al. 1988; Otero, Garcia et al. 1988; Otero, García et al. 1993; Delbes, Alomar et al. 2006; Aoyama, Takahashi et al. 2008), is that even if the threshold of 10^5 *S. aureus* cfu/g of cheese is reached, SEs are not always detected. In this study, only SED production was detected and it was in very low quantities in the cheeses. It is interesting to correlate this result with data from the French National Reference laboratory for coagulase-positive staphylococcus which highlights that SED is the enterotoxin most often found in cheeses contaminated with *S. aureus* (Hennekinne, personal communication). Moreover, it is surprising to note that SED concentrations were found to be maximal 4 h after cheese molding and decrease within the first day of cheese manufacturing. This decreasing low quantity of SED measured in cheeses led us to wonder whether SEs could, partly or preferentially, pass into the whey recovered from the cheese-making process. They are indeed soluble proteins (Le Loir, Baron et al. 2003) and obviously produced in early stages of the cheese-making process. Consequently, they could already be present in cheese curd as well as in the whey recovered when phase separation occurs (i.e. at the end of curd stirring and pre-pressing or during pressing). In an additional experiment carried out under the present run 1 conditions from milk inoculated with CIM433 at 10^4 cfu/ml, SED was detected in the whey recovered during curd pressing (data not shown) which would tend to confirm our hypothesis.

In this study, non detection in cheese of SEA, SEB and SEC was correlated with a lower absolute expression level of *sea*, *seb* and *sec* compared to that of *sed*. That some strains of *S. aureus* do not produce detectable amounts of some SE in spite of the proven transcription of the corresponding *se* genes has already been pointed out by Omoe *et al.*

(Omoe, Ishikawa et al. 2002). These results could be explained by assuming that (i) SE production goes together with *se* gene expression and that (ii) a threshold in the *se* mRNA level has to be crossed to get production of a detectable amount of SE by *S. aureus*. A correlation between the *se* mRNA level and SE production has already been shown in laboratory broth for SEA (Borst and Betley 1994) and SEB (Gaskill and Khan 1988) as well as for SED in cheese (Duquenne, Fleurot et al.). Our hypotheses also tend to be confirmed by the fact that SED was detected in the 7 experimental runs in which *sed* expression was induced early while non-induction or late induction (24 h after molding) of *se* gene expression is associated to non-detection of the corresponding SE.

Previous work has highlighted that *seb*, *sec* and *sed* are induced during the transition from the exponential to stationary growth phases while the growth phase has no significant impact on the *sea* expression level (Derzelle, Dilasser et al. 2009). An unchanged *sea* expression level was also observed during *S. aureus* growth in cheese by Duquenne *et al.* (Duquenne, Fleurot et al.) and in the present study. As reported for the strain CIM433 grown in BHI (Derzelle, Dilasser et al. 2009), the *sed* expression level in the strain was also modestly induced during the cheese-making process. Similar results, e.g. light *sed* induction during *S. aureus* growth in cheese, were also observed with milk contaminated at 10^3 or 10^4 cfu/ml with a second *sed*⁺ strain (361F) (Duquenne, Fleurot et al.).

While a 10 to 100-fold induction of *seb* and *sec* expression has previously been reported during *S. aureus* CIM441 and CIM479 growth in BHI broth (Derzelle, Dilasser et al. 2009), such an induction was not reproduced during growth in cheese. Unlike *sea* expression, *seb*, *sec* and *sed* expression is known to be regulated by the *agr* (accessory gene regulator) system (Gaskill and Khan 1988; Bayles and Iandolo 1989; Regassa, Couch et al. 1991; Tremaine, Brockman et al. 1993; Zhang and Stewart 2000) which encodes a putative two-component signal with a density-dependant regulatory element detecting an octapeptide (Ji,

Beavis et al. 1995). The *agr*-dependant activation is maximal in the late exponential growth phase. In a model of continuous culture technique, the minimum cell density predicted to promote specific *agr*-controlled expression was shown to be 1.2×10^8 *S. aureus* cfu/ml (Wright and Holland 2003). This density threshold was reached by *S. aureus* in a study performed in BHI broth (Derzelle, Dilasser et al. 2009) but not in the cheese of this work. This difference might explain the discrepancy noted for the dynamic of *seb* and *sec* expression between the studies and suggests that *sed* regulation could be slightly different from that of *seb* and *sec*. The early induction of *sed* during cheese manufacturing might be the reason why SED is the enterotoxin the most often found in cheese.

The type of fractional factorial experimental design used throughout this work, called Taguchi experimental design or Hadamard's matrix, has already been applied to improve the activity of microorganisms of industrial interest, such as, for example, the decolorization of olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum* (Assas, Marouani et al. 2000), the asymmetric reduction of ethyl 4-chloro acetoacetate by bakers' yeast (Houng, Hsu et al. 2003) or the surfactin production by *Bacillus subtilis* (Wei, Lai et al. 2007). The use of such an experimental design made it possible to evaluate the effect of 5 technological parameters on *S. aureus* development during the cheese-making process with a limited number of experimental runs, i.e. only 8 runs instead of the 32 runs of a classical experimental design (including all possible combination of the 5 parameters). The fractional factorial experimental design has been shown to lead to the same results as those obtained with a traditional and complete experimental design to assess the effects of multiple variables in the tumour microenvironment (Morsi, Yong et al. 2004). Nevertheless, the fractional experimental design cannot replace classical experimental design and is rather a first step to pick the key variables that have a real impact on the object of study (Zhou, Pan et al. 2008), here the development of *S. aureus*. In this study, it pinpointed 2 key technological factors to

control the SED production by *S. aureus* during uncooked semi-hard cheese manufacturing: milk maturation temperature and milk maturation time, the temperature effect being larger than the time effect.

To conclude, the first step of the cheese-making process, milk maturation, appears to be a key technological step in the fight against *S. aureus* in cheeses. It is therefore to be recommended that high temperature and long maturation be avoided to limit the risk linked to *S. aureus* SE production during the cheese-making process. Further studies are however still necessary to better clarify the probable correlation between SE gene expression and production.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Chizuko Sakamoto (third-year university student) for her help in cheese manufacturing and analyses. We are grateful to Marc Danzart for assisting with the experimental design and for his many constructive comments. We thank the Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL) for kindly providing the results of a survey on industrial practices and Emmanuel Jamet for providing strains and helpful discussions on the choice of studied parameters.

This work was carried out, as part of the project SEFRO, with the financial support from the Agence Nationale de la Recherche (the French National Research Agency) under the Programme National de Recherche en Alimentation et nutrition humaine, project ANR06-PNRA029. The P2-level experimental cheese plant acquisition was supported by Ile-de-France. The 2100 BioAnalyzer Agilent was provided by the PICT platform at INRA Jouy-en-Josas.

REFERENCES

- Anonymous (1981). "IDF 105 - Milk - Determination of fat content."
- Anonymous (1985). "IDF 098A - Milk - Determination of protein content."
- Anonymous (2007). "Commission regulation n°1441/2007 of 5 december 2007." OJEU **L322**: 12-29.
- Aoyama, K., C. Takahashi, et al. (2008). "[Examination of Staphylococcus aureus survival and growth during cheese-making process]." Shokuhin Eiseigaku Zasshi **49**(2): 116-23.
- Assas, N., L. Marouani, et al. (2000). "Scale down and optimization of olive mill wastewaters decolorization by Geotrichum candidum." Bioprocess and Biosystems Engineering **22**(6): 503-507.
- Balaban, N. and A. Rasooly (2000). "Staphylococcal enterotoxins." Int J Food Microbiol **61**(1): 1-10.
- Barber, L. E. and R. H. Deibel (1972). "Effect of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausage." Appl Microbiol **24**(6): 891-8.
- Bayles, K. W. and J. J. Iandolo (1989). "Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D." J Bacteriol **171**(9): 4799-806.
- Borst, D. W. and M. J. Betley (1994). "Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression correlate with sea allele class." Infect Immun **62**(1): 113-8.
- De Buyser, M.-L., B. Dufour, et al. (2001). "Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries." International Journal of Food Microbiology **67**(1-2): 1-17.

- Delbes, C., J. Alomar, et al. (2006). "Staphylococcus aureus growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows' raw milk." J Food Prot **69**(9): 2161-7.
- Delmas, G., A. Gallay, et al. (2006). "Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005." BEH **51-52**: 418-422.
- Derzelle, S., F. Dilasser, et al. (2009). "Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth." Food Microbiol **26**: 896-904.
- Duquenne, M., I. Fleurot, et al. "A Toolbox To Quantify Staphylococcal Enterotoxin Gene Expression In Cheese." Appl Environ Microbiol **in revision**.
- Fitzgerald, J. R., S. R. Monday, et al. (2001). "Characterization of a putative pathogenicity island from bovine Staphylococcus aureus encoding multiple superantigens." J Bacteriol **183**(1): 63-70.
- Gaskill, M. E. and S. A. Khan (1988). "Regulation of the enterotoxin B gene in Staphylococcus aureus." J Biol Chem **263**(13): 6276-80.
- Genigeorgis, C., M. S. Foda, et al. (1971). "Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production." Appl Microbiol **21**(5): 862-6.
- Genigeorgis, C. and W. W. Sadler (1966). "Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin B production." J Bacteriol **92**(5): 1383-7.
- Haines, W. C. and L. G. Harmon (1973). "Effect of selected lactic acid bacteria on growth of Staphylococcus aureus and production of enterotoxin." Appl Microbiol **25**(3): 436-41.
- Hamama, A., N. El Hankouri, et al. (2002). "Fate of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in the presence of nisin-producing Lactococcus lactis strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese." International Dairy Journal **12**(11): 933-938.

- Heiss, E. (1966). "Rapid method for the determination of fat in cheese." Deutsche Molkerei-Zeitung **82**: 67-70.
- Hennekinne, J. A., F. Guillier, et al. (2007). "Intralaboratory validation according to the EN ISO 16 140 Standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products." Journal of Applied Microbiology **102**: 1261-72.
- Houng, J. Y., H. F. Hsu, et al. (2003). "Applying the Taguchi robust design to the optimization of the asymmetric reduction of ethyl 4-chloro acetoacetate by bakers' yeast." J Biotechnol **100**(3): 239-50.
- Ikeda, T., N. Tamate, et al. (2005). "Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H." Appl Environ Microbiol **71**(5): 2793-5.
- Jarraud, S., M. A. Peyrat, et al. (2001). "egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*." J Immunol **166**(1): 669-77.
- Jarvis, A. W., R. C. Lawrence, et al. (1973). "Production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C under conditions of controlled pH and aeration." Infect Immun **7**(6): 847-54.
- Ji, G., R. C. Beavis, et al. (1995). "Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12055-9.
- Jorgensen, H. J., T. Mathisen, et al. (2005). "An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk." FEMS Microbiol Lett **252**(2): 267-72.
- Kibbe, W. A. (2007). "OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator." Nucleic Acids Res **35**(Web Server issue): W43-6.

- Le Loir, Y., F. Baron, et al. (2003). "Staphylococcus aureus and food poisoning." Genet Mol Res **2**(1): 63-76.
- Letertre, C., S. Perelle, et al. (2003). "Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of Staphylococcus aureus." J Appl Microbiol **95**(1): 38-43.
- Lina, G., G. A. Bohach, et al. (2004). "Standard nomenclature for the superantigens expressed by Staphylococcus." J Infect Dis **189**(12): 2334-6.
- Meyrand, A., S. Boutrand-Loei, et al. (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**(3): 537-44.
- Meyrand, A. and C. Vernozy-Rozand (1999). "Croissance et entérotoxinogénèse de staphylococcus aureus dans différents fromages." Rev. Med. Vet. **150**(7): 601-616.
- Morsi, H., K. L. Yong, et al. (2004). "Evaluation of the Taguchi methods for the simultaneous assessment of the effects of multiple variables in the tumour microenvironment." Int Semin Surg Oncol **1**(1): 7.
- Munson, S. H., M. T. Tremaine, et al. (1998). "Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from Staphylococcus aureus." Infect Immun **66**(7): 3337-48.
- Nunez, M., L. Bautista, et al. (1988). "Staphylococcus aureus, thermostable nuclease and staphylococcal enterotoxins in raw ewes' milk Manchego cheese." J Appl Bacteriol **65**(1): 29-34.
- Omoe, K., K. Imanishi, et al. (2005). "Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P." Infect Immun **73**(9): 5540-6.
- Omoe, K., M. Ishikawa, et al. (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): 857-62.

- Ono, H. K., K. Omoe, et al. (2008). "Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T." Infect Immun **76**(11): 4999-5005.
- Orwin, P. M., J. R. Fitzgerald, et al. (2003). "Characterization of Staphylococcus aureus enterotoxin L." Infect Immun **71**(5): 2916-9.
- Orwin, P. M., D. Y. Leung, et al. (2001). "Biochemical and biological properties of Staphylococcal enterotoxin K." Infect Immun **69**(1): 360-6.
- Orwin, P. M., D. Y. Leung, et al. (2002). "Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins." Biochemistry **41**(47): 14033-40.
- Otero, A., M. C. Garcia, et al. (1988). "Behaviour of Staphylococcus aureus strains, producers of enterotoxins C1 or C2, during the manufacture and storage of Burgos cheese." J Appl Bacteriol **64**(2): 117-22.
- Otero, A., M. C. García, et al. (1993). "Behaviour of Staphylococcus aureus strains FRI 137 and FRI 361 during the manufacture and ripening of manchego cheese." International Dairy Journal **3**(1): 85-96.
- Pien, J. (1976). "Détermination du taux de matière grasse des fromages." Tech Lait **878**: 15-17.
- Regassa, L. B., J. L. Couch, et al. (1991). "Steady-state staphylococcal enterotoxin type C mRNA is affected by a product of the accessory gene regulator (agr) and by glucose." Infect Immun **59**(3): 955-62.
- Schmid, D., R. Fretz, et al. (2009). "Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria." Wien Klin Wochenschr **121**(3-4): 125-31.

- Simeão do Carmo, L., R. S. Dias, et al. (2002). "Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil." Food Microbiology **19**(1): 9-14.
- Su, Y. C. and A. C. Wong (1995). "Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H." Appl Environ Microbiol **61**(4): 1438-43.
- Tatini, S. R., J. J. Jezeski, et al. (1971). "Production of staphylococcal enterotoxin A in cheddar and colby cheese." J Dairy Sci **54**(6): 815-25.
- Thomas, D. Y., S. Jarraud, et al. (2006). "Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster." Infect Immun **74**(8): 4724-34.
- Tremaine, M. T., D. K. Brockman, et al. (1993). "Staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression is not affected by the accessory gene regulator (agr)." Infect Immun **61**(1): 356-9.
- Wei, Y.-H., C.-C. Lai, et al. (2007). "Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332." Process Biochemistry **42**(1): 40-45.
- Williams, R. E. (1963). "Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance." Bacteriol Rev **27**: 56-71.
- Wright, J. D. and K. T. Holland (2003). "The effect of cell density and specific growth rate on accessory gene regulator and toxic shock syndrome toxin-1 gene expression in *Staphylococcus aureus*." FEMS Microbiol Lett **218**(2): 377-83.
- Zhang, S., J. J. Iandolo, et al. (1998). "The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej)." FEMS Microbiol Lett **168**(2): 227-33.

Zhang, S. and G. C. Stewart (2000). "Characterization of the promoter elements for the staphylococcal enterotoxin D gene." J Bacteriol **182**(8): 2321-5.

Zhou, X. X., Y. J. Pan, et al. (2008). "Optimization of medium composition for nisin fermentation with response surface methodology." J Food Sci **73**(6): M245-9.

FIGURES

FIGURE 1. Flowchart of the semi-hard cheese manufacture and sampling steps.

A: microbiological analyses, B: staphylococcal enterotoxin gene expression analyses, C: enterotoxin quantification and D: physical-chemical analyses

FIGURE 2. pH evolution in the first 24 h of the 8 experimental runs of uncooked semi-hard cheese manufacture inoculated with *Staphylococcus aureus* CIM433.

FIGURE 3. Growth of *Staphylococcus aureus* CIM433 count during the 8 experimental runs of uncooked semi-hard cheese manufacture.

FIGURE 4. *sea*, *seb*, *sec* and *sed* expression levels during growth of *Staphylococcus aureus* 432G (a), CIM479 (b), CIM441 (c) and CIM433 (d) in uncooked semi-hard cheeses.

FIGURE 5. Effect of milk maturation temperature (A), milk maturation time (B), stirring during milk maturation (C), curd stirring (D) and pressing time (E) on staphylococcal enterotoxin D in uncooked semi-hard cheese 4 h after molding (■), 24 h after molding (■) and 72 h after molding (□).

ADDITIONAL FILES

ADDITIONAL FILE 1. pH evolution in the first 24 h of the 8 experimental runs of uncooked semi-hard cheese manufacture inoculated with *Staphylococcus aureus* 432G (a), CIM479 (b) and CIM441 (c).

ADDITIONAL FILE 2. Growth of *Staphylococcus aureus* 432G (a), CIM479 (b) and CIM441 (c) count during the 8 experimental runs of uncooked semi-hard cheese manufacture.

TABLES

TABLE 1. *Staphylococcus aureus* strains used in this study

Strains	Origin	Staphylococcal enterotoxin genes
432G ^a	Raw ewe milk cheese	<i>sea</i>
CIM479 ^b	Cheese	<i>seb, seg, sei, sem, seo, ser</i>
CIM441 ^b	Cheese	<i>sec, seg, sei, sel, sem, sen, seo</i>
CIM433 ^b	Cheese	<i>sed, sej, ser</i>

^a AFSSA LERQAP (Maisons Alfort, France)

^b ARILAIT (Paris, France)

TABLE 2. Primer sequences for qPCR analysis.

Gene name	Primer sequence	Amplicon length (bp)	Reference
<i>sea</i>	F : TTCACAGATCACCCATGGTATAAC R : CCGCACATTGATAACCATAATAAG	121	This study
<i>seb</i>	F : GTGCAGGCATCATGTCATAC R : TGACTGCTCAAGAATTAGATTACC	147	This study
<i>sec</i>	F : AATCAACCGTTTTATTGTCGTTG R : TTAACAGTTCACCATATGAAACAGG	147	This study
<i>sed</i>	F : GATCTCCTGTACTTTTTATTTCTCC R : AAACGTTAAAGCCAATGAAAAC	149	This study
<i>gyrB</i>	F : CCAGGTAAATTAGCCGATTGC R : AAATCGCCTGCGTTCTAGAG	121	(Duquenne, Fleurot et al.)
<i>pta</i>	F : AAAGCGCCAGGTGCTAAATTAC R : CTGGACCAACTGCATCATATCC	121	(Duquenne, Fleurot et al.)
<i>rpoB</i>	F : GCGAACATGCAACGTCAAG R : GACCTCTGTGCTTAGCTGTAATAGC	121	(Duquenne, Fleurot et al.)

TABLE 3. Definition and trial level of factors in the orthogonal array experiment

Factor	Variable	Level 1	Level -1
A	Maturation temperature (°C) / Rennet quantity (ml/100 l of milk)	35 / 25	32 / 30
B	Maturation time (min)	45	15
C	Stirring during maturation	With	Without
D	Curd stirring (min)	45	5
E	Pressing time (h)	4	16

TABLE 4. Experimental design L₈(2⁷)

Run	A	B	/	C	/	E	D
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	-1	-1	-1	-1
3	1	-1	-1	1	1	-1	-1
4	1	-1	-1	-1	-1	1	1
5	-1	1	-1	1	-1	1	-1
6	-1	1	-1	-1	1	-1	1
7	-1	-1	1	1	-1	-1	1
8	-1	-1	1	-1	1	1	-1

TABLE 5. Staphylococcal enterotoxin D production in cheeses inoculated with *S. aureus* CIM433 (ng/g).

	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	Run 6	Run 7	Run 8
M+4h	0.06	0.05	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	ND
M+24h	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	ND
M+72h	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.01	0.02	ND

ND, not detected

FIGURES

FIG. 1. Flowchart of the semi-hard cheese manufacture and sampling steps.

A: microbiological analyses, B: staphylococcal enterotoxin gene expression analyses, C: enterotoxin quantification and D: physical-chemical analyses

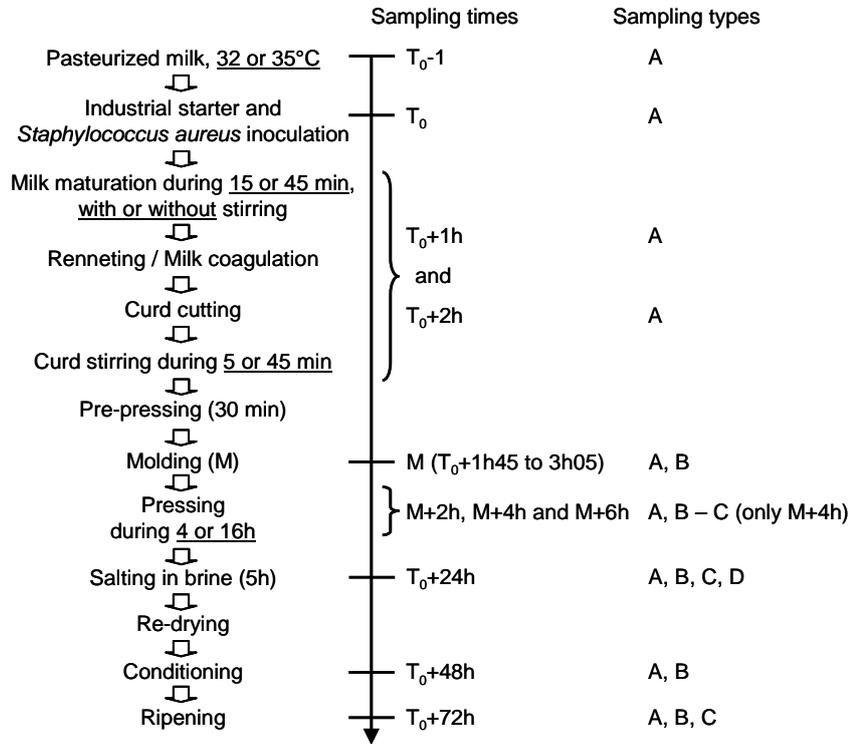


FIG. 2. pH evolution in the first 24 h of the 8 experimental runs of uncooked semi-hard cheese manufacture inoculated with *Staphylococcus aureus* CIM433.

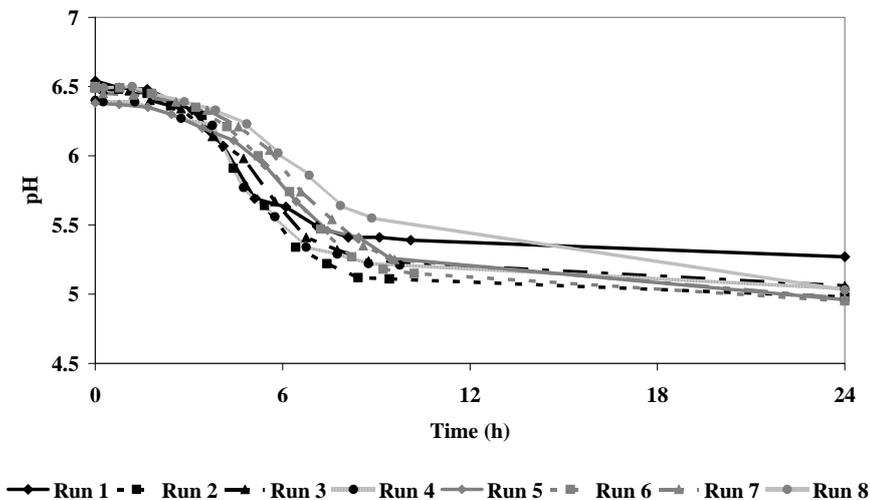


FIG. 3. Growth of *Staphylococcus aureus* CIM433 count during the 8 experimental runs of uncooked semi-hard cheese manufacture.

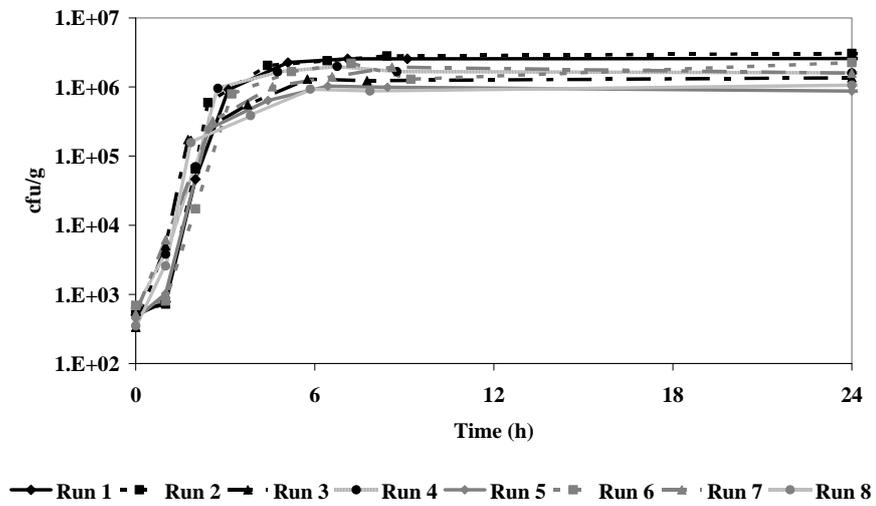


FIG. 4. *sea*, *seb*, *sec* and *sed* expression levels during growth of *Staphylococcus aureus* 432G

(a), CIM479 (b), CIM441 (c) and CIM433 (d) in uncooked semi-hard cheeses.

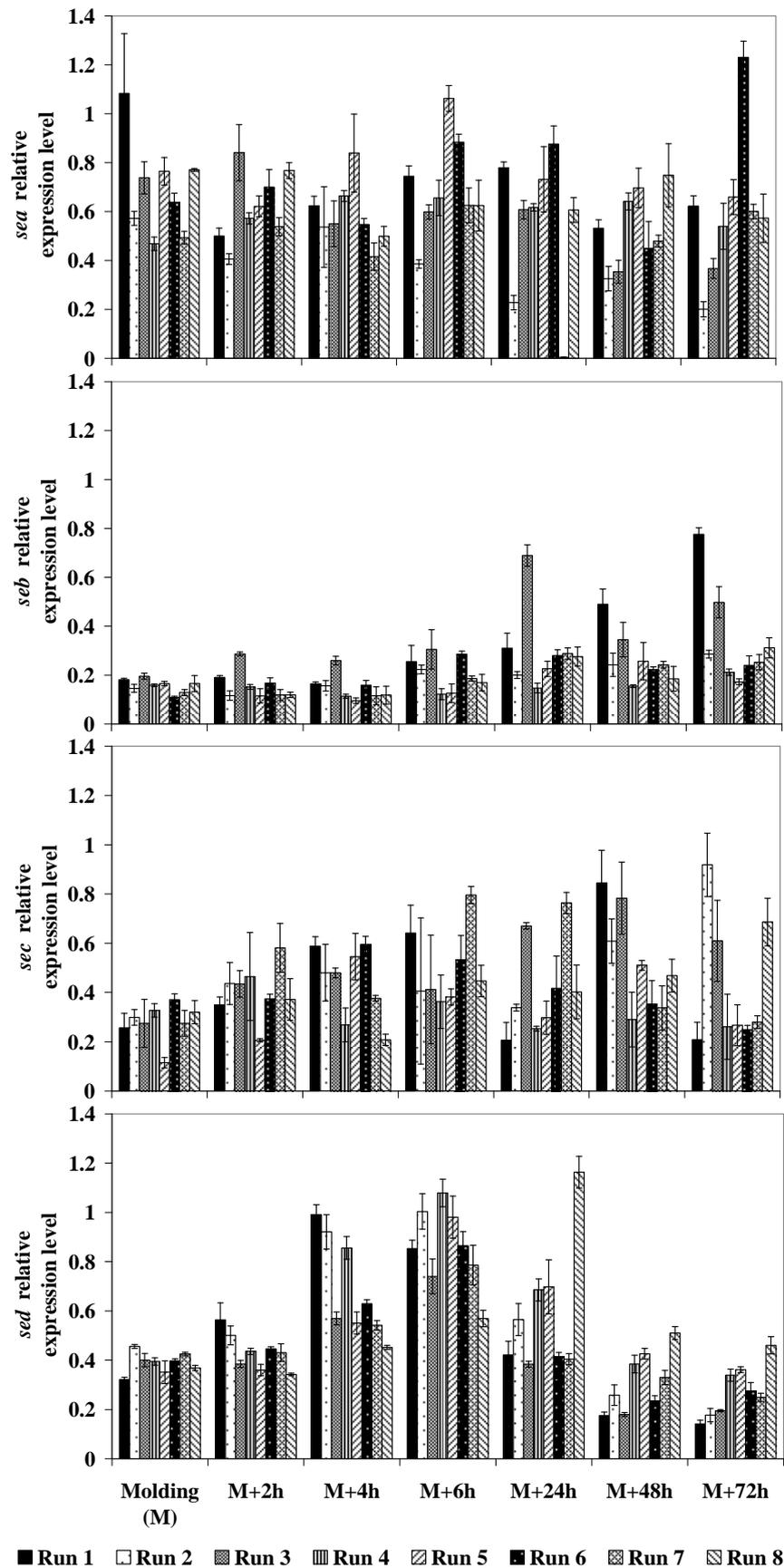
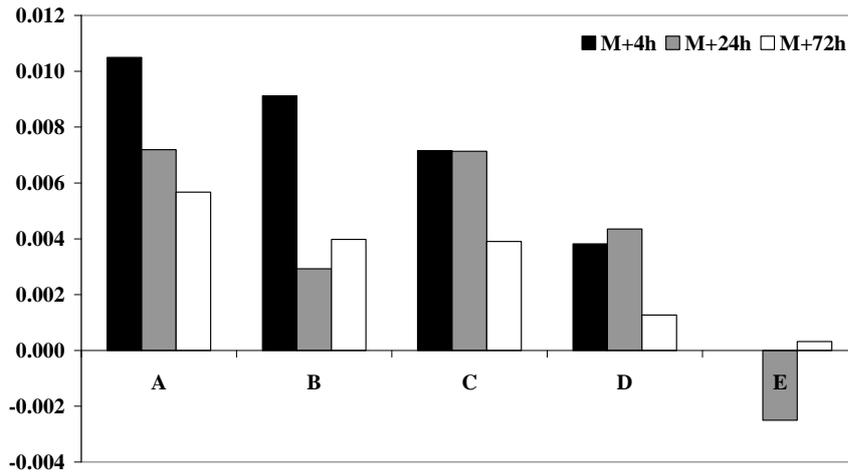
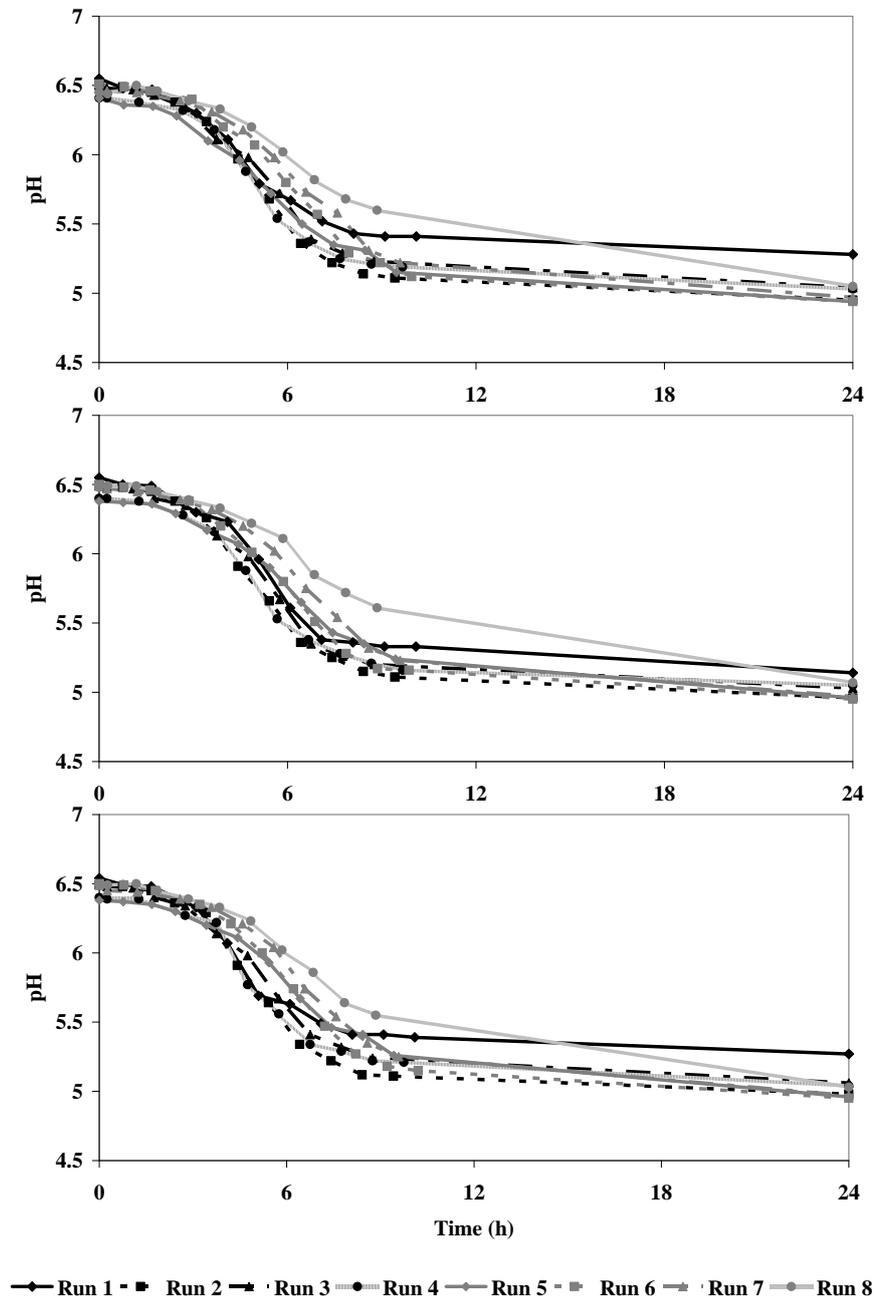


FIG. 5. Effect of milk maturation temperature (A), milk maturation time (B), stirring during milk maturation (C), curd stirring (D) and pressing time (E) on staphylococcal enterotoxin D in uncooked semi-hard cheese 4 h after molding (■), 24 h after molding (■) and 72 h after molding (□).

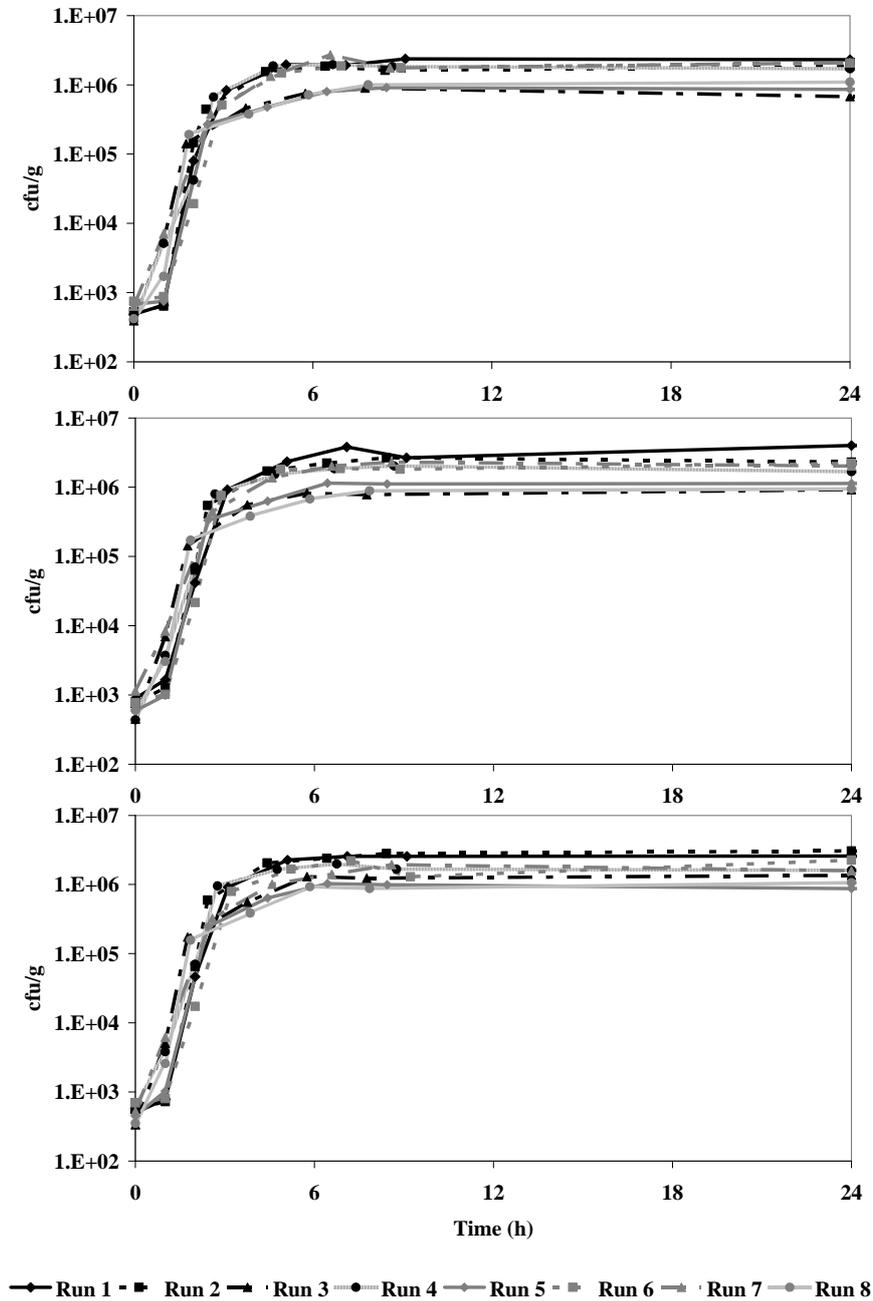


ADDITIONAL FILES

Additional file 1. pH evolution in the first 24 h of the 8 experimental runs of uncooked semi-hard cheese manufacture inoculated with *Staphylococcus aureus* 432G (a), CIM479 (b) and CIM441 (c).



Additional file 2. Growth of *Staphylococcus aureus* 432G (a), CIM479 (b) and CIM441 (c) count during the 8 experimental runs of uncooked semi-hard cheese manufacture.



3. Conclusion

Comme dans les précédentes études en fromage (Tableau 5), *S. aureus* croît très rapidement au cours des premières heures de la fabrication de fromages. Après avoir atteint son maximum 4 à 6 heures après le moulage, la population reste constante jusqu'à 72 h après l'emprésurage des fromages. Le comportement des 4 souches est similaire et, bien que la population de *S. aureus* soit supérieure à 10^5 ufc/g dans tous les fromages, seule l'entérotoxine D a été détectée.

La quantité maximale de SED a été mesurée 4 heures après le moulage. Dans les fromages âgés de 24 h, la concentration en SED décroît légèrement. Les entérotoxines étant des protéines solubles, nous avons avancé l'hypothèse d'une éventuelle « perte » des SE dans le lactosérum issu de la fabrication. Cette hypothèse a été vérifiée par une expérience complémentaire et a été approfondie dans la suite de ce travail.

Au niveau moléculaire, la détection de SED dans les fromages est corrélée *i-* à une expression plus importante du gène *sed* par rapport à *sea*, *seb* et *sec* au cours de la fabrication mais aussi *ii-* à une induction précoce du gène au cours de la fabrication. Ces observations suggèrent que la production de SE dans le fromage est étroitement liée au niveau d'expression du gène correspondant et/ou qu'un niveau « seuil » d'ARNm doit être atteint au cours de la fabrication pour qu'une quantité détectable de SE soit produite. Bien que l'expression des gènes *seb*, *sec* et *sed* soit régulée par le système de régulation *agr* (Bayles et Iandolo, 1989; Gaskill et Khan, 1988; Regassa, *et coll.*, 1991; Zhang et Stewart, 2000), le profil d'expression de *sed* se démarque nettement de ceux de *seb* et *sec*, suggérant que la régulation de *sed* pourrait être légèrement différente de celle des deux autres entérotoxines.

Au plan technologique, la température et la durée de maturation du lait en cuve sont parmi les cinq paramètres étudiés, ceux qui ont la plus grande incidence sur la production de SED dans les fromages. L'incidence de ces deux paramètres sur le comportement de *S. aureus* a été approfondie dans la suite de ce travail.

III – APPLICATION DE LA METHODE DES SURFACES DE REPONSES POUR MINIMISER LA PRODUCTION D’ENTEROTOXINE STAPHYLOCOCCIQUE PENDANT LA FABRICATION DE FROMAGES A PATE PRESSEE NON CUITE

1. Contexte et objectifs

Quelques modèles mathématiques ont été générés pour prédire le comportement de *S. aureus* en milieu de laboratoire ou en lait en fonction de la température, du pH, de la concentration en chlorure de sodium ou encore de la concentration initiale de *L. garviae* (Alomar, *et coll.*, 2008a; Fujikawa et Morozumi, 2006; McCann *et coll.*, 2003; Sutherland *et coll.*, 1994). Une seule de ces études a permis de modéliser la production de SE au cours de croissance de *S. aureus* en lait en fonction de la température (Fujikawa et Morozumi, 2006). Alomar *et coll.* ont validé leur modèle de la croissance de *S. aureus* en fonction de la température, du pH et de la concentration en *L. garviae* sur des fromages à pâte pressée non cuite (Alomar, *et coll.*, 2008a) mais aucune étude, jusqu’à présent, n’a permis la modélisation de la production de SE dans au cours de la transformation du lait en fromage.

Au cours de la fabrication de fromages, il a déjà été montré que la température du lait en cuve avait une incidence sur le comportement de *S. aureus* (Alomar, *et coll.*, 2008a; Gaya, *et coll.*, 1988). Les résultats de la seconde partie du travail de thèse confirment cet effet notamment sur la production de SE et indiquent que la durée de la maturation du lait pourrait aussi avoir un effet important.

La méthodologie des surfaces de réponses permet de générer un modèle mathématique qui décrit précisément les relations entre plusieurs variables explicatives et une ou plusieurs variables de réponses. Cette méthode est souvent utilisée dans l’industrie pour optimiser les procédés de production de diverses enzymes ou de produits biochimiques d’intérêt (Burkert *et coll.*, 2004; Tanyildizi *et coll.*, 2005; Tari *et coll.*, 2006; Vicente *et coll.*, 1998; Zhou *et coll.*, 2008).

Au cours de la troisième partie de cette thèse, nous avons appliqué cette méthodologie des surfaces de réponses en utilisant un plan d’expériences central composite pour modéliser l’effet de la température et du temps de maturation du lait en cuve sur l’expression des gènes et la production des entérotoxines staphylococciques dans le fromage.

Les résultats obtenus font l'objet d'une publication qui sera prochainement soumise au journal « International Journal of Food Microbiology ».

2. Article 3 : Application of the response surface methodology to minimize staphylococcal enterotoxin production during the manufacturing of uncooked semi-hard cheese

Résumé

La température et le temps de maturation du lait pourraient être les paramètres technologiques les plus pertinents à contrôler pour réduire la production d'entérotoxines staphylococciques au cours de la production de fromages à pâte pressée non cuite contaminés par une souche de *Staphylococcus aureus* productrice d'entérotoxines. A l'aide de la méthodologie des surfaces de réponses, nous avons examiné les effets de ces deux facteurs sur l'expression des gènes et la production d'entérotoxines staphylococciques. Deux séries de dix fabrications de fromages à pâte pressée non cuite ont été réalisées à partir de lait pasteurisé contaminé à 10^3 ufc/ml avec une souche de *S. aureus* productrice soit de SEA soit de SED. La quantité de SE produite a été évaluée dans le fromage et le lactosérum. Des modèles mathématiques ont été établis par la méthodologie des surfaces de réponses pour décrire la relation entre l'expression des gènes et la production d'entérotoxines et les deux paramètres de maturation du lait. Les équations polynomiales du second degré obtenues ont été validées par une troisième série de deux fabrications. Les conditions qui minimisent l'expression des gènes *se* et la production de SE ont été discutées. La température de maturation du lait apparaît comme le paramètre clé qui doit être contrôlé pour limiter le risque d'intoxication alimentaire par *S. aureus* dans les fromages à pâte pressée non cuite.

**APPLICATION OF THE RESPONSE SURFACE METHODOLOGY TO MINIMIZE
STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN PRODUCTION DURING THE
MANUFACTURING OF UNCOOKED SEMI-HARD CHEESE**

Manon Duquenne^{1,3}, Sylviane Derzelle³, Isabelle Fleurot¹, Marina Aigle¹, Claire Darrigo¹,
Jacques Antoine Hennekinne², Isabelle Papinaud², Marielle Bouix⁴, Véronique Deperrois-
Lafarge³, Agnès Delacroix-Buchet^{1*}

¹ UR888 Bactéries Lactiques et Pathogènes Opportunistes, INRA, Jouy en Josas, France

² Unité Caractérisation des Toxines, AFSSA LERQAP, Maisons Alfort, France

³ Unité Hygiène et Microbiologie des Produits Alimentaires, AFSSA LERQAP, Maisons
Alfort, France

⁴ UMR782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, INRA, AgroParisTech,
Thiverval-Grignon, France

* Corresponding author: E-mail: Agnes.Delacroix-Buchet@jouy.inra.fr; Tel.: +33 1 34 65 20
92; Fax: +33 1 34 65 20 65

Abstract

Milk maturation time and temperature could be relevant technological parameters to control and minimize staphylococcal enterotoxins production during the manufacture of uncooked semi-hard cheese contaminated with enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strain. Using a response surface methodology (RSM), we examined the effects of both factors on staphylococcal enterotoxin gene expression and production. Two sets of ten uncooked semi-hard cheese manufacturing cycles were run using pasteurized milk contaminated at 10^3 ufc/ml with SED-producing or SEA- and SED-producing strain. The produced SE amount was quantified in cheese and whey. Mathematical models were established by RSM to describe the relationship between staphylococcal enterotoxin gene expression and production and both milk maturation parameters. The calculated second-degree polynomial equations were validated by a third set of two experiments. The conditions that minimize *se* gene expression and SE production are discussed. Milk maturation temperature was demonstrated to be the key technological parameter that must be fixed to limit the risk of staphylococcal food poisoning.

Keywords

Staphylococcus aureus, enterotoxin, modeling, gene expression, cheese

1. Introduction

Cheese consists primarily of milk fat and coagulated proteins in which, among other characteristics, pH, water activity, redox potential, salt content and starter microorganisms activity constitute a good system to inhibit the growth of pathogenic bacteria. Nevertheless, dairy products, including cheese, can transmit pathogenic bacteria and can therefore be involved in outbreaks of infection associated with the consumption of dairy products. *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* are the predominant organisms responsible for food-poisoning by ingestion of dairy products (De Buyser, Dufour et al. 2001). *S. aureus* has recently been responsible for foodborne diseases associated with mashed potatoes made with raw milk in Norway (Jorgensen, Mathisen et al. 2005), pasteurized milk products in Austria (Schmid, Fretz et al. 2009), reconstituted milk in Japan (Ikeda, Tamate et al. 2005) and Minas cheese in Brazil (Simeão do Carmo, Dias et al. 2002). In France it is reported to be the most frequent pathogen involved in foodborne diseases associated with dairy products (Delmas, Gallay et al. 2006) and especially with raw milk cheeses (De Buyser, Dufour et al. 2001). Soft and uncooked semi-hard cheeses are the types of cheese most often involved in food-poisoning outbreaks (Meyrand and Vernozy-Rozand 1999; De Buyser, Dufour et al. 2001). The sources of contamination are raw milk, in case of raw milk cheese manufacture, or post-milk treatment (pasteurization or thermization) contamination with organisms originally derived from raw milk, from food handlers or from manufacturing environment. Food-poisoning caused by *S. aureus* is due to ingestion of staphylococcal enterotoxins (SEs) pre-formed in the food. It is characterized by symptoms such as nausea, vomiting, abdominal cramps and diarrhea (Balaban and Rasooly 2000),.

To avoid staphylococcal food poisonings, the European Community regulation N°2073/2005 modified by the regulation N°1441/2007 (Anonymous 2007), relative to

microbiological criteria applicable to foodstuffs, imposes the enumeration of the coagulase-positive staphylococci at the cheese-making stage where their number is expected to be the highest. In addition, above a threshold of 10^5 coagulase-positive staphylococci per gram of cheese, industrialists are obliged to check for SEs (Anonymous 2007). If SEs are detected, products have to be destroyed, recalled or withdrawn from the market resulting in substantial economic losses for the cheese-making industry. There is therefore a strong need to dispose of technological means to control and prevent SEs production in case of milk contamination by *S. aureus* during the cheese manufacturing.

Throughout the cheese-making process, different technological parameters, such as starter culture, milk and curd heating temperature or stirring condition, are applied to produce specific kind of cheese. These parameters induce various environmental conditions (i.e. pH, temperature or oxygenation) that affect *S. aureus* development and impact enterotoxin gene expression and production (Genigeorgis and Sadler 1966; Genigeorgis, Foda et al. 1971; Barber and Deibel 1972; Haines and Harmon 1973; Jarvis, Lawrence et al. 1973; Sutherland, Bayliss et al. 1994; Su and Wong 1998; Lanciotti, Sinigaglia et al. 2001; Lindqvist, Sylven et al. 2002; Alomar, Lebert et al. 2008). To analyze a multivariable system, a classical method, also called one-variable-at-a-time technique, is time consuming and cannot be used to study the interactions between variables. In contrast, a response surface methodology (RSM) is an efficient strategy to generate a mathematical model that accurately describes the relationships between several explanatory variables and one or more response variables. RSM is a group of mathematical and statistical procedures for model building. In the recent year, it has been widely applied in the process optimization studies to improve the yield and the production of various enzymes or other biochemical products of interest (Vicente, Coteron et al. 1998; Burkert, Maugeri et al. 2004; Tanyildizi, Özer et al. 2005; Tari, Genckal et al. 2006; Zhou, Pan et al. 2008).

In a recent study aiming at identifying some technological parameters relevant to control SE production during the manufacture of uncooked semi-hard cheese, we had pointed out that milk maturation temperature and milk maturation time could be key factors to minimize SE production in cheese (Duquenne, Fleurot et al. b). The individual effect of those parameters had been examined using a fractional factorial experimental design involving two levels of each factors studied. In the present work, we have used a RSM approach with a central composite design (CCD) to further examine the effects of both factors (milk maturation time and temperature) on staphylococcal enterotoxin gene expression and production. Two sets of ten uncooked semi-hard cheese manufacturing cycles were run using pasteurized milk inoculated at 10^3 cfu/ml with one out of two *S. aureus* enterotoxinogenic strains producing either SED or SEA and SED. Staphylococcal enterotoxin gene expression and production were monitored during the cheese-making process and the produced SEs amounts were quantified in cheese and in whey recovered from the process. The calculated second-degree polynomial models obtained were validated with a third set of two experiments. The conditions that minimize the responses are discussed.

2. Materials and Methods

2.1 Bacterial strains and preparation of the inoculum for cheese manufacture

Strain CIM433 is a *Staphylococcus aureus* isolate collected from a cheese by Arilait (Paris, France). It harbours among other the enterotoxin D gene (*sed*). *S. aureus* strain 361F has been isolated from a raw ewe milk cheese implicated in a food-borne outbreak (De Buyser, Janin et al. 1985). It carries on the enterotoxin A and D genes (*sea* and *sed*).

The industrial lyophilized starter culture (Ezal MA400 and MY800, Danisco, Dangé, Saint Romain, France), used for the acidification of milk during the cheese-making process, was stored at -20°C . It includes *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp.

cremoris, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

S. aureus and starter culture inoculum preparations for the cheese manufacturing were performed as described by Duquenne *et al.* (Duquenne, Fleurot *et al.* b).

2.2 Uncooked semi-hard cheese process

Raw cow's milk cooled at 4°C was collected from the Viltain farm in Jouy-en-Josas (herd of 300 dairy cows) and transported to the P2-level experimental cheese plant at INRA Jouy-en-Josas the day before the cheese-making. Once the milk fat and protein composition had been standardized so that fat content was equal to 95% of the total nitrogen content, the milk was pasteurized 30 s at 72°C and stored at 4°C pending cheese manufacturing. Uncooked semi-hard cheeses were prepared in controlled bacteriological conditions using two automated 20-l tanks. Following the addition of CaCl₂ (15.7 g/100 l of milk), 15 l of pasteurized milk were pre-heated at a set temperature (T 32 – 38°C) and inoculated with *S. aureus* to a final concentration of 10³ cfu/ml and starter culture to a final level of 0.5 U/100 l of MA400 and MY800. Milk was matured for a given time (t 15 – 45 min) with stirring before the addition of a quantity of filtered rennet extract (520 mg of chymosin/l, Berthelot, France) depending on the set temperature T . Coagulation then proceeded for about 45 min. The curd was then cut into cubes and, after a slow stirring for 25 min, pre-pressed in whey for 30 min. The curd was finally cut into eight equal parts, poured into molds and pressed for 4 h while temperature slowly decreased to 16°C. After they were taken out of the molds, cheeses were dried at 16°C overnight. The quantity of whey extracted *i*- from the draining, *ii*- after pre-pressing, *iii*- 10 min after molding and *iv*- 4 h after molding, and the cheese weight were measured.

2.3 Cheese analyses

Physical-chemical, bacteriological, enterotoxin genes expression and enterotoxin production analyses were performed as described in previous work (Duquenne, Fleurot et al. a; Duquenne, Fleurot et al. b) at the sampling step described on figure 1.

2.3.1 Physico-chemical analyses

Milk and cheese pH were determined at each sampling step. The fat and protein content of raw and pasteurized milk, as well as the dry matter and fat content of 1-day-old cheeses, were measured using the methods previously reported.

2.3.2 Bacteriological analyses

Staphylococci and starter growth in cheeses was monitored during the first 24 hours of the cheese-making procedure.

2.3.3 Staphylococcal enterotoxin gene expression

Total RNA was extracted from cheese and relative enterotoxin gene expression was followed by RT-qPCR analysis. Primers used for real-time qPCR are listed on Table 1.

2.3.4 Enterotoxin determination

Cheese and whey samples were tested for the presence of enterotoxins (A to E) by using the European Screening Method consisting in an extraction-dialysis concentration step coupled to a detection step using the Vidas SET2 kit (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Cheeses (25 g) were sampled 4 hours after molding and 24 hours after milk inoculation. The whey was collected *i-* during the whey draining, *ii-* at the end of the curd pre-pressing, *iii-* 10 min and *iv-* 4 h after molding. Samples found positive for enterotoxins by this test were further analyzed by using the confirmatory method of the European Union Community Reference Laboratory for coagulase positive staphylococci (Hennekinne, Guillier et al. 2007) to determine the type of enterotoxin produced.

2.4 Experimental design and data analysis

A Central Composite Design (CCD) was chosen to investigate the effect of two input variables (i.e. milk maturation temperature (T) and milk maturation time (t)) on two output responses (i.e. relative *se* gene expression levels and SE production). A CCD with five coded levels consisting in a set of 10 runs was employed. The values used for both variables are shown in Table 2. The milk maturation time t was set from 15 to 45 min according to a survey on industrial practices we conducted amongst uncooked semi-hard cheese French manufacturers. The milk maturation temperature T ranged from 32 to 45°C to match and extend the range reported by the survey.

RSM consists in a group of statistical and mathematical procedures that generate mathematical models describing the relationships between a number of explanatory variables and one or more response variables. Using RSM, the quantitative form of the relationship between a desired response and two input variables can be expressed by the following second-order polynomial equation:

$$Z_i = f_i(X, Y) = a_i + b_i \cdot X + c_i \cdot Y + d_i \cdot X^2 + e_i \cdot Y^2 + g_i \cdot X \cdot Y \quad (1)$$

Where Z_i is the estimated value of the desired response i , f_i represents the response function, X and Y are the two independent variables and a_i , b_i , c_i , d_i , e_i and g_i are calculated regression coefficient.

The appropriate approximation of Z_i is derived by fitting the experimental data with the quadratic model using regression technique. Regression analysis and generation of response surface plots were performed using the Matlab software (Version 7.7 (R2008b)) (Mathworks, Natick, MA, USA). The quality of the fit of the polynomial models was expressed by the coefficient of determination R^2 , and its statistical significance was checked by a variance analysis (p -value). A subsequent confirmatory experiment (Table 2) was performed to validate each equation developed.

3. Results and discussion

3.1 Central composite design (CCD)

We have shown in a recent study that milk maturation time and milk maturation temperature are key factors to minimize SE production during the manufacture of uncooked semi-hard cheese (Duquenne, Fleurot et al. b). A response surface methodology approach using a CCD with 5 levels was therefore undertaken to further investigate the effects of both factors on staphylococcal enterotoxin gene expression and production and to evaluate their combined impact.

The experimental design carried out included the manufacturing of two sets of ten uncooked semi-hard cheese in a P2-level experimental plant. Twenty cheese manufacturing cycles were run using milk inoculated at 10^3 ufc/ml (half were inoculated with the *sed*⁺ CIM433 strain, half with the *sea*⁺ *sed*⁺ 361F strain) using different combinations of variables (Table 2). Five levels were tested for both variables, namely milk maturation temperature *T* and milk maturation time *t* (Table 2). Two supplementary experiments (one for each strain) were also achieved to validate the resulting regression models (run 11, Table 2).

3.2 Cheeses analyses

A flow chart of the uncooked semi-hard cheese process summarizing the different sampling steps and kinds of analyses performed at each steps are presented on figure 1.

The composition of milk and one-day-old cheese were reproducible in the different experimental runs. The pH of all cheeses first slightly decreased from 6.5 ± 0.02 to 6.4 ± 0.05 during milk coagulation. It then markedly dropped off from the molding to reach a value of 5.3 ± 0.1 in 6 hours and finally slowly declined to reach a pH around 5.1 ± 0.05 (data not shown).

No differences in the staphylococcal counts between the different runs and strains were observed. A similar value around $1.3 \times 10^6 \pm 3.2 \times 10^5$ cfu/g of cheese (data not shown) were measured 4 hours after molding. As previously described (Duquenne, Fleurot et al. b), *S. aureus* grew rapidly during the first 6 hours of the cheese manufacture and then the population remained stable till 24 h after milk inoculation.

Enterotoxin A and/or D were detected in all cheese samples as well as in all whey samples recovered from the molding. SEA was however present in non measurable quantities in all samples (data not shown), unlike SED which was quantified in cheese curd and whey recovered from molding in both sets of experiments (data not shown). Total SED amount produced by the bacteria throughout the whole cheese manufacture till 4 hours after molding (corresponding to the maximal SED concentration point in cheese (data not shown)) was evaluated and represented on Figure 2. Despite a similar kinetic of growth for both strains, the total content of SED produced during the cheese-making process was always found to be lower using strain 361F instead of strain CIM433.

The fraction of SE passed into the whey was found to vary from one run to another (ranging from 9% in the 8th run to 57% in the 10th run) but values were found similar in the same runs whatever the strains inoculated. It is interesting to note that a large part of produced SE could pass into the whey after molding. To our knowledge, until now the whey recovered from the cheese-making process after molding is not valorized by industrial cheese makers. Then, the presence of SE in the whey should not present a critical point for risk.

se gene expression was monitored by RT-qPCR using a modified delta-Ct relative quantification model, including PCR efficiency correction and multiple reference genes normalization as previously described (Duquenne, Fleurot et al. a). Expression level of *sea* and *sed*, given on Figure 3, were calculated relative to two calibrator samples obtained from independent and pure culture of strains CIM433 and 361F, respectively (data not shown). *sed*

relative expression level was found to peak (about two-fold increase) 4 hours after molding as expected (Duquenne, Fleurot et al. b). No clear pattern, common to all runs, could be noticed for *sea*. Its relative expression level was found to be either unchanged or slightly increasing throughout the cheese manufacturing. Being not produced in sufficient amount to be quantified, SEA production and relative *sea* gene expression were not further analyzed by RSM.

3.3 Response surface analysis

RSM analysis was carried out with the data obtained 4 h after cheese molding, as this sampling point represented the maximal values that could be reached for *S. aureus* growth, *sed* gene expression and SED production. Regression analysis was performed to fit three response functions (i.e. relative *sed* gene expression ratio between the sampling 4 h after molding and the sampling at molding (A), SED concentration in cheese (B) and total SED amount produced in cheese and whey (C)) with the experimental data. The calculated second-order regression models were given by the following equations:

$$Z_{A(CIM433)} = -104.772 + 5.729 \times T + 0.506 \times t - 0.078 \times T^2 - 0.003 \times t^2 - 0.010 \times T \times t \quad (2)$$

$$Z_{A(361F)} = -41.768 + 2.420 \times T + 0.229 \times t - 0.033 \times T^2 + 0.000 \times t^2 - 0.007 \times T \times t \quad (3)$$

$$Z_{B(CIM433)} = -1.234 + 0.063 \times T + 0.009 \times t - 0.001 \times T^2 + 0.000 \times t^2 + 0.000 \times T \times t \quad (4)$$

$$Z_{B(361F)} = 0.768 - 0.051 \times T + 0.006 \times t + 0.001 \times T^2 + 0.000 \times t^2 + 0.000 \times T \times t \quad (5)$$

$$Z_{C(CIM433)} = 4078.916 - 249.947 \times T + 4.456 \times t + 3.866 \times T^2 - 0.005 \times t^2 - 0.090 \times T \times t \quad (6)$$

$$Z_{C(361F)} = 4064.597 - 233.903 \times T - 6.282 \times t + 3.427 \times T^2 + 0.037 \times t^2 + 0.142 \times T \times t \quad (7)$$

The statistical significance of the different models was then checked. Calculated coefficient of determination (R^2) and p -values are presented in Table 3. A fit value (R^2), which corresponds to the fraction of variation of the response explained by the model, superior to 0.95 indicate a very good model with excellent predictive power for the desired

response. The analysis of variance reveals that the model for total SED production by CIM433 (Eq. 6) was appropriate ($R^2 = 0.978$, lack-of-fit value $p = 0.002$). For the two other responses, relative *sed* gene expression ratio and SED concentration in cheese, the values of R^2 were 0.903 and 0.853, respectively. This indicates that 85 to 90 % of the variability in the responses can be explained by the calculated prediction equations (Eq. 2 and Eq. 4). The latter responses were therefore still considered as adequately explained by the regression models. Concerning strain 361F, obtained results were less significant, with R^2 values for measuring accuracy of the fit ranging from 0.660 to 0.798. At least 66% of the total variation of the responses was still explained by the quadratic models obtained (Eq. 3, 5 and 7).

To confirm the fitting and validity of the various models, two validation runs were next carried out with new variables conditions for both factors. Results of the selected combination of milk maturation temperature (fixed at 34°C) and time (25 min), expressed as experimental and theoretical (predicted) values of the desired response are given in Table 4. The validation results demonstrated that the developed models for relative *sed* gene expression (equations 2 and 3) and for SED concentration in cheese (equation 4 especially) gave a good prediction. Considering the total SED amount produced, the quadratic models (equations 6 and 7) were found to be less accurate in prediction, with an undervaluation of the experimental value of about 1.7-fold, in spite of a very good determination coefficient ($R^2 = 0.978$) previously calculated for strain CIM433. Giving however a yet satisfying approximation, all regression models were considered as valid.

The three-dimensional response surface plots showing the effect of the milk maturation temperature and time on the desired responses are given in Figure 4. It can be seen, in Figure 4C, that the total quantity of SED produced by both *S. aureus* strains during the manufacture of uncooked semi-hard cheese increased with an increase of the temperature and that occurred almost independently of its duration. A positive relationship between milk

maturation temperature and SED concentration in cheese (4h after molding) also appears on Figure 4B, although the shape of the 3D surface responses obtained for both strains differs somewhat. In the latter responses, however, milk maturation time was also shown to affect SED concentration in cheese. Both response surfaces tended to increase in the direction of increasing temperature and increasing time. Minimal SED concentration in cheese would be thus expected with lower temperature and shorter time ($T = 32^{\circ}\text{C}$, $t \sim 15$ min). Explanation of the discrepancy observed between the responses for total SED produced and SED concentration in cheese is likely to be found in the variable fraction of SE passing into the whey during the cheese manufacturing, a process which depend itself on the technological variables applied (data not shown). The shape of prediction plots obtained for the relative *sed* gene expression ratio in both strains (Figure 4A) markedly differs. In the strain CIM433, minimal relative *sed* gene expression ratio would be obtained with high temperature and long time milk maturation ($T = 38^{\circ}\text{C}$, $t = 45$ min) but also, like with other responses, with low temperature and short time milk maturation ($T = 32^{\circ}\text{C}$, $t = 15$ min) (Figure 4A). In contrast to the previous responses obtained for the strain 361F, minimal relative *sed* gene expression ratio would be obtained with high temperature and long time of milk maturation ($T = 38^{\circ}\text{C}$, $t = 45$ min) (Figure 4A). This apparent discrepancy between relative *sed* gene expression ratio and total SED produced or SED concentration in cheese could be easily explained. The amount of SED measured 4 hours after molding represents the accumulation of SED produced since the start of the cheese-making process while the relative *sed* gene expression ratio measured 4 h after molding does not provide information on changes in the expression of gene between the molding and 4 h after molding. If the induction of *sed* gene expression occurred before or after 4 hours after the molding, it cannot be evaluated by the corresponding response expressed in term of relative *sed* expression ratio between the M+4h sampling and the M sampling in Figure 4A.

4. Conclusion

A RSM approach was applied for the first time to predict the production of staphylococcal enterotoxin during the manufacturing of cheese contaminated with *Staphylococcus aureus*. The technique was found to be efficient, relatively simple, time- and material-saving, as well as satisfying to build the corresponding mathematical models. Based on the RSM results, it can be said that the first step of the cheese-making process is the critical point to control staphylococcal enterotoxin production during the manufacture of uncooked semi-hard cheese. Minimal SED production can be achieved using low milk maturation temperature and time below 35°C and 30 minutes, respectively, with temperature being the major technological parameter that must be fixed to limit the risk of staphylococcal food poisoning, which is concordant with the results of Alomar *et al.* (Alomar, Lebert *et al.* 2008).

Acknowledgements

We thank Stéphanie Miclo (Second-year university student) for her help in cheese manufacture and analysis. We are grateful to Marc Danzart for assisting the experiment design and for his many constructive comments. We thank the PICT platform at INRA Jouy-en-Josas for the use of the 2100 BioAnalyzer Agilent.

This work was carried out, as part of the SEFRO project, with financial support of the Agence Nationale de la Recherche (the French National Research Agency) under the Programme National de Recherche en Alimentation et nutrition humaine, project ANR06-PNRA029. The P2-level experimental cheese plant acquisition was supported by Ile-de-France.

References

- Alomar, J., A. Lebert, et al. (2008). "Effect of temperature and pH on growth of *Staphylococcus aureus* in co-culture with *Lactococcus garvieae*." Curr Microbiol **56**(4): 408-12.
- Anonymous (2007). "Commission regulation n°1441/2007 of 5 december 2007." OJEU **L322**: 12-29.
- Balaban, N. and A. Rasooly (2000). "Staphylococcal enterotoxins." Int J Food Microbiol **61**(1): 1-10.
- Barber, L. E. and R. H. Deibel (1972). "Effect of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausage." Appl Microbiol **24**(6): 891-8.
- Burkert, J. F. M., F. Maugeri, et al. (2004). "Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design." Bioresource Technology **91**(1): 77-84.
- De Buyser, M.-L., B. Dufour, et al. (2001). "Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries." Int J Food Microbiol **67**(1-2): 1-17.
- De Buyser, M. L., F. Janin, et al. (1985). Contamination of ewe cheese with *Staphylococcus aureus*: study of an outbreak of food poisoning. The Staphylococci. J. Jeljaszewicz, Zbl. Bakt. Suppl. 14. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag: 677-678.
- Delmas, G., A. Gallay, et al. (2006). "Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005." BEH **51-52**: 418-422.
- Duquenne, M., I. Fleurot, et al. (a). "A Toolbox To Quantify Staphylococcal Enterotoxin Gene Expression In Cheese." Appl Environ Microbiol **submitted**.

- Duquenne, M., I. Fleurot, et al. (b). "Staphylococcal enterotoxin gene expression and production during the manufacturing of uncooked semi-hard cheese." Int J Food Microbiol **submitted**.
- Genigeorgis, C., M. S. Foda, et al. (1971). "Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production." Appl Microbiol **21**(5): 862-6.
- Genigeorgis, C. and W. W. Sadler (1966). "Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin B production." J Bacteriol **92**(5): 1383-7.
- Haines, W. C. and L. G. Harmon (1973). "Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin." Appl Microbiol **25**(3): 436-41.
- Hennekinne, J. A., F. Guillier, et al. (2007). "Intralaboratory validation according to the EN ISO 16 140 Standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products." Journal of Applied Microbiology **102**: 1261-72.
- Ikeda, T., N. Tamate, et al. (2005). "Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H." Appl Environ Microbiol **71**(5): 2793-5.
- Jarvis, A. W., R. C. Lawrence, et al. (1973). "Production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C under conditions of controlled pH and aeration." Infect Immun **7**(6): 847-54.
- Jorgensen, H. J., T. Mathisen, et al. (2005). "An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk." FEMS Microbiol Lett **252**(2): 267-72.
- Lanciotti, R., M. Sinigaglia, et al. (2001). "Growth/no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in model systems based on water activity, pH, temperature and ethanol concentration." Food Microbiology **18**(6): 659-668.

- Lindqvist, R., S. Sylven, et al. (2002). "Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk." Int J Food Microbiol **78**(1-2): 155-70.
- Meyrand, A. and C. Vernozy-Rozand (1999). "Croissance et entérotoxinogénèse de *staphylococcus aureus* dans différents fromages." Rev. Med. Vet. **150**(7): 601-616.
- Schmid, D., R. Fretz, et al. (2009). "Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria." Wien Klin Wochenschr **121**(3-4): 125-31.
- Simeão do Carmo, L., R. S. Dias, et al. (2002). "Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil." Food Microbiology **19**(1): 9-14.
- Su, Y. C. and A. C. Wong (1998). "Production of staphylococcal enterotoxin H under controlled pH and aeration." Int J Food Microbiol **39**(1-2): 87-91.
- Sutherland, J. P., A. J. Bayliss, et al. (1994). "Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride." Int J Food Microbiol **21**(3): 217-36.
- Tanyildizi, M. S., D. Özer, et al. (2005). "Optimization of [alpha]-amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology." Process Biochemistry **40**(7): 2291-2296.
- Tari, C., H. Genckal, et al. (2006). "Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21." Process Biochemistry **41**(3): 659-665.
- Vicente, G., A. Coteron, et al. (1998). "Application of the factorial design of experiments and response surface methodology to optimize biodiesel production." Industrial Crops and Products **8**(1): 29-35.

Zhou, X. X., Y. J. Pan, et al. (2008). "Optimization of medium composition for nisin fermentation with response surface methodology." J Food Sci **73**(6): M245-9.

FIGURES

FIGURE 1. Flowchart of the semi-hard cheese manufacture and sampling steps.

A: microbiological analyses, B: enterotoxin quantification, C: staphylococcal enterotoxin gene expression analyses, and D: physical-chemical analyses

FIGURE 2. Enterotoxin D produced by *S. aureus* CIM433 and 361F during the 11 runs of cheese manufacture.

FIGURE 3. *sea* and *sed* expression levels during growth of *Staphylococcus aureus* CIM433 (a) and 361F (b) in uncooked semi-hard cheeses.

FIGURE 4. Response surface plots showing the effects of milk maturation temperature and time on relative *sed* gene expression ratio (A), concentration of SED in cheese (B) or total SED amount produced (C) according to the *S. aureus* inoculated strain (CIM433 on the left and 361F on the right).

TABLES

TABLE 1. Primers used for qPCR analysis.

Gene name	Primer sequence	Amplicon length (bp)	Reference
<i>sea</i>	F : TCAATTTATGGCTAGACGGTAAACAA R : GAAGATCCAACCTCTGAACAGTTACA	93	(Duquenne, Fleurot et al. a)
<i>sed</i>	F : GATCTCCTGTACTTTTATTTTCTCC R : AAACGTTAAAGCCAATGAAAAC	149	(Duquenne, Fleurot et al. b)
<i>gyrB</i>	F : CCAGGTAAATTAGCCGATTGC R : AAATCGCCTGCGTTCTAGAG	121	(Duquenne, Fleurot et al. a)
<i>pta</i>	F : AAAGCGCCAGGTGCTAAATTAC R : CTGGACCAACTGCATCATATCC	121	(Duquenne, Fleurot et al. a)
<i>rpoB</i>	F : GCGAACATGCAACGTCAAG R : GACCTCTGTGCTTAGCTGTAATAGC	121	(Duquenne, Fleurot et al. a)

TABLE 2. The central composite design matrix employed for two independent variables.

Run	Temperature T (°C)	Time t (min)
1	35	30
2	35	30
3	32	30
4	38	30
5	35	15
6	35	45
7	32.88	19.39
8	32.88	40.61
9	37.12	19.39
10	37.12	40.61
<i>Validation run</i>	<i>34</i>	<i>25</i>

TABLE 3. Coefficient of determination R^2 and p -value of calculated second-order regression models.

	Second-order regression models of					
	Induction factor of <i>sed</i> gene expression		SED concentration in cheese		Total SED quantity	
	<i>CIM433</i>	<i>361F</i>	<i>CIM433</i>	<i>361F</i>	<i>CIM433</i>	<i>361F</i>
R^2	0.903	0.711	0.853	0.660	0.978	0.798
p -value	0.037	0.266	0.081	0.345	0.002	0.144

TABLE 4. Validation of the models with a supplementary experiment.

Milk maturation temperature T was fixed at 34°C and time t at 25 min.

Strains	Reponses					
	Induction factor of <i>sed</i> gene expression		SED concentration in cheese		Total SED quantity	
	Exp.	<i>Th.</i>	Exp.	<i>Th.</i>	Exp.	<i>Th.</i>
CIM433	2.26	2.57	0.085	0.049	145.47	81.60
361F	2.01	2.01	0.043	0.044	98.469	59.90

Exp., experimental value; *Th.*, theoretical value

FIGURES

FIG. 1. Flowchart of the semi-hard cheese manufacture and sampling steps.

A: microbiological analyses, B: enterotoxin quantification, C: staphylococcal enterotoxin gene expression analyses, and D: physical-chemical analyses

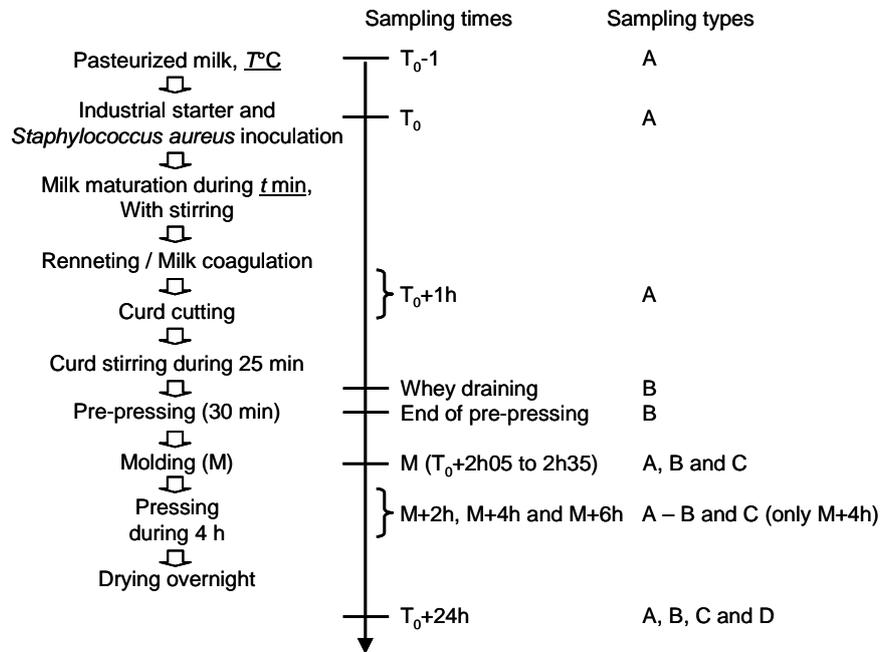


FIG. 2. Enterotoxin D produced by *S. aureus* CIM433 and 361F during the 11 runs of cheese manufacture.

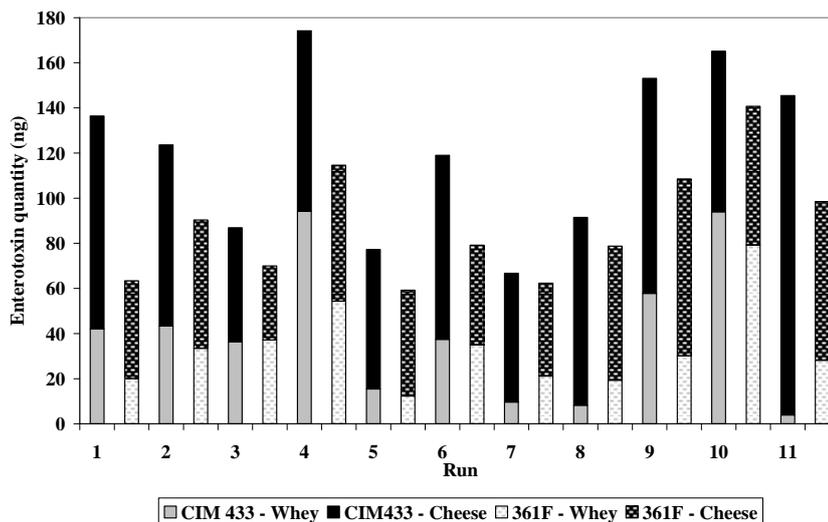


FIG. 3. *sea* and *sed* expression levels during growth of *Staphylococcus aureus* CIM433 (a) and 361F (b) in uncooked semi-hard cheeses.

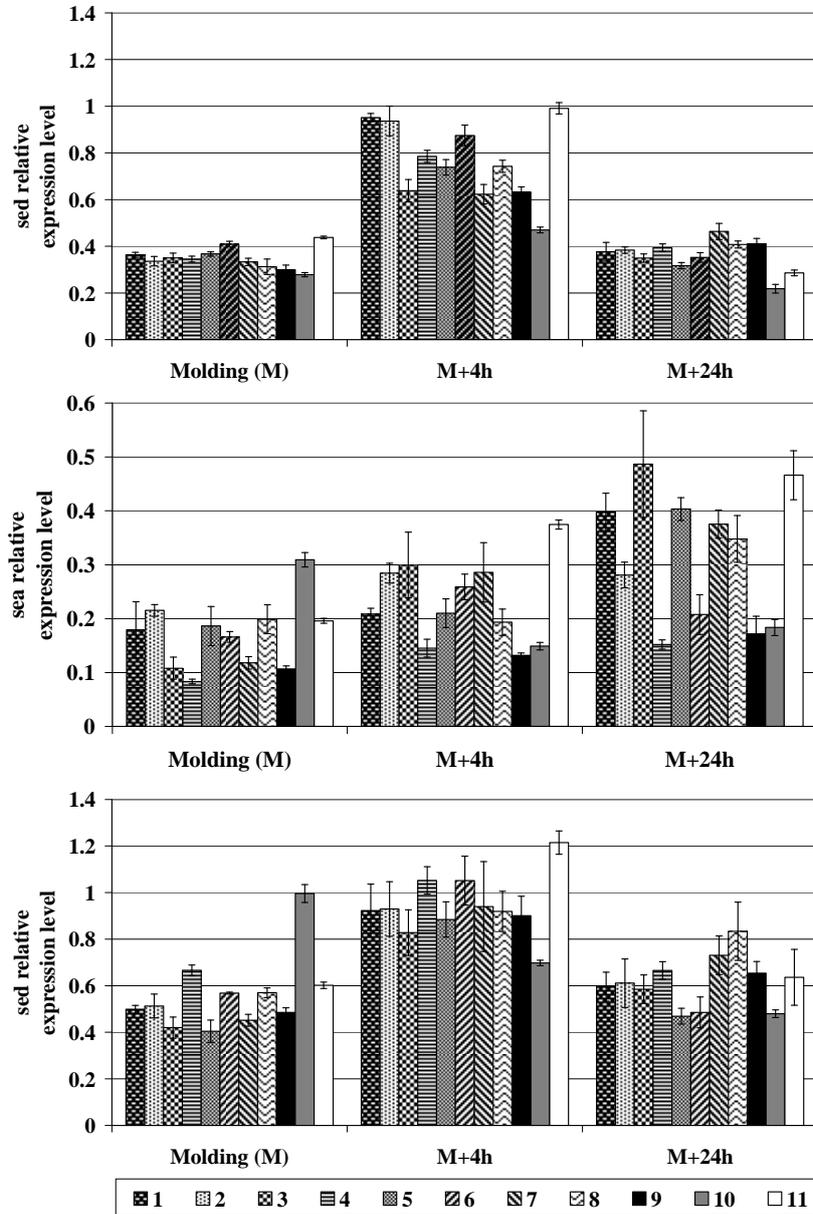
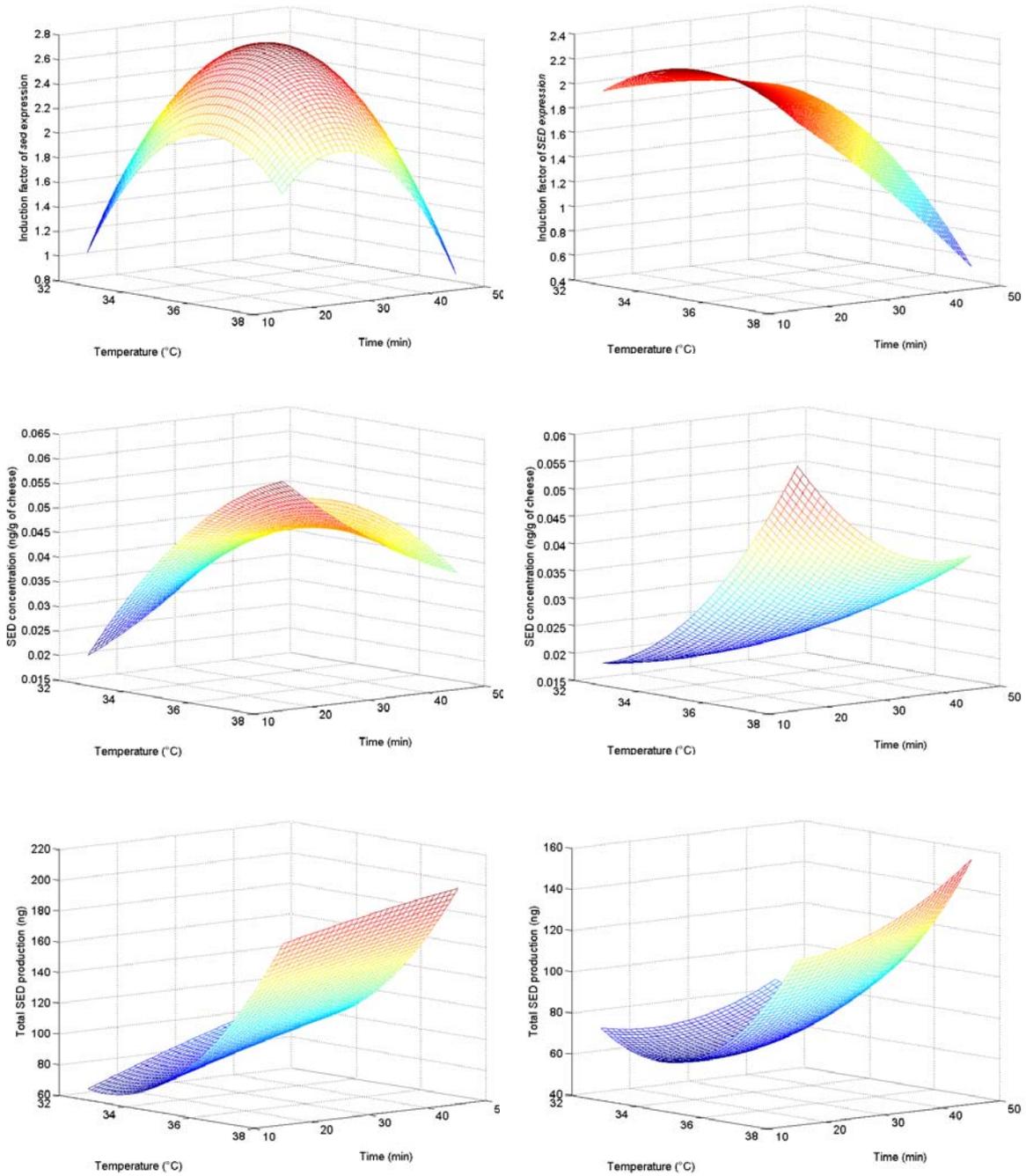


FIG. 4. Response surface plots showing the effects of milk maturation temperature and time on relative *sed* gene expression ratio (A), concentration of SED in cheese (B) or total SED amount produced (C) according to the *S. aureus* inoculated strain (CIM433 on the left and 361F on the right).



3. Conclusion

La troisième partie de cette thèse est la première étude qui propose un modèle mathématique permettant de prédire l'expression du gène *sed* et la production de SED au cours de la fabrication de fromages à partir de laits contaminés par *S. aureus*.

Les résultats de ce travail ont mis en évidence que la première étape de la fabrication de fromage (la maturation du lait) est le point critique à contrôler pour limiter la production de SE au cours de la fabrication de fromages à pâte pressée non cuite. La production de SED peut être réduite en mettant en œuvre la maturation du lait à une température basse (proche de 32°C) pendant une courte durée (proche de 15 min), la température étant le paramètre technologique à contrôler en priorité pour limiter le risque d'intoxication alimentaire par *S. aureus*, comme cela a déjà été montré par Alomar *et coll.* et Gaya *et coll.* (Alomar, *et coll.*, 2008a; Gaya, *et coll.*, 1988).

Les modélisations de la quantité de SED et du facteur d'induction de *sed* 4 h après le moulage des fromages en fonction de la température et de la durée de maturation du lait pratiquées au cours de la fabrication ont révélé que ces deux réponses n'étaient pas corrélées alors que les résultats de l'étude précédente mettaient en évidence une augmentation de la production de SED avec l'expression du gène *sed*. La quantité de SED produite est en effet réduite avec une température et une durée de maturation faibles alors que l'induction de *sed* est minimale lorsque la température et la durée de maturation sont élevées. La quantité de SED mesurée 4 h après le moulage représente l'accumulation de SED produite depuis le début de la fabrication alors que le facteur d'induction de *sed* mesuré 4 h après le moulage ne donne aucune information sur les variations de l'expression du gène entre les points « moulage » (point de référence pour mesurer le facteur d'induction) et « 4 h après le moulage ». La différence observée entre les deux modèles est donc simplement due au fait que l'on ne mesure pas les mêmes types d'informations.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les deux principaux objectifs de ce travail de thèse étaient d'identifier des paramètres technologiques clés qui permettraient de contrôler la production d'entérotoxines staphylococciques au cours des 72 premières heures de la fabrication de fromages et d'étudier l'incidence de ces paramètres sur l'expression des gènes et la production de SE afin de mieux comprendre les mécanismes conduisant à la production de SE dans les fromages. Pour mener à bien ce travail, il a été nécessaire, dans un premier temps, de développer une méthode efficace pour extraire l'ARN microbien de matrices fromagères et d'appliquer une technique précise et fiable pour analyser le niveau d'expression des gènes des entérotoxines staphylococciques au cours de fabrications fromagères. Nous avons ensuite évalué l'incidence de cinq paramètres technologiques sur l'expression des gènes et la production de SE de quatre souches de *S. aureus* productrices d'une entérotoxine parmi SEA, SEB, SEC et SED, au cours de la transformation de lait pasteurisé en fromages à pâte pressée non cuite. Les résultats de cette étude ont permis de sélectionner deux paramètres dont l'incidence sur l'expression de *sed* et la production de SED de deux souches productrices de la seule SED ou de SEA et SED a été modélisée. Les principaux résultats de ces travaux et leurs enseignements sont ici récapitulés et comparés.

Méthode d'extraction d'ARN bactérien à partir de fromages

La synthèse bibliographique a mis en évidence deux types de méthodes pour extraire l'ARN bactérien de matrice fromagère : *i-* les méthodes directes d'extraction des ARN à partir de petits morceaux de fromages et *ii-* une méthode d'extraction de l'ARN de cellules préalablement séparées de la matrice fromagère. La méthode développée au cours de cette thèse est basée sur la séparation des cellules du fromage avant d'en extraire les ARN. Contrairement à la méthode de Ulvé *et coll.* qui ont travaillé sur des morceaux préalablement congelés (Ulvé, *et coll.*, 2008), notre méthode s'applique à des fromages frais et peut être réalisée en même temps que les dénombrements microbiologiques dans les fromages. Elle ne nécessite pas l'utilisation d'un gradient chimique (Makhzami, *et coll.*, 2008). Elle est rapide et simple à mettre en œuvre. De plus, elle est efficace pour extraire l'ARN bactérien de différents types de fromages (pâte pressée non cuite, pâte molle et pâte persillée) à différents stades de leur fabrication (caillé frais et fromage jusque fin d'affinage). Dans les travaux de cette thèse où elle a été appliquée, la méthode a montré son efficacité à extraire les ARN de

populations de *S. aureus* largement minoritaires ($1/1000^{\text{ième}}$ de la population totale). Cependant, la méthode développée ne permet pas la quantification des ARNm si la proportion de *S. aureus* dans la population totale est inférieure à $1/1000^{\text{ième}}$. Les levains étant généralement inoculés à plus de 10^6 ufc/ml, l'étude de l'expression des gènes de *S. aureus* lorsque sa population initiale est inférieure à 10^3 ufc/ml n'est pas réalisable. Bien qu'une contamination naturelle de *S. aureus* dans le lait cru soit généralement inférieure à ce seuil, nous pensons qu'une inoculation artificielle de l'ordre de 10^3 ufc/ml est biologiquement pertinente pour évaluer le risque d'intoxication par les SE dans les fromages. En effet, il est maintenant admis que la production de SE survient au-delà d'un seuil de 10^5 *S. aureus*/g de fromages (Anonymous, 2007). En cas de contamination initiale du lait avec 10^2 *S. aureus*/ml, ce seuil est difficilement atteint et les entérotoxines ne sont pas détectées (Lamprell, 2003; Meyrand, *et coll.*, 1998). Les intoxications alimentaires staphylococciques associées aux produits laitiers se produiraient lorsque le lait contient initialement plus de 10^3 *S. aureus*/ml.

Sélection de gènes de référence pour l'étude du niveau d'expression de gènes de *Staphylococcus aureus*

La population de *S. aureus* étant minoritaire par rapport à la population microbienne totale des fromages, il est difficile d'évaluer la quantité d'ARN staphylococcique dans l'ARN total extrait. Nous avons utilisé une méthode très sensible, la RT-PCR quantitative, pour mesurer le niveau de transcription relatif des gènes des entérotoxines staphylococciques en utilisant des gènes de référence. Nous avons appliqué la méthode proposée par Vandesompele *et coll.* (Vandesompele, *et coll.*, 2002) qui consiste *i-* à sélectionner une série de gènes candidats a priori stable d'un point de vue physiologique et ayant des fonctions biologiques différentes, *ii-* à mesurer l'expression de ces gènes par RT-PCR quantitative dans les conditions d'étude et *iii-* à analyser ces données avec le logiciel geNorm afin de sélectionner les meilleurs gènes de référence, c'est-à-dire ceux dont l'expression est la plus stable dans les conditions étudiées.

Nous avons ainsi sélectionné une dizaine de gènes de référence candidats. La stabilité d'expression de ces gènes a été évaluée au cours de croissances en lait, en fromage et en milieu de laboratoire (collaboration avec S. Derzelle (Derzelle *et coll.*, 2009)). La sélection de gènes étudiés par Derzelle *et coll.* (Derzelle, *et coll.*, 2009) inclut le gène *gmk* qui n'a pas été testé au cours des croissances en lait et en fromage et exclut *pta* et *tpi* qui ont été testés au cours des croissances en lait et en fromage. Malgré cette légère différence, les gènes *ftsZ* et *rpoB* font partie des gènes dont l'expression est la plus stable dans toutes les conditions.

Au cours des croissances de *S. aureus* en lait et en fromage, tous les gènes candidats que nous avons étudiés sont exprimés de manière stable et peuvent être utilisés, selon les critères indiqués par Vandesompele *et coll.* (Vandesompele, *et coll.*, 2002), en tant que gènes de référence pour la normalisation de données de RT-PCR quantitative. En revanche, au cours de croissance en milieu de laboratoire, l'expression d'un grand nombre des gènes candidats étudiés est fortement affectée par les phases de croissance de *S. aureus* et peu de gènes répondent aux critères indiqués par Vandesompele *et coll.* (Derzelle, *et coll.*, 2009; Vandesompele, *et coll.*, 2002). Comme cela a été précisé dans la synthèse bibliographique, il est donc indispensable de s'assurer de la stabilité d'expression des gènes de référence dans les conditions que l'on étudie.

Parmi la série des dix gènes candidats choisis, trois bons gènes de référence ont pu être sélectionnés pour normaliser l'expression des gènes des différentes entérotoxines staphylococciques dans différentes souches et différentes conditions de croissance.

Croissance de *Staphylococcus aureus* au cours de la fabrication de fromages à pâte pressée non cuite

Au cours de la thèse, la croissance de cinq souches de *S. aureus* isolées de fromages a été suivie au cours de fabrications de fromages à pâte pressée non cuite mettant en œuvre du lait microfiltré ou du lait pasteurisé. Comme dans les études précédentes de *S. aureus* en fromage (Tableau 5), nous avons montré que la croissance de ce pathogène est très rapide en début de fabrication puis au plus tard 24 h après l'emprésurage des laits, la population atteint un pallier et demeure stable pendant les 48 h suivantes. Le comportement des différentes souches étudiées est très similaire.

Dans la première partie du travail de cette thèse (mise au point des outils de biologie moléculaire), un levain monosouche (*Lactococcus lactis*) a été utilisé pour fabriquer les fromages. Les fabrications fromagères suivantes ont été réalisées avec un levain plus complexe contenant plusieurs espèces de bactéries. A niveau égal d'inoculation (10^3 *S. aureus*/ml de lait), la population de la souche de *S. aureus* 361F a atteint, en présence du levain simple, un maximum d'environ 10^7 ufc/g de fromage 24 h après l'emprésurage du lait alors qu'en présence du levain complexe, le maximum de population atteint a été moindre et plus précoce, environ 10^6 ufc/g au plus tard 6 h après l'emprésurage. Le levain simple acidifie plus lentement le lait que le levain complexe. Six heures après l'emprésurage, le pH est alors plus faible dans les fromages réalisés avec le levain complexe ($5,4 < \text{pH}_{6\text{h}} < 6,1$) que dans les fromages réalisés avec le levain simple ($\text{pH} > 6,3$). Cela peut expliquer l'arrêt

précoce de la croissance de *S. aureus* en présence du levain complexe dans le fromage et confirme l'effet antagoniste d'un pH bas et d'une acidification rapide sur la croissance de *S. aureus* mis en évidence dans plusieurs études (Delbes, *et coll.*, 2006; Lamprell, 2003; Tatini, *et coll.*, 1971a; Zehren et Zehren, 1968).

Quoiqu'il en soit, dans tous les fromages à pâte pressée non cuite fabriqués au cours de la thèse, la population de *S. aureus* est toujours supérieure à 10^5 ufc/g de fromage 24 h après l'emprésurage du lait initialement contaminé avec 10^3 *S. aureus*/ml et reste stable jusqu'à 72 h après l'emprésurage au moins. La Commission Européenne impose la numération des staphylocoques à coagulase positive au moment où leur population est maximale au cours du procédé de fabrication de fromages. Suite à ces travaux de thèse, il semble donc préférable d'énumérer les staphylocoques à coagulase positive dans les 72 premières heures de la fabrication de fromages à pâte pressée non cuite.

Production d'entérotoxines staphylococciques au cours de la fabrication de fromages à pâte pressée non cuite

Malgré des populations d'environ 10^6 *S. aureus*/g de fromage, seules les entérotoxines A et D ont pu être détectées au cours des fabrications de fromages réalisées à partir de laits contaminés par des souches de *S. aureus* productrices de SEA, SEB, SEC ou SED. Ces résultats concordent avec les données disponibles dans la littérature et le fait que SEA et SED soient plus souvent détectées dans les fromages impliqués dans des cas de TIAC.

Toutefois, dans les études présentées dans ce manuscrit, SEA a été produite en plus faible quantité que SED. En effet, SEA a été produite en quantité mesurable dans les fromages fabriqués à partir de laitensemencé avec la souche de *S. aureus* 361F productrice de SEA et SED et le levain simple mais n'a pu être quantifiée (quantité trop faible) dans les fromages fabriqués à partir de laitensemencé avec le levain complexe et cette même souche de *S. aureus*. SED a, quant à elle, pu être détectée et quantifiée dans chacune des conditions étudiées. Le niveau de production plus important de SED pourrait expliquer que SED soit la toxine la plus souvent détectée par le LCR des staphylocoques à coagulase positive dans les fromages contaminés par des staphylocoques à coagulase positive (Hennekinne, communication personnelle).

Par ailleurs, contrairement à la souche 361F, la souche de *S. aureus* 432G, productrice de SEA, n'a pas produit SEA en quantité détectable dans les fromages à pâte pressée non cuite. Nous avons également montré que dans des conditions identiques, la souche 361F produit moins de SED dans les fromages que la souche CIM433, productrice uniquement de

SED. Le niveau de production des SE semble donc aussi dépendre de la souche de *S. aureus* qui contamine le lait, comme l'a montré Lamprell au cours de ses travaux de thèse (Lamprell, 2003).

Pour la première fois, les SE ont été recherchées dans le lactosérum issu de la fabrication des fromages et nous avons ainsi mis en évidence qu'une proportion variable des entérotoxines produites au cours de la fabrication de fromages se retrouve dans le lactosérum. Cependant, elles n'ont été détectées que dans les lactosérums issus du pressage des fromages. Cette fraction de lactosérum n'étant, à notre connaissance, pas valorisée par les industriels, elle ne représente pas un risque pour la sécurité des aliments.

Cinétique d'expression des gènes *se* au cours de la fabrication de fromages à pâte pressée non cuite

Afin de mieux comprendre les divergences dans les niveaux de production des différentes entérotoxines staphylococciques, les cinétiques d'expression des gènes *sea*, *seb*, *sec* et *sed* ont été évaluées au cours de la croissance de *S. aureus* dans toutes les fabrications fromagères réalisées au cours de la thèse. Les cinétiques de ces mêmes gènes ont aussi été étudiées au cours de croissance en milieu de laboratoire par Derzelle *et coll.* (Derzelle, *et coll.*, 2009).

Le profil d'expression de *sea* a été mesuré au cours de la croissance de la souche 432G (productrice de SEA) en fromage et au cours de la croissance de la souche 361F (productrice de SEA et SED) en milieu de laboratoire et en fromage. L'expression de *sea* chez 361F en milieu de laboratoire et chez 432G en fromage n'était pas affectée par les phases de croissance de *S. aureus* alors qu'on a observé une légère induction du niveau de transcription chez 361F pendant certaines fabrications fromagères. SEA est produite en phase exponentielle de croissance (Borst et Betley, 1994; Czop et Bergdoll, 1974) donc, si l'expression du gène induit directement la production de la toxine, l'induction de la transcription de *sea* devrait avoir lieu en phase exponentielle de croissance. Le premier point de la cinétique ayant toujours été prélevé en phase exponentielle de croissance, il est possible que nous n'ayons pas détecté l'induction de gène si elle précédait le premier prélèvement.

Les cinétiques d'expression de *seb* et *sec* ont été étudiées au cours des croissances des souches CIM479 (productrice de SEB) et CIM441 (productrice de SEC) en milieu de laboratoire et pendant la fabrication de fromages à pâte pressée non cuite. Alors qu'une augmentation des ARNm ($\times 10$) de ces deux gènes a été mesurée en milieu de laboratoire en fin de phase exponentielle de croissance, aucune augmentation n'a été observée au cours de

la croissance de *S. aureus* en fromage. Les gènes *seb* et *sec* étant régulés par le système *agr* qui est dépendant notamment de la densité de population de *S. aureus* (Gaskill et Khan, 1988; Ji, *et coll.*, 1995; Regassa, *et coll.*, 1991; Wright et Holland, 2003), la faible population de *S. aureus* dans le fromage par rapport au niveau de population atteint dans le milieu de laboratoire pourrait expliquer que les gènes ne soient pas induits au cours de la fabrication des fromages.

Le gène *sed* est lui aussi sous contrôle du système *agr* (Bayles et Iandolo, 1989; Zhang et Stewart, 2000). De ce fait, on s'attendrait à ce que son niveau de transcription soit semblable à celui de *seb* et *sec*. L'expression de *sed* a été évaluée au cours de la croissance des souches CIM433 (productrice de SED) et 361F (productrice de SEA et SED). En milieu de laboratoire, dans les deux souches, le niveau de transcription de *sed* est induit, plus faiblement que *seb* et *sec*, en fin de phase exponentielle de croissance (Derzelle, *et coll.*, 2009). Pendant la fabrication de fromages à partir de lait contaminé par CIM433, l'expression de *sed* était légèrement induite à la fin de la phase exponentielle de croissance de la souche, alors que, dans les mêmes conditions, l'expression de *seb* et *sec* ne l'était pas. Ce résultat suggère que le système de régulation de *sed* pourrait être différent de celui de *seb* et *sec*. Au cours des croissances de la souche 361F en fromage, l'induction de *sed* est moins marquée. Le niveau d'expression du gène pourrait donc, comme le niveau de production de SED, dépendre de la souche.

Explication au niveau moléculaire de la présence ou non d'entérotoxines

L'induction de *sed* et la production de SED au cours de la croissance de 361F en fromage sont plus faibles que l'induction de *sed* et la production de SED au cours de la croissance de CIM433 dans les mêmes conditions. De même, alors que SED est la seule entérotoxine à avoir été produite à un niveau quantifiable, par les méthodes actuelles, dans tous les fromages fabriqués à partir de lait contaminé par une souche productrice de la toxine correspondante, *sed* est le gène le plus exprimé par *S. aureus* et le seul dont l'expression est induite au cours de la fabrication. Au regard de ces résultats, il semblerait que la production de SE aille de pair avec l'expression des gènes *se* correspondants et qu'un certain niveau de transcription soit nécessaire à atteindre pour que l'entérotoxine correspondante soit produite en quantité détectable notamment par les méthodes officielles.

Paramètres technologiques clés pour contrôler la production d'entérotoxines staphylococciques au cours de la fabrication de fromages à pâte pressée non cuite

Au cours de la fabrication des fromages à pâte pressée non cuite, la croissance de *S. aureus* survient généralement pendant les 6 premières heures de la fabrication. De même la quantité maximale d'entérotoxines a été détectée 4 heures après le moulage des fromages. Comme dans les travaux de Alomar *et coll.* et Delbes *et coll.* (Alomar, *et coll.*, 2008a; Delbes, *et coll.*, 2006), la maîtrise des premières étapes de la fabrication apparaît donc cruciale pour limiter le risque lié à *S. aureus* dans les fromages.

Parmi les paramètres technologiques les plus variables dans les pratiques des fromagers pour la fabrication des fromages à pâte pressée non cuite, quatre concernent les premières étapes de la fabrication : la température et la durée de maturation du lait avant emprésurage, le brassage du lait au cours de cette maturation, ainsi que la durée du brassage après découpage du caillé. Le cinquième paramètre étudié était la durée du pressage. Nous avons évalué l'incidence de ces paramètres sur l'expression de gènes *se*, la production de SE et la croissance de *S. aureus* au cours des 72 premières heures de la fabrication des fromages. Un premier plan d'expériences nous a permis de classer ces paramètres en fonction de leur incidence sur quatre souches productrices de l'une des quatre entérotoxines « classiques » SEA, SEB, SEC ou SED. Les paramètres affectaient significativement la production de SED (seule entérotoxine quantifiable) et ce sont la température et la durée de maturation du lait avant emprésurage qui avaient la plus forte incidence.

L'étude de ces deux paramètres a ensuite été approfondie en utilisant la méthodologie des surfaces de réponses. La production de SED et l'expression de *sed* ont ainsi pu être modélisées pour deux souches productrices d'une (SED) ou deux entérotoxines (SEA et SED). Les équations mathématiques obtenues révèlent que la température de maturation a un effet plus important que la durée de la maturation.

La température de maturation du lait en cuve est donc le paramètre clé à maîtriser pour limiter la production d'entérotoxines staphylococciques pendant la fabrication de fromages à pâte pressée non cuite : plus cette température s'éloigne de la température optimale de croissance de *S. aureus* (37°C), moins ce pathogène produira de SE.

Il faut cependant noter que, même si une faible température permet de réduire la production de SED, elle ne l'inhibe pas complètement et SED est toujours détectée, ce qui selon la législation imposée par la Commission Européenne (Anonymous, 2007), implique la destruction des fromages contaminés. A ce jour, on ne connaît pas la dose minimale d'entérotoxines susceptible de provoquer après ingestion une intoxication chez l'homme. L'absence d'entérotoxines dans 25 g de fromage est donc la seule recommandation possible.

Perspectives

Les différents outils développés et les méthodes appliquées au cours de cette thèse peuvent être facilement transférables à l'étude d'autres bactéries dans d'autres types de fromages ou d'autres matrices alimentaires. En effet la méthode d'extraction d'ARN bactérien de matrice fromagère est, on l'a vérifié, applicable à d'autres types de fromages (pâte molle, pâte persillée). En utilisant la liste de gènes candidats proposés dans cette thèse et en dessinant des amorces spécifiques à une autre espèce bactérienne, la méthodologie appliquée pour sélectionner des gènes de référence pertinents peut être facilement mise en œuvre pour mesurer les niveaux d'expression d'autres gènes d'intérêt chez une autre bactérie. De même, les plans d'expériences utilisés pour réaliser ce travail sont directement applicables à d'autres types de procédés agro-alimentaires. Dans le projet ANR SEFRO, il était notamment prévu d'appliquer cette même méthodologie pour mesurer l'incidence sur le comportement de *S. aureus* de paramètres technologiques en fabrication de fromages à pâte molle. Il serait aussi envisageable d'appliquer cette méthode à l'étude du comportement de souches de *Escherichia coli* productrices de shiga-toxines.

Les résultats de cette thèse ont été obtenus en travaillant sur une technologie modèle de fromages à pâte pressée non cuite. Dans le cadre du projet ANR SEFRO, ils sont maintenant en cours de validation sur une technologie industrielle de fromages à pâte pressée non cuite, en prenant l'exemple du Reblochon.

Au cours de la thèse, nous avons travaillé sur les 72 premières heures de la fabrication des fromages. Cependant, pendant l'affinage des fromages, des contaminations de la matrice par *S. aureus* sont à nouveau possible du fait de la manipulation des fromages lors des soins en cave (retournements, brossages, lavages,...). Or le développement de la flore d'affinage sur la croûte des fromages provoque une remontée du pH. Les valeurs atteintes peuvent alors devenir de nouveau favorables à la croissance de *S. aureus* et à la production de SE. Toujours dans le cadre du projet ANR SEFRO, cette possibilité a été envisagée et le comportement de *S. aureus* sur la croûte de fromages à pâte molle et à croûte lavée (type Munster) et à pâte pressée non cuite (Reblochon) est étudié en s'intéressant aux cas de contamination initiale du lait et aux cas de contamination en cours d'affinage.

L'étude de l'expression des gènes des entérotoxines est cependant plus difficile en croûte des fromages car la méthode d'extraction d'ARN de fromages développée dans cette thèse ne permet pas le suivi de gènes de populations de *S. aureus* représentant moins d' $1/1000^{\text{ième}}$ de la population microbienne totale. Dans la croûte, la densité de population microbienne est beaucoup plus importante et seule une forte contamination par *S. aureus*

autoriserait l'étude du niveau de transcription des gènes *se*. Dans ce contexte, nous avons envisagé l'utilisation de gènes rapporteurs fluorescents pour observer, grâce à la microscopie confocale par exemple, la localisation des cellules de *S. aureus* qui expriment les *se* dans le fromage.

Au niveau moléculaire, il serait pertinent de clarifier la relation entre l'expression des gènes *se* et la production de SE. Dans cette optique, des échantillons des cultures des différentes souches étudiées par Derzelle *et coll.* (Derzelle, *et coll.*, 2009) ont été conservés en vue du dosage des SE.

Comme nous l'avons observé au travers des travaux de cette thèse et dans la partie bibliographique de ce manuscrit, la quantification et/ou détection d'entérotoxines dont le gène est exprimé n'est pas toujours possible. Il apparaît donc indispensable de développer des méthodes de détection et de quantification des entérotoxines staphylococciques plus sensibles.

Une autre voie d'exploitation intéressante serait de mieux caractériser le système de régulation du gène *sed* qui, d'après les résultats de la thèse, diffère de celui de *seb* et *sec*. Pour cela, la mise en œuvre d'analyses transcriptomiques globales serait indispensable.

LISTES DES TABLEAUX ET DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Bactéries responsables de cas de TIAC et pathologies associées	14
Tableau 2. Conditions de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> et de production d'entérotoxines staphylococciques.....	19
Tableau 3. Caractéristiques des différentes entérotoxines staphylococciques	22
Tableau 4. Doses d'entérotoxines staphylococciques ayant induit une réaction émétique dans des cas de TIAC ou d'essais sur animaux	23
Tableau 5. Résultats d'études du comportement de <i>Staphylococcus aureus</i> au cours de fabrication fromagères expérimentales	35
Tableau 6. Avantages et inconvénients des méthodes classiques d'extraction d'ARN...	40
Tableau 7. Souches de <i>Staphylococcus aureus</i> utilisées.....	57
Tableau 8. Table $L_8(2^7)$	62
Tableau 9. Plan central composite à deux facteurs	63
Tableau 10. Amorces utilisées pour la PCR quantitative	70

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Aliments responsables ou suspectés de TIAC par <i>Staphylococcus aureus</i>.....	15
Figure 2. Principe de la technologie « Lab on Chip »	41
Figure 3. Electrophorégramme et image du gel d'électrophorèse associé	42
Figure 4. Amplification exponentielle de l'ADN par PCR	46
Figure 5. Suivi en temps réel de l'amplification d'ADN par PCR.....	47
Figure 6. Diagramme de fabrication des fromages à pâte pressée non cuite.....	65

VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE

VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE

Publications dans des revues à comité de lecture

- **Duquenne M.**, Fleurot I., Aigle M., Darrigo C., Borezée-Durant E., Derzelle S., Bouix M., Deperrois-Lafarge V., Delacroix-Buchet A. (2010). Tool for Quantification of Staphylococcal Enterotoxin Gene Expression in Cheese, *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (5): 1367-1374.
- **Duquenne M.**, Fleurot I., Aigle M., Darrigo C., Hennekinne J.A., Papinaud I., Derzelle S., Bouix M., Deperrois-Lafarge V., Delacroix-Buchet A. Staphylococcal enterotoxin gene expression and production during the manufacturing of uncooked semi-hard cheese, *International Journal of Food Microbiology*, submitted.
- **Duquenne M.**, Derzelle S., Fleurot I., Aigle M., Darrigo C., Hennekinne J.A., Papinaud I., Bouix M., Deperrois-Lafarge V., Delacroix-Buchet A. Application of the response surface methodology to minimize staphylococcal enterotoxin production during the manufacturing of uncooked semi-hard cheese, *International Journal of Food Microbiology*, in preparation.
- Derzelle S., Dilasser F., **Duquenne M.**, Deperrois V. (2009). Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth, *Food Microbiology*, 26: 896-904.

Communications orales et affichées lors de congrès

- **Duquenne M.**, Quénéé P., Leroy T., Borezée-Durant E., Derzelle S., Gruss A., Delacroix-Buchet A., Bouix M. (2007). Vers l'étude d'expression de gènes de *Staphylococcus aureus* en fabrication fromagère : la sélection de gènes de normalisation pour la RT-PCR en temps réel, poster, *congrès du Club des Bactéries Lactiques*, Rennes, France.
- **Duquenne M.**, Aigle M., Bataillon I., Quénéé P., Leroy T., Borezée-Durant E., Derzelle S., Deperrois-Lafarge V., Delacroix-Buchet A., Bouix M. (2008). A Toolbox to Quantify Enterotoxin Gene Expression in a Complex Microbial Ecosystem, poster, *5th IDF Symposium on Cheese Ripening*, Bern, Suisse.

- **Duquenne M.**, Aigle M., Bataillon I., Quénée P., Leroy T., Borezée-Durant E., Derzelle S., Deperrois-Lafarge V., Delacroix-Buchet A., Bouix M. (2008). A Toolbox to Quantify Enterotoxin Gene Expression in a Complex Microbial Ecosystem, communication orale, *5th IDF Symposium on Cheese Ripening, IDF Dairy Science and Technology Week*, Québec, Canada.
- **Duquenne M.**, Bataillon I., Aigle M., Darrigo C., Kanoun M., Sakamoto C., Derzelle S., Deperrois-Lafarge V., Delacroix-Buchet A., Bouix M. (2008). Vers l'identification de facteurs clés dans la lutte contre *S. aureus* en fabrication fromagère, communication orale, *Journée Thématique SCN-BEER-FLORE QPS-SEFRO à la Maison du Lait*, Paris, France.
- **Duquenne M.**, Bataillon I., Aigle M., Darrigo C., Hennekinne J.A., Papinaud I., Kanoun M., Sakamoto C., Derzelle S., Deperrois-Lafarge V., Delacroix-Buchet A., Bouix M. (2009). Identification of key technological factors in the fight against *Staphylococcus aureus* during cheese manufacture, poster, *congrès du Club des Bactéries Lactiques*, Toulouse, France.
- **Duquenne M.**, Bataillon I., Aigle M., Darrigo C., Hennekinne J.A., Papinaud I., Miclo S., Derzelle S., Deperrois-Lafarge V., Delacroix-Buchet A., Bouix M. (2009). Evaluation of the quantity of staphylococcal enterotoxins recovered in whey during cheese manufacture, poster, *congrès du Club des Bactéries Lactiques*, Toulouse, France.
- **Duquenne M.**, Bataillon I., Aigle M., Darrigo C., Hennekinne J.A., Papinaud I., Kanoun M., Sakamoto C., Derzelle S., Deperrois-Lafarge V., Delacroix-Buchet A., Bouix M. (2009). Identification of key technological factors in the fight against *Staphylococcus aureus* during cheese manufacture, poster, *IDF World Dairy Summit*, Berlin, Allemagne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akhtar M., Park C. E. et Rayman K. (1996).** Effect of urea treatment on recovery of staphylococcal enterotoxin A from heat-processed foods. *Appl Environ Microbiol* **62** (9), 3274-6.
- Alomar J., Lebert A. et Montel M. C. (2008a).** Effect of temperature and pH on growth of *Staphylococcus aureus* in co-culture with *Lactococcus garvieae*. *Curr Microbiol* **56** (4), 408-12.
- Alomar J., Loubiere P., Delbes C., Nouaille S. et Montel M. C. (2008b).** Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. *Food Microbiol* **25** (3), 502-8.
- Altboum Z., Hertman I. et Sarid S. (1985).** Penicillinase plasmid-linked genetic determinants for enterotoxins B and C1 production in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **47** (2), 514-21.
- Ammor S., Tauveron G., Dufour E. et Chevallier I. (2006a).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1--Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control* **17** (6), 454-461.
- Ammor S., Tauveron G., Dufour E. et Chevallier I. (2006b).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 2--Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria. *Food Control* **17** (6), 462-468.
- Andersen C. L., Jensen J. L. et Orntoft T. F. (2004).** Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res* **64** (15), 5245-5250.
- Anonymous (2001).** Correction. *J Immunol* **166** (6), 4260-.
- Anonymous (1981).** IDF 105 - Milk - Determination of fat content.
- Anonymous (1985).** IDF 098A - Milk - Determination of protein content.
- Anonymous (2006).** Note de service DGAL/SDSSA/SDRRCC/N2006-8210.
- Anonymous (2007).** Commission regulation n°1441/2007 of 5 december 2007. *OJEU* **L322** 12-29.
- Aoyama K., Takahashi C., Yamauchi Y., Sakai F., Igarashi H., Yanahira S. et Konishi H. (2008).** [Examination of *Staphylococcus aureus* survival and growth during cheese-making process]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* **49** (2), 116-23.

- Arbuthnott J. P., Coleman D. C. et de Azavedo J. S. (1990).** Staphylococcal toxins in human disease. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **19** 101S-107S.
- Arques J. L., Rodriguez E., Gaya P., Medina M., Guamis B. et Nunez M. (2005).** Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol* **98** (2), 254-60.
- Arques J. L., Rodriguez E., Nunez M. et Medina M. (2008).** Antimicrobial activity of nisin, reuterin, and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cuajada, a semisolid dairy product manufactured in Spain. *J Dairy Sci* **91** (1), 70-5.
- Asao T., Kumeda Y., Kawai T., Shibata T., Oda H., Haruki K., Nakazawa H. et Kozaki S. (2003).** An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection* **130** (01), 33-40.
- Balaban N. et Rasooly A. (2000).** Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* **61** (1), 1-10.
- Barber L. E. et Deibel R. H. (1972).** Effect of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausage. *Appl Microbiol* **24** (6), 891-8.
- Batdorj B., Trinetta V., Dalgalarondo M., Prévost H., Dousset X., Ivanova I., Haertlé T. et Chobert J. M. (2007).** Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens. *Journal of Applied Microbiology* **103** (3), 584-593.
- Bautista L., Gaya P., Medina M. et Nunez M. (1988).** A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Appl Environ Microbiol* **54** (2), 566-9.
- Bayles K. W. et Iandolo J. J. (1989).** Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol* **171** (9), 4799-806.
- Becker K., Keller B., von Eiff C., Bruck M., Lubritz G., Etienne J. et Peters G. (2001).** Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. *Appl Environ Microbiol* **67** (12), 5551-7.
- Bennett R. W. (2001).** *Staphylococcus aureus*. In *Guide to foodborne pathogens* Labbé R. G. et Garcia S. (Ed.). John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, USA. pp. 201-220.
- Bergdoll M. S. (1979).** Staphylococcal intoxications. In *Food Borne Infections and Intoxications* (2nd edition). Riemann H. et Bryan F. L. (Ed.). Academic Press, Inc., New York. pp. 443-494.
- Bergdoll M. S., Czop J. K. et Gould S. S. (1974).** Enterotoxin synthesis by the staphylococci. *Ann N Y Acad Sci* **236** (0), 307-16.

- Bergonier D. et Berthelot X. (2003).** New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science* **79** (1), 1-16.
- Bergonier D., de Cremoux R., Rupp R., Lagriffoul G. et Berthelot X. (2003).** Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res* **34** (5), 689-716.
- Betley M. J. et Mekalanos J. J. (1985).** Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science* **229** (4709), 185-7.
- Betley M. J. et Mekalanos J. J. (1988).** Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol* **170** (1), 34-41.
- Bohach G. A. et Schlievert P. M. (1987).** Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Mol Gen Genet* **209** (1), 15-20.
- Bohach G. A. et Schlievert P. M. (1989).** Conservation of the biologically active portions of staphylococcal enterotoxins C1 and C2. *Infect Immun* **57** (7), 2249-52.
- Bonaiti C., Parayre S. et Irlinger F. (2006).** Novel extraction strategy of ribosomal RNA and genomic DNA from cheese for PCR-based investigations. *Int J Food Microbiol* **107** (2), 171-9.
- Borst D. W. et Betley M. J. (1994).** Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression correlate with sea allele class. *Infect Immun* **62** (1), 113-8.
- Burkert J. F. M., Maugeri F. et Rodrigues M. I. (2004).** Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology* **91** (1), 77-84.
- Bustin S. A. (2002).** Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* **29** (1), 23-39.
- Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J. et Wittwer C. T. (2009).** The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **55** (4), 611-22.
- Bustin S. A., Benes V., Nolan T. et Pfaffl M. W. (2005).** Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* **34** (3), 597-601.
- Charlier C., Cretenet M., Even S. et Le Loir Y. (2009).** Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. *Int J Food Microbiol* **131** (1), 30-9.
- Charlier C., Even S., Gautier M. et Le Loir Y. (2008).** Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk. *International Dairy Journal* **18** (2), 197-203.

- Chiang Y. C., Liao W. W., Fan C. M., Pai W. Y., Chiou C. S. et Tsen H. Y. (2008).** PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *Int J Food Microbiol* **121** (1), 66-73.
- Chien Y., Manna A. C., Projan S. J. et Cheung A. L. (1999).** SarA, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for sar-dependent gene regulation. *J Biol Chem* **274** (52), 37169-76.
- Coignard B., Poujol I., Carbonne A., Bernet C., Sénéchal H., Dumartin C., Raclot I., Lepoutre A., Thiolet M., Bouraoui L. et Desenclos J. C. (2006).** Le signalement des infections nosocomiales, France, 2001-2005. *BEH* **51-52** 406-410.
- Collins E. B. et Aramaki K. (1980).** Production of Hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci* **63** (3), 353-7.
- Cords B. R. et Tatini S. R. (1973).** Applicability of heat-stable deoxyribonuclease assay for assessment of staphylococcal growth and the likely presence of enterotoxin in cheese. *J Dairy Sci* **56** (12), 1512-9.
- Couch J. L., Soltis M. T. et Betley M. J. (1988).** Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol* **170** (7), 2954-60.
- Cretenet M., Even S., Nouaille S., Coccagn-Bousquet M., Charlier C., Loubiere P. et Le Loir Y. (Year).** Etude des transcriptomes de *Lactococcus lactis* et *Staphylococcus aureus* en interaction en matrice fromagère. *16ième colloque du Club des Bactéries Lactiques*. Toulouse.
- Czop J. K. et Bergdoll M. S. (1974).** Staphylococcal enterotoxin synthesis during the exponential, transitional, and stationary growth phases. *Infect Immun* **9** (2), 229-35.
- Dahiya R. S. et Speck M. L. (1968).** Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci* **51** (10), 1568-72.
- Dallas P. B., Gottardo N. G., Firth M. J., Beesley A. H., Hoffmann K., Terry P. A., Freitas J. R., Boag J. M., Cummings A. J. et Kees U. R. (2005).** Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? *BMC Genomics* **6** (1), 59.
- De Buyser M.-L., Dufour B., Maire M. et Lafarge V. (2001).** Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int J Food Microbiol* **67** (1-2), 1-17.
- Delbes C., Alomar J., Chougui N., Martin J. F. et Montel M. C. (2006).** *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows' raw milk. *J Food Prot* **69** (9), 2161-7.
- Delmas G., Gallay A., Espié E., Haeghebaert S., Pihier N., Weill F. X., De Valk H., Vaillant V. et Désenclos J. C. (2006).** Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *BEH* **51-52** 418-422.

- Delves-Broughton J., Blackburn P., Evans R. J. et Hugenholtz J. (1996).** Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek* **69** (2), 193-202.
- Denny C. B., Humber J. Y. et Bohrer C. W. (1971).** Effect of toxin concentration on the heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A in beef bouillon and in phosphate buffer. *Appl Microbiol* **21** (6), 1064-6.
- Derzelle S., Dilasser F., Duquenne M. et Deperrois V. (2009).** Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. *Food Microbiol* **26** 896-904.
- Dheda K., Huggett J. F., Bustin S. A., Johnson M. A., Rook G. et Zumla A. (2004).** Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* **37** (1), 112-4, 116, 118-9.
- Dheda K., Huggett J. F., Chang J. S., Kim L. U., Bustin S. A., Johnson M. A., Rook G. A. et Zumla A. (2005).** The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem* **344** (1), 141-3.
- Diep B. A., Gill S. R., Chang R. F., Phan T. H., Chen J. H., Davidson M. G., Lin F., Lin J., Carleton H. A., Mongodin E. F., Sensabaugh G. F. et Perdreau-Remington F. (2006).** Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **367** (9512), 731-9.
- Dinges M. M., Orwin P. M. et Schlievert P. M. (2000).** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* **13** (1), 16-34.
- Dupuis A., Hennekinne J. A., Garin J. et Brun V. (2008).** Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for improved investigation of staphylococcal food poisoning outbreaks. *Proteomics* **8** (22), 4633-6.
- Erkmen O. (1995).** Behavior of *Staphylococcus aureus* in Turkish Feta Cheese During Manufacture and Ripening. *J Food Prot* **58** (11), 1201-1205.
- Even S., Charlier C., Nouaille S., Ben Zakour N. L., Cretenet M., Cousin F. J., Gautier M., Cotaign-Bousquet M., Loubiere P. et Le Loir Y. (2009).** *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. *Appl Environ Microbiol* **75** (13), 4459-72.
- Evenson M. L., Hinds M. W., Bernstein R. S. et Bergdoll M. S. (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** (4), 311-6.
- Fischer A., von Eiff C., Kuczius T., Omoe K., Peters G. et Becker K. (2007).** A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins. *J Mol Med* **85** (5), 461-9.

- Fitzgerald J. R., Monday S. R., Foster T. J., Bohach G. A., Hartigan P. J., Meaney W. J. et Smyth C. J. (2001).** Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J Bacteriol* **183** (1), 63-70.
- Fleige S. et Pfaffl M. W. (2006).** RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* **27** (2-3), 126-39.
- Fournier B., Klier A. et Rapoport G. (2001).** The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **41** (1), 247-61.
- Fujikawa H. et Morozumi S. (2006).** Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiol* **23** (3), 260-7.
- Galvez A., Abriouel H., Lopez R. L. et Ben Omar N. (2007).** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol* **120** (1-2), 51-70.
- Gaskill M. E. et Khan S. A. (1988).** Regulation of the enterotoxin B gene in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **263** (13), 6276-80.
- Gaya P., Medina M., Bautista L. et Nunez M. (1988).** Influence of lactic starter inoculation, curd heating and ripening temperature on *Staphylococcus aureus* behaviour in Manchego cheese. *Int J Food Microbiol* **6** (3), 249-57.
- Genigeorgis C., Foda M. S., Mantis A. et Sadler W. W. (1971).** Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production. *Appl Microbiol* **21** (5), 862-6.
- Genigeorgis C. et Sadler W. W. (1966).** Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin B production. *J Bacteriol* **92** (5), 1383-7.
- Giezendanner N., Meyer B., Gort M., Muller P. et Zweifel C. (2009).** [Raw milk-associated *Staphylococcus aureus* intoxication in children]. *Schweiz Arch Tierheilkd* **151** (7), 329-31.
- Gilliland S. E. et Ewell H. R. (1983).** Influence of combinations of *Lactobacillus lactis* and potassium sorbate on growth of psychrotrophs in raw milk. *J Dairy Sci* **66** (5), 974-80.
- Goerke C., Bayer M. G. et Wolz C. (2001).** Quantification of bacterial transcripts during infection using competitive reverse transcription-PCR (RT-PCR) and LightCycler RT-PCR. *Clin Diagn Lab Immunol* **8** (2), 279-82.
- Goerke C., Campana S., Bayer M. G., Doring G., Botzenhart K. et Wolz C. (2000).** Direct quantitative transcript analysis of the agr regulon of *Staphylococcus aureus* during human infection in comparison to the expression profile in vitro. *Infect Immun* **68** (3), 1304-11.
- Gomez-Lucia E., Goyache J., Orden J. A., Domenech A., Javier Hernandez F., Ruiz-Santa Quiteria J. A., Lopez B., Blanco J. L. et Suarez G. (1992).** Growth of *Staphylococcus aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental Manchego-type cheese. *J Dairy Sci* **75** (1), 19-26.

Graves R. R. et Frazier W. C. (1963). Food Microorganisms Influencing the Growth of Staphylococcus Aureus. *Appl Microbiol* **11** 513-6.

Greenfield R. A., Brown B. R., Hutchins J. B., Iandolo J. J., Jackson R., Slater L. N. et Bronze M. S. (2002). Microbiological, biological, and chemical weapons of warfare and terrorism. *Am J Med Sci* **323** (6), 326-40.

Greig J. D., Todd E. C., Bartleson C. A. et Michaels B. S. (2007). Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 1. Description of the problem, methods, and agents involved. *J Food Prot* **70** (7), 1752-61.

Haines W. C. et Harmon L. G. (1973a). Effect of selected lactic acid bacteria on growth of Staphylococcus aureus and production of enterotoxin. *Appl Microbiol* **25** (3), 436-41.

Haines W. C. et Harmon L. G. (1973b). Effect of variations in conditions of incubation upon inhibition of Staphylococcus aureus by Pediococcus cerevisiae and Streptococcus lactis. *Appl Microbiol* **25** (2), 169-72.

Halpin-Dohnalek M. I. et Marth E. H. (1989). Staphylococcus aureus: Production of extracellular compounds and behavior in foods - A review. *J Food Prot* **52** (4), 267-282.

Hamama A., El Hankouri N. et El Ayadi M. (2002). Fate of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in the presence of nisin-producing Lactococcus lactis strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. *International Dairy Journal* **12** (11), 933-938.

Harris T. O., Grossman D., Kappler J. W., Marrack P., Rich R. R. et Betley M. J. (1993). Lack of complete correlation between emetic and T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. *Infect Immun* **61** (8), 3175-83.

Hawryluk T. et Hirshfield I. (2002). A superantigen bioassay to detect staphylococcal enterotoxin A. *J Food Prot* **65** (7), 1183-7.

Heiss E. (1966). Rapid method for the determination of fat in cheese. *Deutsche Molkerei-Zeitung* **82** 67-70.

Henghold W. B., 2nd (2004). Other biologic toxin bioweapons: ricin, staphylococcal enterotoxin B, and trichothecene mycotoxins. *Dermatol Clin* **22** (3), 257-62, v.

Hennekinne J. A., Gohier M., Maire T., Lapeyre C., Lombard B. et Dragacci S. (2003). First proficiency testing to evaluate the ability of European Union National Reference Laboratories to detect staphylococcal enterotoxins in milk products. *JAOAC Int* **86** (2), 332-9.

Hennekinne J. A., Guillier F., Perelle S., De Buyser M. L., Dragacci S., Krys S. et Lombard B. (2007). Intralaboratory validation according to the EN ISO 16 140 Standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. *Journal of Applied Microbiology* **102** 1261-72.

- Higuchi R., Dollinger G., Walsh P. S. et Griffith R. (1992).** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* **10** (4), 413-7.
- Hiron A., Borezee-Durant E., Piard J. C. et Juillard V. (2007).** Only one of four oligopeptide transport systems mediates nitrogen nutrition in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189** (14), 5119-29.
- Hovde C. J., Hackett S. P. et Bohach G. A. (1990).** Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C3 gene: sequence comparison of all three type C staphylococcal enterotoxins. *Mol Gen Genet* **220** (2), 329-33.
- Hovde C. J., Marr J. C., Hoffmann M. L., Hackett S. P., Chi Y. I., Crum K. K., Stevens D. L., Stauffacher C. V. et Bohach G. A. (1994).** Investigation of the role of the disulphide bond in the activity and structure of staphylococcal enterotoxin C1. *Mol Microbiol* **13** (5), 897-909.
- Hu D.-L., Omoe K., Shimoda Y., Nakane A. et Shinagawa K. (2003).** Induction of Emetic Response to Staphylococcal Enterotoxins in the House Musk Shrew (*Suncus murinus*). *Infect. Immun.* **71** (1), 567-570.
- Huggett J., Dheda K., Bustin S. et Zumla A. (2005).** Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* **6** (4), 279-84.
- Hwang S. Y., Kim S. H., Jang E. J., Kwon N. H., Park Y. K., Koo H. C., Jung W. K., Kim J. M. et Park Y. H. (2007).** Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. *Int J Food Microbiol* **117** (1), 99-105.
- Iandolo J. J., Clark C. W., Bluhm L. et Ordal Z. J. (1965).** Repression of *Staphylococcus aureus* in associative culture. *Appl Microbiol* **13** (5), 646-9.
- Iandolo J. J., Ordal Z. J. et Witter L. D. (1964).** The Effect of Incubation Temperature and Controlled Ph on the Growth of *Staphylococcus Aureus* Mf 31 at Various Concentrations of NaCl. *Can J Microbiol* **10** 808-11.
- Ikeda T., Tamate N., Yamaguchi K. et Makino S. (2005a).** Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Appl Environ Microbiol* **71** (5), 2793-5.
- Ikeda T., Tamate N., Yamaguchi K. et Makino S. (2005b).** Quantitative analysis of *Staphylococcus aureus* in skimmed milk powder by real-time PCR. *J Vet Med Sci* **67** (10), 1037-41.
- Imbeaud S., Graudens E., Boulanger V., Barlet X., Zaborski P., Eveno E., Mueller O., Schroeder A. et Auffray C. (2005).** Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* **33** (6), e56.

- Ito A., Sato Y., Kudo S., Sato S., Nakajima H. et Toba T. (2003).** The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic food-borne pathogens. *Curr Microbiol* **47** (3), 231-6.
- Jarraud S., Peyrat M. A., Lim A., Tristan A., Bes M., Mougél C., Etienne J., Vandenesch F., Bonneville M. et Lina G. (2001).** egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* **166** (1), 669-77.
- Ji G., Beavis R. C. et Novick R. P. (1995).** Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (26), 12055-9.
- Johns M. B., Jr. et Khan S. A. (1988).** Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with a discrete genetic element. *J Bacteriol* **170** (9), 4033-9.
- Johnson W. M., Tyler S. D., Ewan E. P., Ashton F. E., Pollard D. R. et Rozee K. R. (1991).** Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **29** (3), 426-30.
- Jorgensen H. J., Mathisen T., Lovseth A., Omoe K., Qvale K. S. et Loncarevic S. (2005a).** An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiol Lett* **252** (2), 267-72.
- Jorgensen H. J., Mork T. et Rorvik L. M. (2005b).** The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *J Dairy Sci* **88** (11), 3810-7.
- Kaban G. et Kaya M. (2006).** Effect of starter culture on growth of *Staphylococcus aureus* in sucuk. *Food Control* **17** (10), 797-801.
- Kao C. T. et Frazier W. C. (1966).** Effect of lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol* **14** (2), 251-5.
- Kerouanton A., Hennekinne J. A., Letertre C., Petit L., Chesneau O., Brisabois A. et De Buyser M. L. (2007).** Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiol* **115** (3), 369-75.
- Khambaty F. M., Bennett R. W. et Shah D. B. (1994).** Application of pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiol Infect* **113** (1), 75-81.
- Kibbe W. A. (2007).** OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* **35** (Web Server issue), W43-6.
- Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjoback R., Sjogreen B., Strombom L., Stahlberg A. et Zoric N. (2006).** The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* **27** (2-3), 95-125.

- Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., Baba T., Yuzawa H., Kobayashi I., Cui L., Oguchi A., Aoki K., Nagai Y., Lian J., Ito T., Kanamori M., Matsumaru H., Maruyama A., Murakami H., Hosoyama A., Mizutani-Ui Y., Takahashi N. K., Sawano T., Inoue R., Kaito C., Sekimizu K., Hirakawa H., Kuhara S., Goto S., Yabuzaki J., Kanehisa M., Yamashita A., Oshima K., Furuya K., Yoshino C., Shiba T., Hattori M., Ogasawara N., Hayashi H. et Hiramatsu K. (2001).** Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357** (9264), 1225-40.
- Lamprell H. (2003).** La production des entérotoxines dans les fromages en fonction de la diversité phénotypique et génétique des souches de *Staphylococcus aureus*. *Thèse de doctorat*. Université de Bourgogne, France.
- Lapeyre C., Kaveri S. V., Janin F. et Strosberg A. D. (1987).** Production and characterization of monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxins: use in immunodetection and immunopurification. *Mol Immunol* **24** (12), 1243-54.
- Le Loir Y., Baron F. et Gautier M. (2003).** *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* **2** (1), 63-76.
- Lee Y. D., Moon B. Y., Park J. H., Chang H. I. et Kim W. J. (2007).** Expression of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates based on mRNA analysis. *J Microbiol Biotechnol* **17** (3), 461-7.
- Letertre C., Perelle S., Dilasser F. et Fach P. (2003).** Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol* **95** (1), 38-43.
- Lina G., Bohach G. A., Nair S. P., Hiramatsu K., Jouvin-Marche E. et Mariuzza R. (2004).** Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J Infect Dis* **189** (12), 2334-6.
- Lindqvist R., Sylven S. et Vagsholm I. (2002).** Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *Int J Food Microbiol* **78** (1-2), 155-70.
- Liu W. et Saint D. A. (2002).** A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem* **302** (1), 52-9.
- Livak K. J. et Schmittgen T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* **25** (4), 402-8.
- Lovseth A., Loncarevic S. et Berdal K. G. (2004).** Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol* **42** (8), 3869-72.
- Makhzami S., Quénéé P., Akary E., Bach C., Aigle M., Delacroix-Buchet A., Ogier J. C. et Serror P. (2008).** In situ gene expression in cheese matrices: Application to a set of enterococcal genes. *J Microbiol Methods* **75** (3), 485-490.

- Manchester K. L. (1996).** Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. *Biotechniques* **20** (6), 968-70.
- Martin M. C., Fueyo J. M., Gonzalez-Hevia M. A. et Mendoza M. C. (2004).** Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. *Int J Food Microbiol* **94** (3), 279-86.
- Mataragas M., Metaxopoulos J. et Drosinos E. H. (2002).** Characterization of two bacteriocins produced by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442, isolated from dry fermented sausages *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **18** (9), 847-856.
- McCann T. L., Eifert J. D., Gennings C., Schilling M. W. et Carter W. H. (2003).** A predictive model with repeated measures analysis of *Staphylococcus aureus* growth data. *Food Microbiology* **20** (2), 139-147.
- McLauchlin J., Narayanan G. L., Mithani V. et O'Neill G. (2000).** The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J Food Prot* **63** (4), 479-88.
- McLean R. A., Lilly H. D. et Alford J. A. (1968).** Effects of meat-curing salts and temperature on production of staphylococcal enterotoxin B. *J Bacteriol* **95** (4), 1207-11.
- Metaxopoulos J., Genigeorgis C., Fanelli M. J., Franti C. et Cosma E. (1981).** Production of Italian Dry Salami: Effect of Starter Culture and Chemical Acidulation on Staphylococcal Growth in Salami Under Commercial Manufacturing Conditions. *Appl Environ Microbiol* **42** (5), 863-871.
- Meyrand A., Boutrand-Loei S., Ray-Gueniot S., Mazuy C., Gaspard C. E., Jaubert G., Perrin G., Lapeyre C. et Vernozy-Rozand C. (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** (3), 537-44.
- Meyrand A. et Vernozy-Rozand C. (1999).** Croissance et entérotoxinogénèse de *staphylococcus aureus* dans différents fromages. *Rev. Med. Vet.* **150** (7), 601-616.
- Meyrand A., Vernozy Rozand C., Gonthier A., Mazuy C., Ray Gueniot S., Jaubert G., Perrin G., Lapeyre C. et Richard Y. (1999).** Croissance et entérotoxinogénèse de *Staphylococcus aureus* dans deux types de fromages au lait cru de chèvre. *Rev Med Vet* **150** (3), 271-278.
- Monnet C., Ulve V., Sarthou A. S. et Irlinger F. (2008).** Extraction of RNA from cheese without prior separation of microbial cells. *Appl Environ Microbiol* **74** (18), 5724-30.
- Munson S. H., Tremaine M. T., Betley M. J. et Welch R. A. (1998).** Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **66** (7), 3337-48.
- Niskanen A. et Nurmi E. (1976).** Effect of starter culture on staphylococcal enterotoxin and thermonuclease production in dry sausage. *Appl Environ Microbiol* **31** (1), 11-20.

- Nolan T., Hands R. E. et Bustin S. A. (2006).** Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* **1** (3), 1559-82.
- Noto M. J. et Archer G. L. (2006).** A subset of *Staphylococcus aureus* strains harboring staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type IV is deficient in CcrAB-mediated SCCmec excision. *Antimicrob Agents Chemother* **50** (8), 2782-8.
- Nouaille S., Even S., Charlier C., Le Loir Y., Coccagn-Bousquet M. et Loubiere P. (2009).** Transcriptomic response of *Lactococcus lactis* in mixed culture with *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* **75** (13), 4473-82.
- Novick R. P. (2003).** Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* **48** (6), 1429-49.
- Nugon-Baudon L. et Mollier P. (2002).** La sécurité alimentaire à l'INRA. <http://www.inra.fr/sia2002/secualim02.pdf>. Dernière consultation en décembre 2009.
- Nunez M., Bautista L., Medina M. et Gaya P. (1988).** *Staphylococcus aureus*, thermostable nuclease and staphylococcal enterotoxins in raw ewes' milk Manchego cheese. *J Appl Bacteriol* **65** (1), 29-34.
- Omoe K., Hu D. L., Takahashi-Omoe H., Nakane A. et Shinagawa K. (2003).** Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect Immun* **71** (10), 6088-94.
- Omoe K., Imanishi K., Hu D. L., Kato H., Fugane Y., Abe Y., Hamaoka S., Watanabe Y., Nakane A., Uchiyama T. et Shinagawa K. (2005).** Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. *Infect Immun* **73** (9), 5540-6.
- Omoe K., Ishikawa M., Shimoda Y., Hu D. L., Ueda S. et Shinagawa K. (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), 857-62.
- Ono H. K., Omoe K., Imanishi K., Iwakabe Y., Hu D. L., Kato H., Saito N., Nakane A., Uchiyama T. et Shinagawa K. (2008).** Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infect Immun* **76** (11), 4999-5005.
- Onoue Y. et Mori M. (1997).** Amino acid requirements for the growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in chemically defined media. *Int J Food Microbiol* **36** (1), 77-82.
- Orwin P. M., Fitzgerald J. R., Leung D. Y., Gutierrez J. A., Bohach G. A. et Schlievert P. M. (2003).** Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. *Infect Immun* **71** (5), 2916-9.
- Orwin P. M., Leung D. Y., Donahue H. L., Novick R. P. et Schlievert P. M. (2001).** Biochemical and biological properties of Staphylococcal enterotoxin K. *Infect Immun* **69** (1), 360-6.

- Orwin P. M., Leung D. Y., Tripp T. J., Bohach G. A., Earhart C. A., Ohlendorf D. H. et Schlievert P. M. (2002).** Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. *Biochemistry* **41** (47), 14033-40.
- Otero A., Garcia M. C., Garcia M. L., Prieto M. et Moreno B. (1988).** Behaviour of *Staphylococcus aureus* strains, producers of enterotoxins C1 or C2, during the manufacture and storage of Burgos cheese. *J Appl Bacteriol* **64** (2), 117-22.
- Otero A., García M. C., García M. L., Santos J. A. et Moreno B. (1993).** Behaviour of *Staphylococcus aureus* strains FRI 137 and FRI 361 during the manufacture and ripening of manchego cheese. *International Dairy Journal* **3** (1), 85-96.
- Otero A., Garcia M. L., Garcia M. C., Moreno B. et Bergdoll M. S. (1990).** Production of staphylococcal enterotoxins C1 and C2 and thermonuclease throughout the growth cycle. *Appl Environ Microbiol* **56** (2), 555-9.
- Pereira S. F., Henriques A. O., Pinho M. G., de Lencastre H. et Tomasz A. (2007).** Role of PBP1 in cell division of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189** (9), 3525-31.
- Pfaffl M. W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29** (9), e45.
- Pfaffl M. W., Tichopad A., Prgomet C. et Neuvians T. P. (2004).** Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **26** (6), 509-15.
- Pien J. (1976).** Détermination du taux de matière grasse des fromages. *Tech Lait* **878** 15-17.
- Poli A., Guglielmini E., Sembeni S., Spiazzi M., Dellaglio F., Rossi F. et Torriani S. (2007).** Detection of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin genotype diversity in Monte Veronese, a Protected Designation of Origin Italian cheese. *Lett Appl Microbiol* **45** (5), 529-34.
- Provenzano M. et Mocellin S. (2007).** Complementary techniques: validation of gene expression data by quantitative real time PCR. *Adv Exp Med Biol* **593** 66-73.
- Ramakers C., Ruijter J. M., Deprez R. H. et Moorman A. F. (2003).** Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* **339** (1), 62-6.
- Rasooly R. et Do P. M. (2009).** In vitro cell-based assay for activity analysis of staphylococcal enterotoxin A in food. *FEMS Immunol Med Microbiol* **56** (2), 172-8.
- Regassa L. B., Couch J. L. et Betley M. J. (1991).** Steady-state staphylococcal enterotoxin type C mRNA is affected by a product of the accessory gene regulator (*agr*) and by glucose. *Infect Immun* **59** (3), 955-62.

Rosec J. P. et Gigaud O. (2002). Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int J Food Microbiol* **77** (1-2), 61-70.

Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A. et Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230** (4732), 1350-4.

Sameshima T., Magome C., Takeshita K., Arihara K., Itoh M. et Kondo Y. (1998). Effect of intestinal Lactobacillus starter cultures on the behaviour of Staphylococcus aureus in fermented sausage. *Int J Food Microbiol* **41** (1), 1-7.

Schmid D., Fretz R., Winter P., Mann M., Hoger G., Stoger A., Ruppitsch W., Ladstätter J., Mayer N., de Martin A. et Allerberger F. (2009). Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. *Wien Klin Wochenschr* **121** (3-4), 125-31.

Schmidt K. A., Manna A. C. et Cheung A. L. (2003). SarT influences sarS expression in Staphylococcus aureus. *Infect Immun* **71** (9), 5139-48.

Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M. et Ragg T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* **7** 3.

Schwabe M., Notermans S., Boot R., Tatini S. R. et Kramer J. (1990). Inactivation of staphylococcal enterotoxins by heat and reactivation by high pH treatment. *Int J Food Microbiol* **10** (1), 33-42.

Schwan W. R., Lehmann L. et McCormick J. (2006). Transcriptional activation of the Staphylococcus aureus putP gene by low-proline-high osmotic conditions and during infection of murine and human tissues. *Infect Immun* **74** (1), 399-409.

Shafer W. M. et Iandolo J. J. (1978). Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. *Infect Immun* **20** (1), 273-8.

Shalita Z., Hertman I. et Sarid S. (1977). Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* **129** (1), 317-25.

Simeão do Carmo L., Dias R. S., Linardi V. R., José de Sena M., Aparecida dos Santos D., Eduardo de Faria M., Pena E. C., Jett M. et Heneine L. G. (2002). Food poisoning due to enterotoxigenic strains of Staphylococcus present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology* **19** (1), 9-14.

Sobrino O. J., Rodriguez J. M., Moreira W. L., Fernandez M. F., Sanz B. et Hernandez P. E. (1991). Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from dry fermented sausages. *Int J Food Microbiol* **13** (1), 1-10.

Stecchini M. L., Sarais I. et de Bertoldi M. (1991). The influence of Lactobacillus plantarum culture inoculation on the fate of Staphylococcus aureus and Salmonella typhimurium in Montasio cheese. *Int J Food Microbiol* **14** (2), 99-109.

- Ster C., Gilbert F. B., Cochard T. et Poutrel B. (2005).** Transcriptional profiles of regulatory and virulence factors of *Staphylococcus aureus* of bovine origin: oxygen impact and strain-to-strain variations. *Mol Cell Probes* **19** (4), 227-35.
- Su Y. C. et Wong A. C. (1995).** Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Appl Environ Microbiol* **61** (4), 1438-43.
- Su Y. C. et Wong A. C. (1996).** Detection of staphylococcal enterotoxin H by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Food Prot* **59** (3), 327-30.
- Su Y. C. et Wong A. C. (1998).** Production of staphylococcal enterotoxin H under controlled pH and aeration. *Int J Food Microbiol* **39** (1-2), 87-91.
- Sudirman I., Mathieu F., Michel M. et Lefebvre G. (1993).** Detection and properties of curvaticin 13, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus curvatus* SB13 *Current Microbiology* **27** (1),
- Sugiyama H. et Hayama T. (1965).** Abdominal viscera as site of emetic action for staphylococcal enterotoxin in the monkey. *J Infect Dis* **115** (4), 330-6.
- Sutherland J. P., Bayliss A. J. et Roberts T. A. (1994).** Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *Int J Food Microbiol* **21** (3), 217-36.
- Tanyildizi M. S., Özer D. et Elibol M. (2005).** Optimization of [alpha]-amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochemistry* **40** (7), 2291-2296.
- Tari C., Genckal H. et Tokatli F. (2006).** Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. *Process Biochemistry* **41** (3), 659-665.
- Tatini S. R., Jezeski J. J., Morris H. A., Olson J. C., Jr. et Casman E. P. (1971a).** Production of staphylococcal enterotoxin A in cheddar and colby cheese. *J Dairy Sci* **54** (6), 815-25.
- Tatini S. R., Jezeski J. J., Olson J. C., Jr. et Casman E. P. (1971b).** Factors influencing the production of staphylococcal enterotoxin A in milk. *J Dairy Sci* **54** (3), 312-20.
- Tatini S. R., Wesala W. D., Jezeski J. J. et Morris H. A. (1973).** Production of staphylococcal enterotoxin A in Blue, Brick, Mozzarella, and Swiss cheeses. *J Dairy Sci* **56** (4), 429-35.
- Theis T., Skurray R. A. et Brown M. H. (2007).** Identification of suitable internal controls to study expression of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance system by quantitative real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* **70** (2), 355-362.

Thellin O., Zorzi W., Lakaye B., De Borman B., Coumans B., Hennen G., Grisar T., Igout A. et Heinen E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* **75** (2-3), 291-5.

Thomas D. Y., Jarraud S., Lemerrier B., Cozon G., Echasserieau K., Etienne J., Gougeon M. L., Lina G. et Vandenesch F. (2006). Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infect Immun* **74** (8), 4724-34.

Todd E. C., Greig J. D., Bartleson C. A. et Michaels B. S. (2007a). Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 2. Description of outbreaks by size, severity, and settings. *J Food Prot* **70** (8), 1975-93.

Todd E. C., Greig J. D., Bartleson C. A. et Michaels B. S. (2007b). Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 3. Factors contributing to outbreaks and description of outbreak categories. *J Food Prot* **70** (9), 2199-217.

Todd E. C., Greig J. D., Bartleson C. A. et Michaels B. S. (2008). Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 5. Sources of contamination and pathogen excretion from infected persons. *J Food Prot* **71** (12), 2582-95.

Todd E. C., Greig J. D., Bartleson C. A. et Michaels B. S. (2009). Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 6. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment. *J Food Prot* **72** (1), 202-19.

Tremaine M. T., Brockman D. K. et Betley M. J. (1993). Staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression is not affected by the accessory gene regulator (agr). *Infect Immun* **61** (1), 356-9.

Tuckey S. L., Stiles M. E., Ordal Z. J. et Witter L. D. (1964). Relation of Cheese-Making Operations to Survival and Growth of *Staphylococcus aureus* in Different Varieties of Cheese. *J. Dairy Sci.* **47** (6), 604-611.

Ulve V. M., Monnet C., Valence F., Fauquant J., Falentin H. et Lortal S. (2008). RNA extraction from cheese for analysis of in situ gene expression of *Lactococcus lactis*. *J Appl Microbiol* **105** (5), 1327-1333.

Valle J., Toledo-Arana A., Berasain C., Ghigo J. M., Amorena B., Penades J. R. et Lasa I. (2003). SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **48** (4), 1075-87.

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. et Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3** (7), RESEARCH0034.

VanGuilder H. D., Vrana K. E. et Freeman W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* **44** (5), 619-26.

- Vaudaux P., Francois P., Bisognano C., Kelley W. L., Lew D. P., Schrenzel J., Proctor R. A., McNamara P. J., Peters G. et Von Eiff C. (2002). Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by hemB mutants of *Staphylococcus aureus* expressing small colony variant phenotypes. *Infect Immun* **70** (10), 5428-37.
- Vernozy-Rozand C., Mazuy C., Prevost G., Lapeyre C., Bes M., Brun Y. et Fleurette J. (1996). Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. *Int J Food Microbiol* **30** (3), 271-80.
- Vernozy-Rozand C., Meyrand A., Mazuy C., Delignette-Muller M. L., Jaubert G., Perrin G., Lapeyre C. et Richard Y. (1998). Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goats' milk lactic cheeses. *J Dairy Res* **65** (2), 273-81.
- Vicente G., Coteron A., Martinez M. et Aracil J. (1998). Application of the factorial design of experiments and response surface methodology to optimize biodiesel production. *Industrial Crops and Products* **8** (1), 29-35.
- Vignolo G. M., Suriani F., Pesce de Ruiz Holgado A. et Oliver G. (1993). Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *J Appl Bacteriol* **75** (4), 344-9.
- Wertheim H. F., Melles D. C., Vos M. C., van Leeuwen W., van Belkum A., Verbrugh H. A. et Nouwen J. L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* **5** (12), 751-62.
- Williams R. E. (1963). Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev* **27** 56-71.
- Wolz C., Goerke C., Landmann R., Zimmerli W. et Fluckiger U. (2002). Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during device-related infection. *Infect Immun* **70** (6), 2758-62.
- Wong M. L. et Medrano J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* **39** (1), 75-85.
- Wright A., Andrews P. L. et Titball R. W. (2000). Induction of emetic, pyrexia, and behavioral effects of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in the ferret. *Infect Immun* **68** (4), 2386-9.
- Wright J. D. et Holland K. T. (2003). The effect of cell density and specific growth rate on accessory gene regulator and toxic shock syndrome toxin-1 gene expression in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **218** (2), 377-83.
- Yarwood J. M., McCormick J. K., Paustian M. L., Kapur V. et Schlievert P. M. (2002a). Repression of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator in serum and in vivo. *J Bacteriol* **184** (4), 1095-101.
- Yarwood J. M., McCormick J. K., Paustian M. L., Orwin P. M., Kapur V. et Schlievert P. M. (2002b). Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus*

pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J Biol Chem* **277** (15), 13138-47.

Zehren V. L. et Zehren V. F. (1968). Relation of Acid Development During Cheesemaking to Development of Staphylococcal Enterotoxin A. *J. Dairy Sci.* **51** (5), 645-649.

Zhang S., Iandolo J. J. et Stewart G. C. (1998). The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiol Lett* **168** (2), 227-33.

Zhang S. et Stewart G. C. (2000). Characterization of the promoter elements for the staphylococcal enterotoxin D gene. *J Bacteriol* **182** (8), 2321-5.

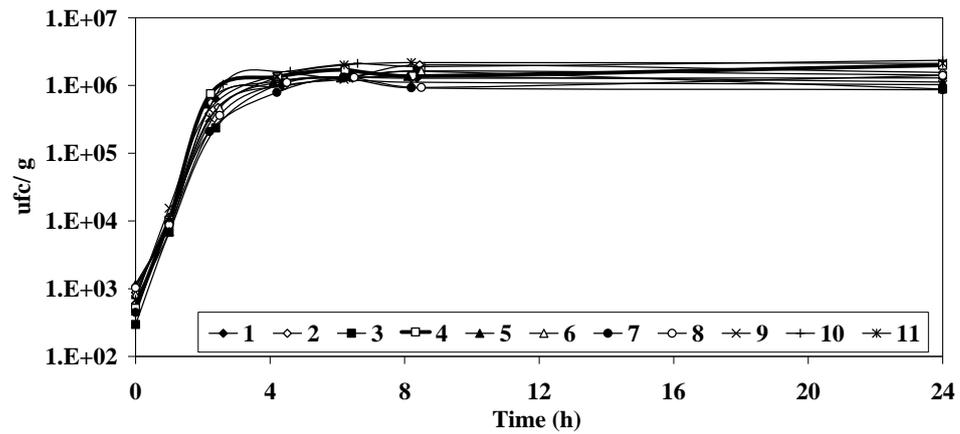
Zhou X. X., Pan Y. J., Wang Y. B. et Li W. F. (2008). Optimization of medium composition for nisin fermentation with response surface methodology. *J Food Sci* **73** (6), M245-9.

Zottola E. A., Yezzi T. L., Ajao D. B. et Roberts R. F. (1994). Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. *Int J Food Microbiol* **24** (1-2), 227-38.

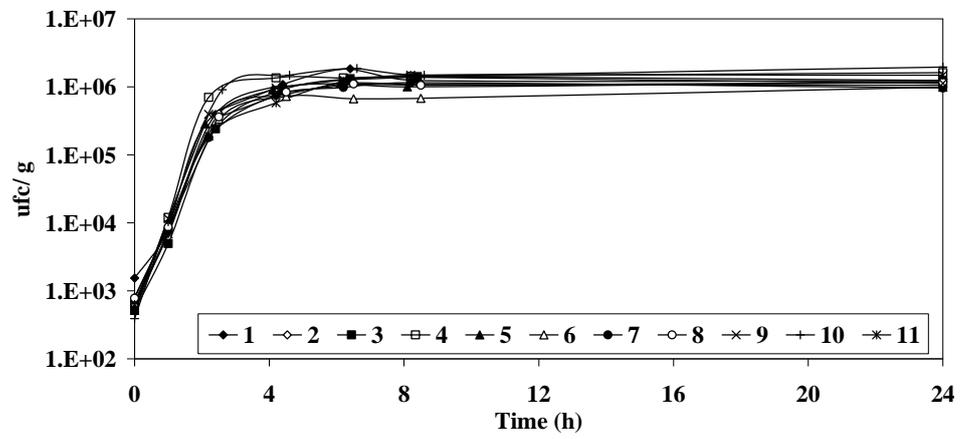
ANNEXES

ANNEXES

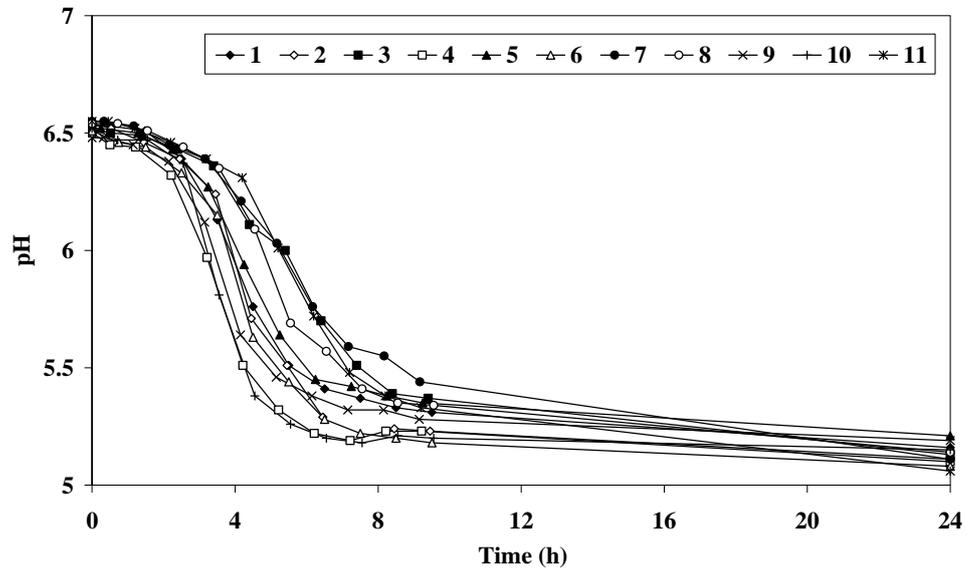
Annexe 1 : Croissance de la souche de *S. aureus* CIM433 au cours des onze fabrications fromagères réalisées pour l'Article 3.



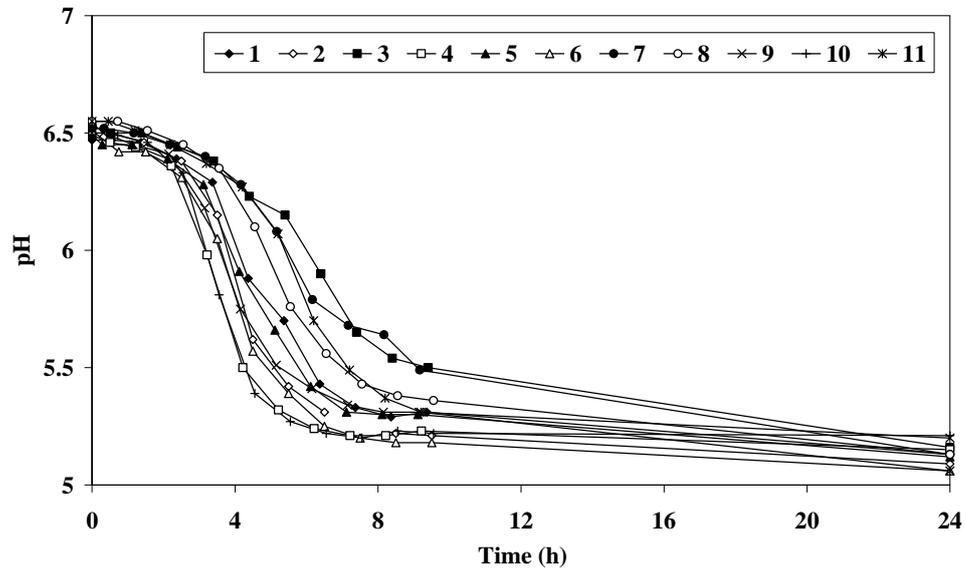
Annexe 2 : Croissance de la souche de *S. aureus* 361F au cours des onze fabrications fromagères réalisées pour l'Article 3.



Annexe 3 : Evolution du pH au cours des onze fabrications de fromages inoculés avec la souche *S. aureus* CIM433 réalisées pour l'Article 3.



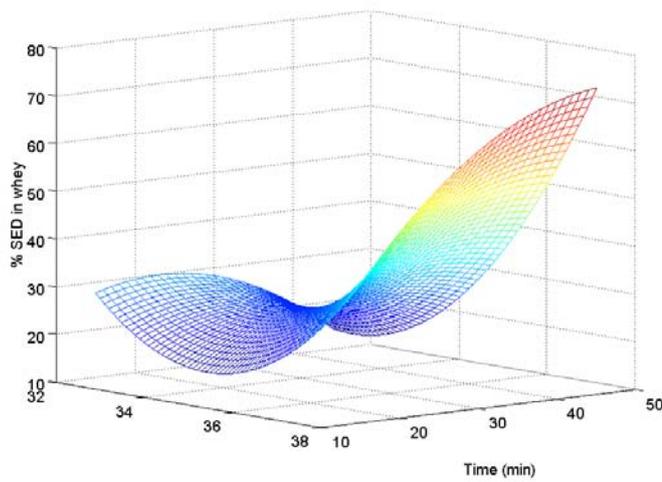
Annexe 4 : Evolution du pH au cours des onze fabrications de fromages inoculés avec la souche *S. aureus* 361F réalisées pour l'Article 3.



Annexe 5 : Modélisation des effets de la température et de la durée de maturation du lait sur la fraction de SED trouvées dans le lactosérum (D) issu de la fabrication de fromages à pâte pressée non cuite contaminé par la souche de *S. aureus* CIM433 ou 361F (Equations et surfaces de réponse)

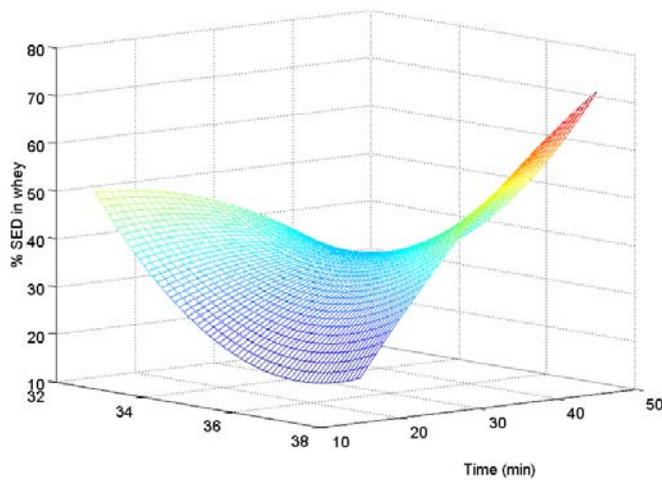
$$Z_{D(CIM433)} = 2474.796 - 139.903 \times T - 7.132 \times t + 1.967 \times T^2 - 0.033 \times t^2 + 0.270 \times T \times t$$

$$R^2 = 0,820 \text{ et } p\text{-value} = 0,117$$



$$Z_{D(361F)} = 2216.893 - 115.890 \times T - 12.212 \times t + 1.500 \times T^2 - 0.019 \times t^2 + 0.399 \times T \times t$$

$$R^2 = 0,809 \text{ et } p\text{-value} = 0,130$$



Annexe 6 : Article de Derzelle *et coll.*, 2009.



Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth

Sylviane Derzelle^{a,*}, Françoise Dilasser^a, Manon Duquenne^{a,b}, Véronique Deperrois^a

^a Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et des Procédés agro-alimentaires (AFSSA-Lerqap), 23 Avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex, France

^b Institut National de la Recherche Agronomique, Unité des Bactéries Lactiques et pathogènes Opportunistes, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 November 2008

Received in revised form

9 June 2009

Accepted 10 June 2009

Available online 17 June 2009

Keywords:

Staphylococcus aureus

Food-poisoning

Enterotoxin expression

Food isolates

Real-time RT-PCR

ABSTRACT

Staphylococcal enterotoxins (SEs) are a large family of structurally related superantigens produced by *Staphylococcus aureus* and responsible for staphylococcal food-poisoning (SFP). To better understand how the *se* genes are expressed, and especially the newly described ones (*seg* to *ser*, *seu*), a quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction was developed and used to monitor their expression in a panel of 28 enterotoxigenic staphylococci including seven reference strains and 21 isolates collected from foods and SFP outbreaks in France. Kinetic mRNA studies revealed four distinct patterns of expression according to the enterotoxins genes analysed corresponding either to: (i) unchanged mRNAs abundance during bacterial growth (*sea*, *see*, *sej*, *sek*, *seq* and *sep*); (ii) slight decrease in transcript levels (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *seu*); (iii) drastic induction of expression at the end of the exponential growth phase (*seb*, *sec*, *seh*), or (iv) modest post-exponential increase in mRNAs level (<10-fold) (*sed*, *ser*, *sel*). The study demonstrates that all *se* containing strains are potentially able to produce SEs and that most of the newly described *se* genes are likely not controlled by the *agr* system. The rapid assessment of *se* transcripts levels by RT-qPCR might provide valuable clue to evaluate the poisoning risk linked to a strain.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Staphylococcal food-poisoning (SFP) is an intoxication resulting from ingestion of foods containing one or more preformed *Staphylococcus aureus* enterotoxins (SEs). The symptoms include the sudden onset of nausea, violent vomiting, abdominal cramps and diarrhea within 2–8 h after food consumption (Balaban and Rasooly, 2000; Murray, 2005). The disease may be severe enough to warrant hospitalisation, but it is usually self-limiting (Murray, 2005). SFP is a prevalent cause of food-borne disease worldwide and control of this disease is of considerable economic importance to food industries (Genigeorgis, 1989; Su and Wong, 1997). In France, *S. aureus* represents the second cause of bacterial food-borne disease after *Salmonella* and the prevailing agent of collective food-poisoning due to dairy products (cheeses).

Staphylococcal enterotoxins are a family of structurally related secreted proteins belonging to the pyrogenic toxin superantigen family (Balaban and Rasooly, 2000). Superantigens bypass conventional antigen recognition by directly cross-linking major

histocompatibility complex class II (MHCII) molecules on antigen-presenting cells with T-cell receptors. This leads to massive T-cell proliferation and cytokine release, which may end in toxic shock syndrome (Balaban and Rasooly, 2000). Staphylococcal enterotoxins are named according to their emetic activities. Only the superantigens (SAGs) that induce emesis following oral administration in a monkey model are designated as SEs. The other related toxins (that do not have emetic properties or have not been tested so far) are designated as staphylococcal enterotoxin-like superantigens (SEIs) proteins (Lina et al., 2004). To date, in addition to the five classical types discovered in the 1960's (SEA–SEE), 16 new types of SEs or SEIs have been described (SEG–SEI, SEIJ–SEIQ, SER–SET, SEIU–SEIV) (Su and Wong, 1995; Munson et al., 1998; Zhang et al., 1998; Fitzgerald et al., 2001; Orwin et al., 2001, 2002; Omoe et al., 2003; Omoe et al., 2005; Thomas et al., 2006; Ono et al., 2008).

Enterotoxigenic *S. aureus* strains have different profiles of *se* genes and may simultaneously harbour several of them. All of these genes are located on mobile genetic elements, such as phages (*sea*, *see*, *sep*), plasmids (*sed*, *sej*, *ser*, *ses*, *set*), and *S. aureus* pathogenicity islands (SaPIs) (Betley and Mekalanos, 1985; Kuroda et al., 2001; Yarwood et al., 2002; Omoe et al., 2005; Ono et al., 2008). The *ser* and *sej* gene determinants are encoded on two kinds of plasmids along with *sed* (pIB485) or *ses* and *set* (pF5-like) (Zhang et al., 1998; Omoe et al., 2003;

* Corresponding author. Tel.: +331 49 77 28 30; fax: +331 49 77 46 66.
E-mail address: s.derzelle@afssa.fr (S. Derzelle).

Ono et al., 2008). *sel* and *sec* were demonstrated to occur together (Fitzgerald et al., 2001; Kuroda et al., 2001), as well as *seq* and *sek* (Yarwood et al., 2002; Sumby and Waldor, 2003). The genes *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* and optionally *seu* or *sev* compose the enterotoxin genes cluster (*egc*) organized as an operon (Thomas et al., 2006).

Data concerning the distribution and prevalence of newly described enterotoxin-like genes in food-derived staphylococci is growing (Borst and Betley, 1994; Bania et al., 2006; Chiang et al., 2006, 2008; Hwang et al., 2007; Poli et al., 2007). In contrast, information regarding the individual *se* gene expression and mechanism of gene regulation is very limited, except for the 5 classical ones. Differences in expression occur among the classical *se* genes with respect to temporal regulation, toxin yield, and mechanism of gene regulation. SEB and SEC are expressed in greater quantities than the other enterotoxins, often on the order of 100 µg/ml of culture supernatant, whereas maximal production of SEA, SED, and SEE is usually less than 8 µg/ml (Bergdoll, 1979). SEA is produced throughout the log phase of growth. The greatest concentration of SEB, SEC and SED is primarily produced during the transition from the exponential to the stationary phases of growth (Czop and Bergdoll, 1974; Bergdoll, 1979; Otero et al., 1990), a characteristic of their regulation by the accessory gene regulator (*Agr*) system (Czop and Bergdoll, 1974; Gaskill and Khan, 1988; Bayles and Iandolo, 1989; Regassa et al., 1991; Tremaine et al., 1993). The *Agr* system is a two-component signalling pathway whose activating ligand is a bacterial-density-sensing peptide (autoinducing peptide) (Novick, 2003). The *agr* operon produces two distinct transcripts, designated RNAII and RNAIII. RNAII codes for the components of the quorum-sensing system. RNAIII serves as the intracellular effector of the system. As the cell density increases in a growing culture, the intracellular level of RNAIII increases due to the activity of the *Agr* system. RNAIII regulates the synthesis of the pleiotropic regulator Rot, by inhibiting its translation through RNAIII-*rot* mRNA base pairings. This interaction controls the *Agr*-mediated post-exponential-phase increase in *seb* and *sed* transcription (Tseng et al., 2004; Tseng and Stewart, 2005; Geisinger et al., 2006).

Real-time reverse transcription polymerase chain reaction has become a very powerful tool for gene expression studies. The high

sensitivity and specificity of RT-PCR, its reliable reproducibility and wide dynamic quantification range, make it a particularly useful technique for monitoring expression of multiple genes in various growth conditions. The purpose of this present study was to develop an RT-PCR-based procedure to determine the temporal gene expression of enterotoxins genes, including most of the newly discovered, in optimal growth conditions. PCR assays that allow for the screening of 18 *se* genes were developed and distribution of those genes was first examined in a panel of enterotoxigenic coagulase-positive staphylococci, including reference strains and isolates collected from foods and SFP outbreaks in France since the 1980's. A total of 28 strains displaying multiple enterotoxin genotypes were selected for further mRNA kinetic study. Staphylococcal *se* gene expression over time was analysed using a delta-Ct relative quantification model with PCR efficiency correction and multiple reference genes normalization.

2. Methods

2.1. Source of bacterial isolates and growth conditions

Twenty-eight coagulase-positive staphylococci isolates were considered for mRNA kinetic study: 15 strains isolated from suspected food samples collected during investigation of SFPO occurring in France between 1981 and 2002, 3 strains isolated from cheeses and 7 reference strains. Strains were grown on brain heart infusion broth (BHI, Oxoid, France) at 37 °C under shaking (200 rpm). All cultures were performed by inoculating 30 ml BHI in a 50 ml-flask with 500 µl of an overnight pre-culture (approximately 5 × 10⁶ CFU/ml). The approximate number of CFU per millilitre was determined by plating 10-fold dilutions of the culture onto Tryptone soy Agar (TSA, Oxoid). The number of CFU from 2 plates of different dilutions was used to estimate the concentration.

2.2. Investigation of the genotypes

Primers for PCR and real-time PCR (listed in Table 1) were designed on the basis of alignment of *se* genes published sequences.

Table 1
Primer sequences for *se* PCR detection and RT-PCR analysis.

Primers	Nucleotide sequence (5'–3')	Target	Primers	Nucleotide sequence (5'–3')	Target
SEAfor	CCTTTGGAAACGGTTAAAAC	<i>sea</i>	SEKfor	GTCACAGCTACTAACGAATATC	<i>sek</i>
SEArev	CTCTGMACCTTYCCATCAAA	128 pb	SEKrev	TAGTGCCGTTATGTCCATAAATG	193 pb
SEART	CGTAATTAACCGAAGGYTCTGT		SEKRT	ACCCATCATCTCCTGTGTAG	
SEBfor	GGGTATTGAAAGATGGTAAAAATT	<i>seb</i>	SELfor	TAGATTCCCAAGAATAATACC	<i>sel</i>
SEBrev	AGGCGAGTGTAAATTCATAGAGTT	140 pb	SELrev	CTTTACCAGTATCAITGTGTCC	176 pb
SEBRT	CATGTCATACAAAAGCTATTCTCA		SELRT	CGAGAAATTAGAACCATCATTCAT	
SECfor	TGTACTTRTAAGAGTTTATGAAAATA	<i>sec</i>	SEMfor	TCATATCGCAACCCGCTGATGATG	<i>sem</i>
SECrev	TCCTAGCTTTTATGCTAGTCTTGAG	104 pb	SEMrev	TCAGCWGTTACTGTGCAATTAT	150 pb
SECR	ATCATACAAAAGTATTGCCGTTA		SEMRT	AYTTCTCTAAATAATCACCYGGCTAA	
SEDfor	TCAATTTGTGGATAAATGGTGTAC	<i>sed</i>	SENfor	GATGAAGAGARAGTTATAGCCGT	<i>sen</i>
SEDrev	TTTCTCCGAGAGTATCATTAT	154 pb	SENrev	ATGTTACCGGTATCTTTATTGTAT	167 pb
SEDRT	GGGAAAATCACCCTTAACATC		SENRT	AACTCTGCTCCYACTGAACC	
SEEfor	CCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC	<i>see</i>	SEOfor	GTGTAAGAAGTCAAGTGTAGAC	<i>seo</i>
SEErev	ACCCCAAAGCTGTCTGAG	116 pb	SEOrev	CAGCAGATWTTCCATCTAAC	163 pb
SEERT	ATAACTTACCGTGGACCCTTC		SEORT	GTACAGGCAGTWTYCACTTG	
SEGfor	TTACAAAGCAAGACACTGGCTCA	<i>seg</i>	SEPfor	GGAGCTAGACCTCAGTCAAGA	<i>sep</i>
SEGrev	TCCAGATTCAAAYGCAGAACMAT	73 pb	SEPrev	ACCAGAAGAAGGGTAAACTCA	115 pb
SEGRT	ATATGGAACAAAAGTACTAGTTC		SEPR	TATCTCAACTGTGTATCTGGA	
SEHfor	TGAATGCTATATGGAGGTACAAC	<i>seh</i>	SEQfor	GGAAATACGTTGGCGAATCAA	<i>seq</i>
SEHrev	CTACCCAAACATTAGCACCAA	80 pb	SEQrev	TGATATCCATATTCCTGACC	221 pb
SEHRT	GACCTTACTTATTTCCGCTGTC		SEQRT	AAAACCTCTGCTGACCAGTT	
SEIfor	GGTAYCAATGATTTGATCTCAGAAT	<i>sei</i>	SERfor	TCCTATTCTTATTTCAGAAATACA	<i>ser</i>
SEIrev	GTATTGTCCTGATAAAGTGCC	147 pb	SERrev	GGGTATTTCAAACACATCTAAC	102 pb
SEIRT	TTTACCAKTGTTATTATGACCATAT		SERRT	CTCTTGATTCATCTTAGGACT	
SEJfor	CTGCATGAAAACAATCAACTTTATG	<i>sej</i>	SEUfor	AATGGCTCTAAAATTGATGGTTC	<i>seu</i>
SEJrev	GAACAACAGTCTGATGCTATC	79 pb	SEUrev	GTTTGTCCCAACAAATCTAYG	105 pb
SEJRT	CAAAGGTACTAGGGTTGTATAA		SEURT	CCATATTATCCGCTGAAAATAG	

The length of the PCR products ranged between 73 and 221 bp. Primers were purchased from Sigma genosys (Evry, France). DNA samples were prepared using InstaGene™ Matrix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) from few bacterial colonies. A GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) was used. PCR assays contained 2.5 U of FastStart Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics, Meylan, France), 1X buffer without MgCl₂, 4 mM of MgCl₂, 100 μM of each dNTP, 0.6 μM of each primer and 2 μl of DNA sample in a 50 μl total reaction volume. All PCR series included a positive amplification control and a no-template control. Five microliters aliquots of PCR assays were analyzed by 2% (w/v) agarose gel electrophoresis in 1X TBE buffer. Marker VI (Roche Diagnostics) was used as molecular mass standard.

2.3. RNA extraction

Samples for RNA extraction were taken at four different times during an *in vitro* growth: in mid-exponential growth phase (OD₆₀₀ = 0.35), late-exponential growth phase (2 h after the first time point; OD₆₀₀ of 4–6), early stationary growth phase (3 h 30 after the second time point; OD₆₀₀ of 6–12) and late stationary growth phase (24 h-old culture). Cells were collected by centrifugation for 1 min at 4 °C at 10,000 × g and stored at –80 °C to prevent RNA degradation. Bacterial pellets were resuspended in 500 μl of 25 mM Tris–HCl (pH 7.6)- 60 mM EDTA solution and transferred into tubes containing 500 μl of acid phenol (pH 4.5) and 0.5 g of 0.1-mm-diameter glass beads (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Cells were mechanically broken with a MagNA Lyser apparatus (Roche Diagnostics, Meylan, France) as homogenizer (three 45-s cycles of homogenization at maximum speed with 1-min intervals on ice). RNA was then extracted and purified with the TRI[®] reagent (Sigma Aldrich) according to the manufacturer's instructions. After isopropanol precipitation, total RNA was resuspended in 200 μl of 10 mM Tris–HCl (pH 7.6) and treated twice with RNase-free DNase I to eliminate residual genomic DNA using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics) and the DNA-free kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to manufacturer's protocols. RNA integrity was electrophoretically verified by ethidium bromide staining and the absence of chromosomal DNA contamination was checked by real-time PCR. RNA samples were then quantified by measuring A₂₆₀ and A₂₈₀ using a Biowave II Spectrophotometer (Biochrom, Cambridge, UK). Two independent cultures and RNA extractions were performed for each strain.

2.4. Reverse transcription and real-time PCR

cDNAs were synthesized from 1 μg of total RNA in a 25-μl reaction volume containing 50 U AMV Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics), a mix of gene-specific RT primers (80 nM each, including targets and reference genes, Table 1), and 0.4 mM deoxynucleoside triphosphates mix. The samples were heated at 80 °C for 2 min to denature the template and subsequently cooled on ice. Reverse transcription reactions were performed after enzyme addition at 42 °C for 1 h. Since the reverse transcription step is the source of most of the variability in quantitative PCR, cDNA synthesis was carried out in duplicate from each of the two different biological replicates.

Real-time quantitative PCRs were performed using a LightCycler 1.2 Instrument system (Roche Diagnostics) and the FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics). Q-PCR reactions were conducted in 12 μl of reaction volume containing 1 μl of the relevant cDNA as template, 0.36 μl of each gene-specific primers (20 μM), 1.2 μl MgCl₂ (25 mM), 1.2 μl of 10× Master Mix and nuclease-free water. cDNAs were amplified using the following thermal cycling parameters: denaturation (95 °C for 8 min), 45

amplification cycles (95 °C for 10 s, 58 °C for 10 s, 72 °C for 10 s with fluorescence readings after each extension step), melting curve (60–95 °C with a heating rate of 0.1 °C per second and a continuous fluorescence readings) and a cooling step to 40 °C. The threshold cycle values (C_T) for each transcript calculated by the LightCycler software were exported to Excel for the relative quantification analysis.

To minimize experimental variations, the 4 samples taken at different times during a same culture were simultaneously treated (RNA and cDNA preparations, qPCR analysis). To normalize data, three reference genes were quantified on the same batch of cDNA and PCR run as the *se* genes of interest.

2.5. Relative quantification analysis

PCR efficiency (E) of each gene was determined from standard curves generated using serial 10-fold dilutions of a pool of cDNA from the four different samples tested and calculated according to the equation $E = 10^{-1/S}$ where S is the slope of the standard curve.

Data were analysed using a delta-Ct relative quantification model with PCR efficiency (E) correction and multiple reference genes normalization, as described by Vandesompele et al. (2002). Practically, Ct values were transformed into raw relative quantities (Q) by the comparative Ct method using the gene-specific PCR efficiency E, according to the delta-Ct formula: $Q = E^{\text{delta-Ct}} = E^{(\text{minCt} - \text{sampleCt})}$, with the highest relative quantities for each gene set to 1. A normalization factor based on the geometric mean of a number of reference genes was next calculated for each sample with the freely distributed geNorm Visual Basic Application for Microsoft Excel (Vandesompele et al., 2002). These factors are allowed to standardize each reaction run with respect to RNA integrity, RT efficiency or cDNA sample loading variations. The normalization factors were then used to calculate the normalized *se* expression levels by dividing the raw *se* relative quantities for each sample by the appropriate normalization factor. Results were finally expressed relative to a calibrator sample, i.e., the sample harvested at mid-exponential growth phase for which normalized relative expression ratio for each *se* gene equals 1.

2.6. Identification of reference genes for normalization

Reference genes for normalization were determined from a set of housekeeping genes using geNorm (Vandesompele et al., 2002). The geNorm VBA evaluates the stability of the transcription of candidate reference genes in a given panel of cDNA sample (based on the mean pairwise variation of a gene with all other tested genes) and allows ranking of the tested genes according to their expression stability measure M. M is calculated as the average pairwise variation in the expression of a gene relative to that of each of the other tested genes. Genes with the lowest M values have the most stable expression.

Four strains (i.e. strains 383 F, 379 F, 334E and 395 F) were used to compare the expression level of nine candidate reference genes (i.e. *gmk*, *gyrB*, *hup*, *recA*, *sodA*, *ftsZ*, *rpoB*, *gap* and *rplD*) in the four different growth phases tested. Primers were designed (Duquenne, unpublished data) and their efficiency was controlled using samples standard curves, dilutions and linear regression calculations. RNAs samples were extracted and one μg of each sample was used for cDNA synthesis. cDNA synthesis was performed from each of the four strains and pooled (2 by 2) to be used as template in qPCR experiments. All measurements were produced in duplicate. Ct values were transformed into raw relative quantities (Q) and used as input data in the geNorm applet. As recommended, the three most stable internal control genes were selected to normalize the *se* gene expression analysis.

3. Results

3.1. Detection and distribution of *se*-genes

New sets of specific primers were designed for the screening of 18 out of 21 genes described to encode SEs and SE-like toxins (*sea* to *see*, *seg* to *ser*, *seu*) (Table 1). The distribution of *se* genes was next studied in a large panel of coagulase-positive staphylococci isolates recovered from SFP outbreaks and suspected food samples in France since the 1980's (K  rouanton et al., 2007). The most frequently found genes were *sea* and those of the enterotoxin gene cluster (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*). The gene *see* was not detected. Several *se* genes were always found associated: *sed*, *sej* and *ser*, *seg* and *sek*, or *sel* and *sec*.

A total of 28 strains harbouring various combinations of one or more *se* genes were selected for further mRNA kinetic study, among which seven additional reference strains. The diversified enterotoxin patterns of these strains are summarized in Table 2. Briefly, it included isolates harbouring genes coding for *sea* ($n = 9$), *seb* ($n = 4$), *sel*–*sec* ($n = 8$), *sed*–*sej*–*ser* ($n = 6$), the *egc* cluster ($n = 13$, including 3 strains carrying on *seu*), *seh* ($n = 7$), *sek* ($n = 4$)–*seg* ($n = 5$), *sep* ($n = 4$) and *see* ($n = 1$).

3.2. Bacterial growth and growth cycle

Growth of *S. aureus* on BHI broth was monitored by following cell density at OD₆₀₀ for each strain (Fig. 1). Similar growth rate was observed for all strains, with an average generation time at mid-log phase ranging from 20 to 30 min. Four key points of the bacterial growth cycle were considered for total RNA extractions. The first sampling was performed in early to mid-exponential growth phase. Cells were harvested at an OD₆₀₀ of 0.35, equivalent to 5×10^7 CFU/ml. The next samples were taken 2 h and 5 h 30 later, in late-exponential and early stationary growth phases, respectively. The end of the

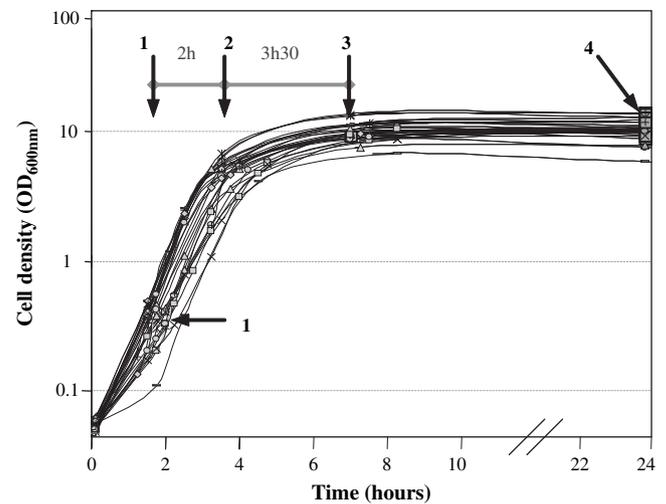


Fig. 1. Average growth of 28 *S. aureus* strains in BHI broth. Increase in cell density is measured at OD₆₀₀. Samples were harvested from the culture at the time points plotted (from 1 to 4).

exponential growth phase is usually accompanied by up-regulation of the genes encoding secreted proteins. By that time, *S. aureus* population approached 1×10^9 CFU/ml. The transition to stationary growth phase is accompanied by a major metabolic rearrangement shutting down most housekeeping and facultative genes. The population was close to 4×10^9 CFU/ml at this phase. The last sampling was collected in full stationary growth phase (24 h-old cultures) when cells are prepared for long-term survival. It contained between 3×10^9 to 1×10^{10} CFU/ml.

3.3. Identification of internal controls for RT-qPCR experiments

Reliability of quantitative real-time RT-PCR analyses depends on an appropriate normalization. To find proper internal controls, the expression stability of 9 housekeeping genes was evaluated by RT-qPCR using the geNorm Visual Basic Application for Microsoft Excel (Vandesompele et al., 2002). The expression of most genes was found to vary during cell growth, but particularly at late stationary growth phase, where higher Ct values were measured for all housekeeping genes tested (data not shown). Only two genes, *ftsZ* and *rpoB*, with a geNorm expression stability measure M below 1.0, showed stable transcriptional expression levels in all conditions, while two others (*recA*, *sodA*) were below the geNorm default limit of $M = 1.5$ (Table 3). This result suggested that the combination of *ftsZ* and *rpoB* is the optimal set of reference genes for studying differential gene expression during growth in *S. aureus*. However, better expression stability values could be obtained if only the three first samples were considered for the analysis. In those conditions (from exponential to early stationary growth phases), four reference genes obtained M value below 1.0 and could be considered as suitable for normalization (*ftsZ*, *rpoB*, *sodA* and *recA*). As changes in target gene expression were expected post-exponentially, the sampling at 24 h was considered of less biological significance for the study. The reference gene *sodA*, which appeared to be among the best performing reference genes in all conditions (see ranking of each gene in Table 3), was therefore retained as controls with *ftsZ* and *rpoB* to normalize the expression of *se* genes.

3.4. Kinetic analyses of enterotoxins expression

To obtain an overall picture of the dynamics of expression of the various *se* genes during optimal growth, changes in transcript levels

Table 2
S. aureus strains used in this study.

Strains	Origin	<i>se</i> genotype
395 F	Mixed salad	<i>sea</i>
359 F	Cream bun	<i>sea</i>
361 F	Raw milk cheese	<i>sea, sed, sej, ser</i>
371 F	Chocolate cake	<i>sea, sed, sej, ser</i>
437 G	Rillettes (potted meat)	<i>sea, seh, seq, sek</i>
295 E	Nougatine	<i>sea, seh, seq, sek</i>
334 E	Spaghettis	<i>sea, seo, sem, sei, sen, seg</i>
339 E	Sheep's milk cheese	<i>seb, seo, sem, sei, sen, seg</i>
374 F	Cheese	<i>seb, seo, sem, sei, sen, seg</i>
428 G	Unspecified food	<i>sel, sec</i>
377 F	Mixed salad	<i>sel, sec, sep</i>
383 F	Rice salad	<i>sel, sec, seh, seo, sem, sei, seu, sen, seg</i>
399 F	Sliced pork	<i>sed, sej, ser, sep, seo, sem, sei, sen, seg</i>
425 G	Raw milk cheese	<i>seo, sem, sei, sen, seg</i>
382 F	Unspecified food	<i>seh, seo, sem, sei, seu, sen, seg</i>
379 F	Lasagne (pasta)	<i>seh</i>
CIM 441	Cheese (^b Actilait)	<i>sec, sel, seg, sem, sei, sen, seo</i>
CIM 479	Cheese (^b Actilait)	<i>seb, seg, sem, sei, sen, seo</i>
CIM 433	Cheese (^b Actilait)	<i>sed, sej, ser</i>
FRI S6	Frozen shrimp (^a FRI)	<i>sea, seb, seq, sek</i>
Mu 50	Surgical wound infection	<i>sel, sec, sea, seo, sem, sei, sen, seg</i>
FRI 1230	Unknown (^a FRI)	<i>sel, sec, sep, seq, sek</i>
FRI 361	Unknown (^a FRI)	<i>sel, sec, sed, sej, ser, seo, sem, sei, sen, seg</i>
FRI 137	Leg abscess (ATCC19095)	<i>sel, sec, seh, seo, sem, sei, seu, sen, seg</i>
FRI 1151	Unknown (^a FRI)	<i>sed, sej, ser</i>
FRI 326	Unknown (^a FRI)	<i>see, seq</i>
FRI 569	Nose (^a FRI)	<i>seh</i>
A900322	Toxic shock syndrome	<i>sep, seo, sem, sei, sen, seg</i>

^a Food Research Institute (Madison, USA).

^b Actilait (La Roche sur Foron, France).

Table 3
Ranking of candidate control genes according to their expression stability value (*M*).

Gene	Function	Rank (<i>M</i> value) samples A1–A3	Rank (<i>M</i> value) samples A1–A4
<i>ftsZ</i>	Cell division protein	1 (0.629)	1 (0.830 ^a ; 1.027 ^b)
<i>rpoB</i>	RNA polymerase beta subunit	1 (0.602)	1 (0.986 ^a ; 1.095 ^b)
<i>sodA</i>	Superoxide dismutase	3 (0.754)	4 (1.457)
<i>recA</i>	Recombinase A	4 (0.930)	3 (1.126)
<i>hup</i>	DNA-binding protein HU	5 (1.392)	7 (2.433)
<i>rplD</i>	50S ribosomal protein L4	6 (1.442)	5 (1.553)
<i>gyrB</i>	Gyrase subunit B	7 (1.988)	6 (2.058)
<i>gap</i>	Gyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	8 (3.506)	nd
<i>gmk</i>	Guanosine monophosphate kinase	9 (4.408)	8 (4.539)

Stability values are calculated after stepwise exclusion of the least stable genes.

^a *M* value calculated after stepwise elimination of *sodA* (keeping *ftsZ*, *rpoB* and *recA*).

^b *M* values calculated after stepwise elimination of *recA* (keeping *ftsZ*, *rpoB* and *sodA*); nd : not determined; A1: mid-exponential; A2: late exponential; A3: early stationary; A4: late stationary growth phases.

were measured over time in 28 enterotoxigenic strains. All *se* genes harboured by a strain were individually analysed, except those of the *egc* operon for which only *seg* and *seu* were monitored in all strains. The other *egc* components (*sei*, *sem*, *sen*, and *seo*) were examined in three strains. Analyses were carried out by RT-qPCR with a modified delta-Ct relative quantification model, including PCR efficiency correction and multiple reference genes normalization (Vandesompele et al., 2002).

The results, expressed as normalized quantities for each *se* gene relative to the mid-exponential sample, are summarized in Figs. 2–4. Transcription of all *se* genes were successfully detected in all growth phases. Although the relative abundance of each transcript differentially varied during growth, it appeared that each *se* gene had a specific behaviour and its own pattern of expression, whatever the strain examined. Comparative analyses allowed to distinguish 4

different profiles. (i) The first expression pattern was composed by genes for which growth phases had no significant impact on *se* expression (Fig. 2). The amount of *sea*, *see*, *sek-seq*, *sep* and *sej* transcripts remained rather unchanged throughout the growth cycle, although strain-specific differences in the absolute levels of transcripts were noted (data not shown). In comparison, (ii) the amount of mRNAs from the *egc* cluster tended to decrease after the exponential growth phase (Fig. 3). In contrast, (iii) the level of *seb*, *sec* and *seh* mRNAs was found to undergo a drastic induction during the transition from exponential to stationary growth phases (Fig. 4B). Maximal induction occurred at the entry into stationary phase for *seb* and *sec*, whereas it happened in late-exponential growth phase for *seh*. Strain-to-strain variations in the relative induction factors level did also exist. Ratios ranging from a modest 10-fold (strain CIM 441) to up to 10000-fold (strains 377F, 428G and FRI1230) were

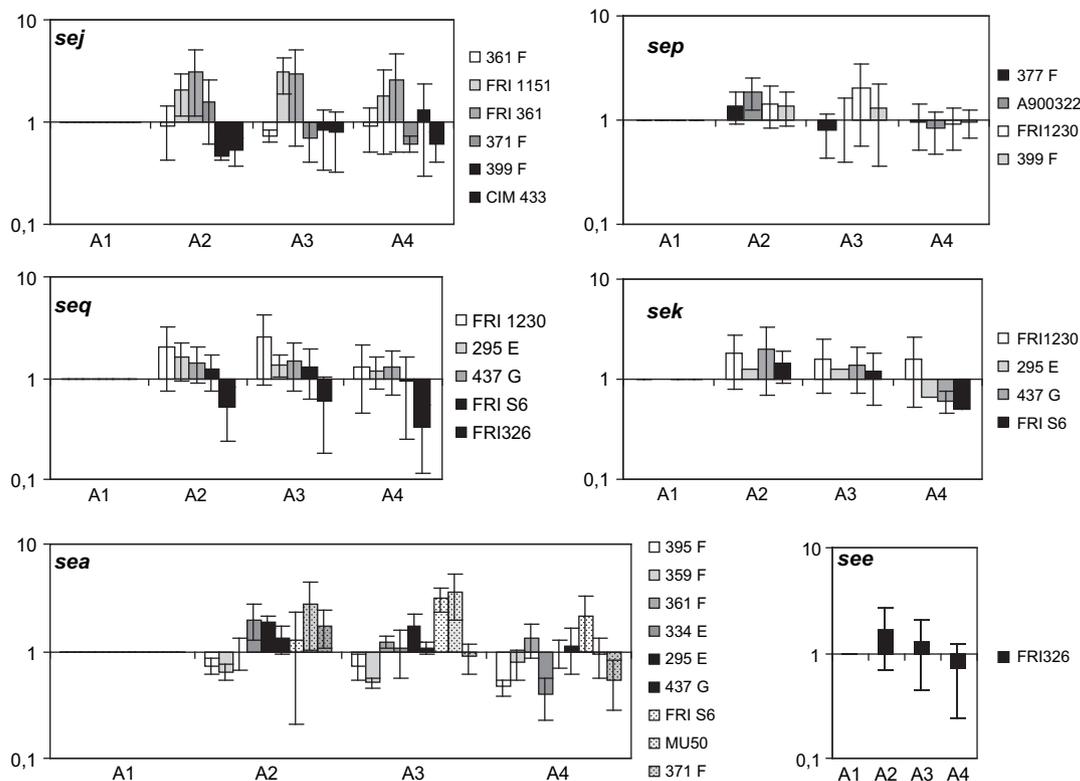


Fig. 2. Mean relative expression ratios for *sea*, *see*, *sek*, *seq*, *sep* and *sej*. Gene expression levels were quantified using RT-qPCR. Normalization was provided using the geometric mean of 3 reference genes (*ftsZ*, *rpoB* and *sodA*). The results are based on cultures of 28 strains collected at 4 time points of growth (A1: mid-exponential; A2: late exponential; A3: early stationary; and A4: late stationary growth phases) with 2 replicates (i.e. 2 independent cultures that were each sampled 4 times). Samples collected from the mid-exponential growth phase (A1) were used as calibrator for all subsequent samples. Error bars indicate standard deviations.

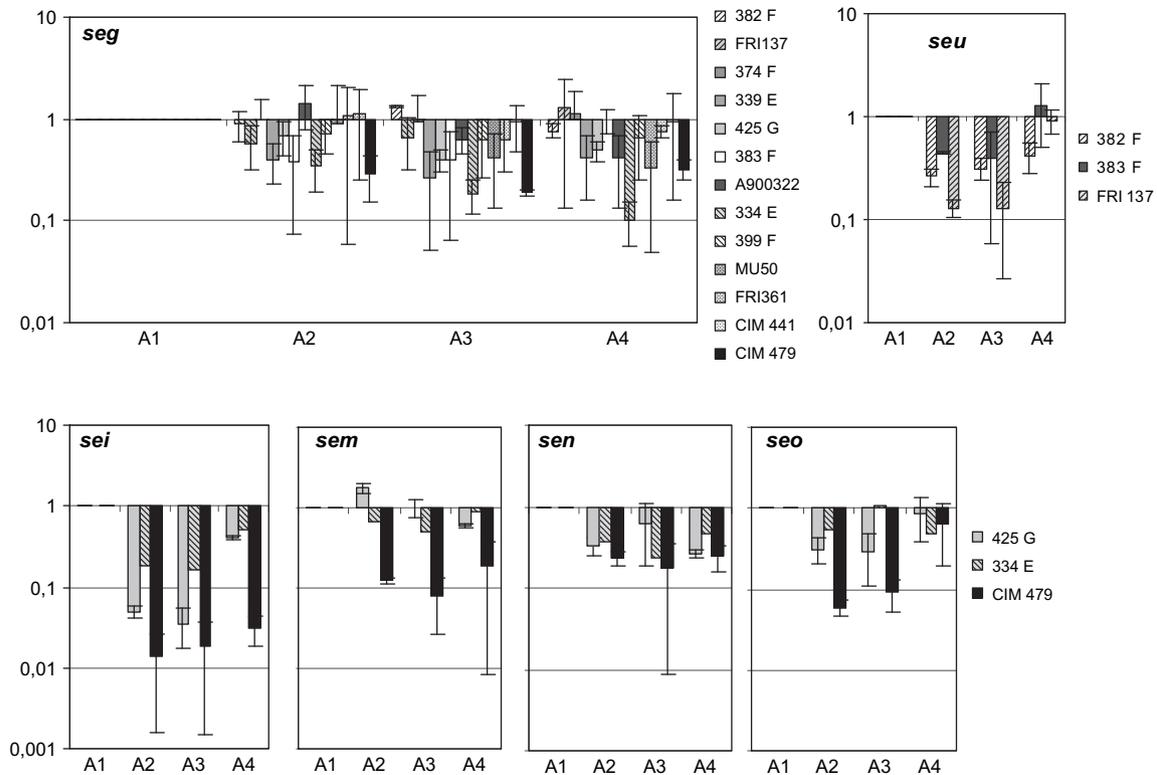


Fig. 3. Mean relative expression ratios for the *egc* genes. Gene expression levels were quantified using RT-qPCR. Normalization was provided using the geometric mean of 3 reference genes (*ftsZ*, *rpoB* and *sodA*). The results are based on cultures of 28 strains collected at 4 time points of growth (A1: mid-exponential; A2: late exponential; A3: early stationary; and A4: late stationary growth phases) with 2 replicates (i.e. 2 independent cultures that were each sampled 4 times). Samples collected from the mid-exponential growth phase (A1) were used as calibrator for all subsequent samples. Error bars indicate standard deviations.

observed upon entry into stationary phase for *sec*, except in one strain. In Mu50, no significant induction of *sec* expression over time was observed, suggesting a probable defect in the *agr*-mediated activation system in this strain. Strain Mu50 was previously reported to produce no detectable levels of RNAIII (Somerville et al., 2003). Strains harbouring *seb* also showed large variation in *se* induction with factors reaching 10–100-fold. Less variations were observed for *seh* harbouring strains with average 10–40-fold induction in post-exponentially growing cells. (iv) Similar growth-phase dependent changes in expression, although in a lesser extend, also characterized the behaviour of *sed*, *ser* and *sel* (Fig. 4A). The mRNA levels were shown to increase moderately (<10-fold) but significantly at the end of the exponential growth phase.

4. Discussion

Real-time RT-PCR analysis is a powerful technique to quantify mRNA levels but it requires the use of appropriate internal standards for normalization (Vandesompele et al., 2002). Finding validated reference genes that may be applied to assess relative gene expression changes during a complete *in vitro* growth cycle was not simple. The expression of many of the housekeeping genes evaluated were found to vary and particularly in the late stationary phase (24 h-old culture). The shutting down of most housekeeping and facultative genes occurring in this growth phase likely explains the large variations in Ct values observed. Considering samples harvested from exponential to early stationary phases, 4 out of 9 reference genes had a geNorm expression stability measure below 1.0, which has been regarded as suitable for normalization in several studies (Vandecasteele et al., 2001; Tasara and Stephan, 2007). Considering all samples, including the late stationary phase,

only two genes could be found below this *M* value. As recommended (Vandecasteele et al., 2001; Vandesompele et al., 2002), the three genes with the most stable transcriptional expression levels from exponential to early stationary phases were chosen as controls to normalize the *se* data analysis.

Although important strain-to-strain variations in the absolute levels of *se* transcripts have been observed in the panel of naturally occurring toxinogenic isolates examined (data not shown), the pattern of expression of each *se* gene was found to be conserved. Comparative analyses revealed four kinds of profile according to the *se* type examined. Concerning the classical SE types, we distinguish three groups, i.e. *sea* and *see* (unmodified expression), *seb* and *sec* (high post-exponential increase) and *sed* (low post-exponential induction). Our data on relative mRNA abundance confirm published results showing: (i) maximal enterotoxin B, C and D production during the transition from the exponential to the stationary phases of growth (Czop and Bergdoll, 1974; Bergdoll, 1979; Otero et al., 1990), while SEA is produced throughout the exponential phase of growth (Czop and Bergdoll, 1974; Borst and Betley, 1994); (ii) toxin yield much lower for strains producing SEA, SED or SEE compared with strains producing SEB or SEC (Bergdoll, 1979); and (iii) regulation by the Agr system of SEB, SEC and SED production (Gaskill and Khan, 1988; Bayles and Iandolo, 1989; Regassa et al., 1991) but not of SEA (Tremaine et al., 1993; Zhang et al., 1998).

Concerning the other *se* genes, the kinetic study clearly indicates that most of the newly described *se* genes are likely not controlled by the *agr* system. We report that *sej*, *sep*, *seq* and *sek* mRNAs amounts remained unchanged whatever the growth phase examined. As *sea* and *see*, most of these genes are phage-encoded factors and might be expected to be mainly regulated by processes that govern lysogeny,

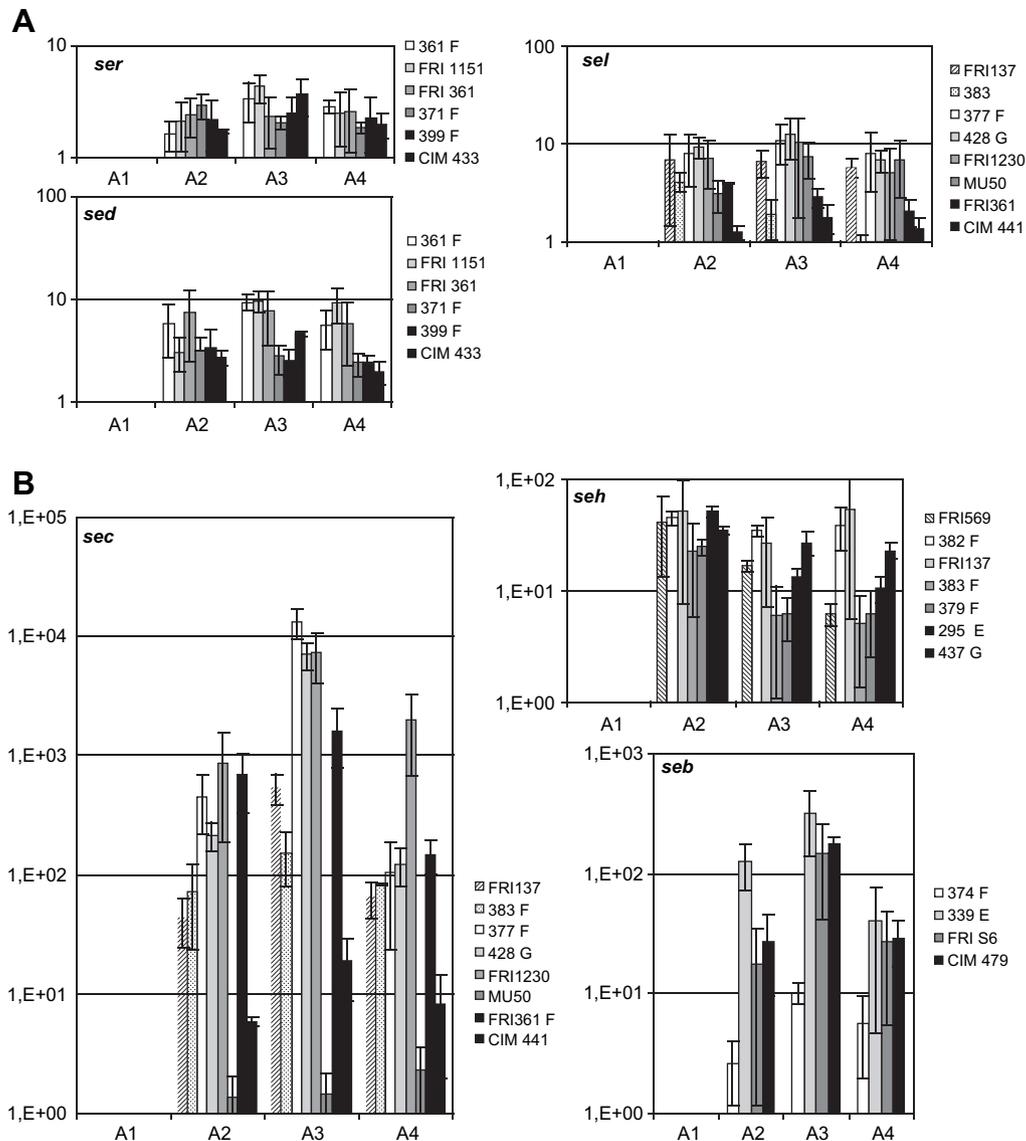


Fig. 4. Mean relative expression ratios for *sed*, *ser*, *sel* (A) or *sec*, *seb* and *seh* (B). Gene expression levels were quantified using RT-qPCR. Normalization was provided using the geometric mean of 3 reference genes (*ftsZ*, *rpoB* and *sodA*). The results are based on cultures of 28 strains collected at 4 time points of growth (A1: mid-exponential; A2: late exponential; A3: early stationary; and A4: late stationary growth phases) with 2 replicates (i.e. 2 independent cultures that were each sampled 4 times). Samples collected from the mid-exponential growth phase (A1) were used as calibrator for all subsequent samples. Error bars indicate standard deviations.

as it was demonstrated for *sea* (Borst and Betley, 1994; Sumbly and Waldor, 2003). *sej*, which is encoded along with *sed* and *ser* on plasmids, did not share the same behaviour as its associated genes which expression was found to be growth phase dependant. It is worth noting that *sej* is oriented in opposite direction as *ser* and *sed* (Zhang et al., 1998; Omoe et al., 2003) and, consistent with our result, has been reported to be not regulated by the *agr* system unlike *sed* (Tremaine et al., 1993; Zhang et al., 1998). Our data also reveal that a second class of genes, carried by the *egc* locus, was not induced upon stationary growth-phase. On the contrary, the transcripts abundance of *seo*, *sem*, *sei*, *sen*, *seg* and *seu* tended to decrease after the exponential growth-phase and was found to be generally lower than those of other *se* genes (data not shown). Those observations can be linked with recent data reporting that none of the enterotoxins encoded by the *egc* operon was identified by two-dimensional gel electrophoresis (Pocsfalvi et al., 2008).

Among the new *se* type, activation of expression during the post-exponential phase of growth was observed only for *seh*, *ser*

and *sel* which were classified into two distinct groups according to their high (*seh*) or low (*ser* and *sel*) relative induction factor. The induction was observed in late-exponential growth phase when population reached 4×10^8 to 2×10^9 CFU/ml and was sustained throughout the stationary phase, suggesting that *seh*, *sel* and *ser* might be regulated by the *agr* signal transduction pathway. It has been previously measured that the minimum cell density predicted to promote specific *agr* expression was equivalent to 1.2×10^8 CFU/ml (Wright and Holland, 2003). Compared to the classical *agr*-controlled *seb* and *sec* genes, the timing of *seh* activation took place earlier during the growth cycle. This observation is in agreement with recent data at the protein level showing that SEH was mainly produced during the late-exponential phase of growth, unlike SEB produced mostly during the stationary phase (Sakai et al., 2008). The significance of such difference in term of regulation underlying it is unknown. The two other growth-phase induced genes, *ser* and *sel*, displayed a comparable pattern of expression as *sed*. Whether the observed post-exponential growth phase activation of *seh*, *ser*

and *sel* are regulated by the *agr* system via RNAIII-Rot interaction or by other regulatory components remains to be investigated. However, results concerning strain Mu50 highlight a possible *agr*-independent regulation of *sel*. In Mu50, unlike to the other *sel*-*sec*-positive strains, no clear up-regulation of the *sec* expression was observed over time, while a post-exponential-phase increase in *sel* transcription was observed. The lack of enhanced post-exponential induction of *sec* expression in this strain can be explained by a defect in the *agr* system. Indeed, and for a yet undefined reason, no detectable levels of RNAIII, the effector of the Agr system, has been reported in Mu50 (Somerville et al., 2003). Moreover, differences in levels of RNAIII were suggested to be responsible for the production of different amounts of *seb* mRNA and SEB toxins by SEB-producing strains (Compagnone-Post et al., 1991). The *sel* growth-phase dependent changes in expression being not affected in Mu50, a post-exponential-phase signal independent of *agr* function is expected to be required for activation of *sel* transcription. A temporal signal generated at the end of exponential phase by factors such as changes in pH, nutrient concentrations, O₂ tension or accumulation of metabolic products could be transmitted by a signal transduction pathway unrelated to *agr* to control some *se* genes. Such signal was demonstrated to be required for the biosynthesis of certain secreted toxins such as the α -hemolysin (Vandenesch et al., 1991). The alternative sigma factor σ^B or the regulator SarA might be interesting candidates as both regulation pathways have already been shown to modulate *seb* and *rot* expression during the post-exponential phase of growth (Chan and Foster, 1998; Schmidt et al., 2004; Hsieh et al., 2008).

In this report, we demonstrate that all *se* containing strains are potentially able to produce SE/SEI proteins as all *se* genes are transcribed. It remains however to be determined whether *se* mRNA detection by RT-qPCR goes together with production of a particular SE/SEI protein and on and after which *se* mRNA amount the corresponding SE/SEIs toxins is detectable. In this respect, a comparison between the *se* transcripts levels estimated in the present study and published data on SE/SEIs production levels can be informative. It has been reported that (i) most *S. aureus* strains harboring *seh*, *ser* or *sep* produced significant amount of the corresponding toxins in stationary phase (i.e. 38.2–324.8 ng/ml for SER (Omoe et al., 2004), about 50–100 ng/ml for SEIP (Omoe et al., 2005) and 254–692 ng/ml for SEH (Omoe et al., 2002)); (ii) most of the isolates harbouring *seg* and *sei* did not produce a detectable level of SEG or SEI (Omoe et al., 2002); (iii) the level of SEH (0.51 μ g/ml) produced by *sea*⁺*seh*⁺ isolates was almost the same as that of SEA (0.41 μ g/ml), while *seb*⁺*seh*⁺ isolates produced higher amounts of SEB (10.5 μ g/ml) than of SEH (0.91 μ g/ml) (Sakai et al., 2008); (iv) SEIK, SEIQ and SEIL were detected by 2D-gel electrophoresis in a much more lower amount than the highly expressed SEC or SEB (Pocsfalvi et al., 2008). Examination of the raw Ct values measured in this work indicates that the transcript abundance of *sea*, *sep*, *sek*, *seq* and *sel* is of the same order (Ct values ranging from 19 to 23) in most of the strains at early stationary growth phase. This concentration is slightly lower than that of *seh*, *sed* and *ser* mRNAs (Ct from 17 to 21), several orders lower than that of *seb* or *sec* transcripts (Ct from 12 to 19), but much more higher than that of the *egc* cluster (Ct from 22 to 30). Interestingly, the two reference strains for which quantification data at both mRNA and protein levels are available, shown concordant results. Indeed, FRI569 was found to be the strain producing the higher quantity of *seh* mRNA and SEH as compared to other strains (this work; Su et al., 1996), while Fri361 was shown to be a poor *ser* mRNA and SER protein producer (Omoe et al., 2004, this work). If the amount of SE/SEI that a strain is able to produce is correlated with its *se* mRNA content, as shown previously for the SEA or SEB-producing strains (Gaskill and Khan, 1988; Borst and Betley, 1994), the rapid assessment by RT-qPCR of the *se* transcripts levels

produced by a strain might provide valuable information on the poisoning risk linked to this strain.

Acknowledgements

The authors acknowledge Marie-Laure de Buysier from AFSSA for generously providing some *S. aureus* strains. We thank J.A. Hennekinne for his help in selecting representative enterotoxigenic *S. aureus* strains used in this study.

This work was carried out with the financial support of the «ANR- Agence Nationale de la Recherche – the French National Research Agency» under the «Programme National de Recherche en Alimentation et Nutrition humaine», project «ANR-06-PNRA-029, SEFRO».

References

- Balaban, N., Rasooly, A., 2000. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 1–10.
- Bania, J., Dabrowska, A., Bystron, J., Korzekwa, K., Chrzanoska, J., Molenda, J., 2006. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 36–41.
- Bayles, K.W., landolo, J.J., 1989. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J. Bacteriol.* 171, 4799–4806.
- Bergdoll, M.S., 1979. Staphylococcal intoxications. In: Riemann, H., Bryan, F.L. (Eds.), *Foodborne Infections and Intoxications*. Academic Press, New York, pp. 443–493.
- Betley, M.J., Mekalanos, J.J., 1985. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science* 229, 185–187.
- Borst, D.W., Betley, M.J., 1994. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression correlate with *sea* allele class. *Infect. Immun.* 62, 113–118.
- Chan, P.F., Foster, S.J., 1998. Role of SarA in virulence determinant production and environmental signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 180, 6232–6241.
- Chiang, Y.C., Chang, L.T., Lin, C.W., Yang, C.Y., Tsen, H.Y., 2006. PCR primers for the detection of staphylococcal enterotoxins K, L, and M and survey of staphylococcal enterotoxin types in *Staphylococcus aureus* isolates from food poisoning cases in Taiwan. *J. Food Protect.* 69, 1072–1079.
- Chiang, Y.C., Liao, W.W., Fan, C.M., Pai, W.Y., Chiou, C.S., Tsen, H.Y., 2008. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 66–73.
- Compagnone-Post, P., Malyankar, U., Khan, S.A., 1991. Role of host factors in the regulation of the enterotoxin B gene. *J. Bacteriol.* 173, 1827–1830.
- Czop, J.K., Bergdoll, M.S., 1974. Staphylococcal enterotoxin synthesis during the exponential, transitional, and stationary growth phases. *Infect. Immun.* 9, 229–235.
- Fitzgerald, J.R., Monday, S., Foster, T.J., Bohach, G.A., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Smyth, C.J., 2001. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J. Bacteriol.* 183, 63–70.
- Gaskill, M.E., Khan, S.A., 1988. Regulation of the enterotoxin B gene in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 263, 6276–6280.
- Geisinger, E., Adhikari, R.P., Jin, R., Ross, H.F., Novick, R.P., 2006. Inhibition of *rot* translation by RNAIII, a key feature of *agr* function. *Mol. Microbiol.* 61, 1038–1048.
- Genigeorgis, C.A., 1989. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *Int. J. Food Microbiol.* 9, 327–360.
- Hsieh, H.Y., Tseng, C.W., Stewart, G.C., 2008. Regulation of Rot expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 190, 546–554.
- Hwang, S.Y., Kim, S.H., Jang, E.J., Kwon, N.H., Park, Y.K., Koo, H.C., Jung, W.K., Kim, J.M., Park, Y.H., 2007. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 99–105.
- Kérouanton, A., Hennekinne, J.A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A., De Buysier, M.L., 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 369–375.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H., Hiramatsu, K., 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357, 1225–1240.
- Lina, G., Bohach, G.A., Nair, S.P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, R., Mariuzza, R., 2004. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J. Infect. Dis.* 189, 2334–2336.
- Munson, S.H., Tremaine, M.T., Betley, M.J., Welch, R.A., 1998. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 66, 3337–3348.
- Murray, R.J., 2005. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Intern. Med. J.* 35 (Suppl. 2), S106–S119.

- Novick, R.P., 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* 48, 1429–1449.
- Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D.L., Ueda, S., Shinagawa, K., 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harbouring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.* 40, 857–862.
- Omoe, K., Hu, D.L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A., Shinagawa, K., 2003. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect. Immun.* 71, 6088–6094.
- Omoe, K., Imanishi, K., Hu, D.L., Kato, H., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A., Uchiyama, T., Shinagawa, K., 2004. Biological properties of staphylococcal enterotoxin-like toxin type R. *Infect. Immun.* 72, 3664–3667.
- Omoe, K., Imanishi, K., Hu, D.L., Kato, H., Fugane, Y., Abe, Y., Hamaoka, S., Watanabe, Y., Nakane, A., Uchiyama, T., Shinagawa, K., 2005. Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. *Infect. Immun.* 73, 5540–5546.
- Ono, H.K., Omoe, K., Imanishi, K., Iwakabe, Y., Hu, D.L., Kato, H., Saito, N., Nakane, A., Uchiyama, T., Shinagawa, K., 2008. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins types S and T. *Infect. Immun.* 76, 4999–5005.
- Orwin, P.M., Leung, D.Y., Donahue, H.L., Novick, R.P., Schlievert, P.M., 2001. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect. Immun.* 69, 360–366.
- Orwin, P.M., Leung, D.Y., Tripp, T.J., Bohach, G.A., Earhart, C.A., Ohlendorf, D.H., Schlievert, P.M., 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., García, M.L., García, M.C., Moreno, B., Bergdoll, M.S., 1990. Production of staphylococcal enterotoxins C1 and C2 and thermonuclease throughout the growth cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 555–559.
- Pocsfalvi, G., Cacace, G., Cucurullo, M., Serluca, G., Sorrentino, A., Schlosser, G., Blaiotta, G., Malorni, A., 2008. Proteomic analysis of exoproteins expressed by enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Proteomics* 8, 2462–2476.
- Poli, A., Guglielmini, E., Sembeni, S., Spiazzi, M., Dellaglio, F., Rossi, F., Torriani, S., 2007. Detection of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin genotype diversity in Monte Veronese, a protected designation of origin Italian cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 529–534.
- Regassa, L.B., Couch, J.L., Betley, M.J., 1991. Steady-state staphylococcal enterotoxin type C mRNA is affected by a product of the accessory gene regulator (*agr*) and by glucose. *Infect. Immun.* 59, 955–962.
- Sakai, F., Ihara, H., Aoyama, K., Igarashi, H., Yanahira, S., Ohkubo, T., Asao, T., Kozaki, S., 2008. Characteristics of enterotoxin H-producing *Staphylococcus aureus* isolated from clinical cases and properties of the enterotoxin productivity. *J. Food Prot.* 71, 1855–1860.
- Schmidt, K.A., Donegan, N.P., Kwan, W.A.J., Cheung, A., 2004. Influences of σ^B and *agr* on expression of staphylococcal enterotoxin B (*seb*) in *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Microbiol.* 5, 351–360.
- Somerville, G.A., Saïd-Salim, B., Wickman, J.M., Raffel, S.J., Kreiswirth, B.N., Musser, J.M., 2003. Correlation of acetate catabolism and growth yield in *Staphylococcus aureus*: implications for host–pathogen interactions. *Infect. Immun.* 71, 4724–4732.
- Su, Y.-C., Wong, A.C.L., 1995. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin. *H. Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1438–1443.
- Su, Y.-C., Wong, A.C.L., Amy, C., 1996. Detection of staphylococcal enterotoxin H by an enzyme-linked immunosorbent Assay. *J. Food Prot.* 59, 327–330.
- Su, Y.-C., Wong, L.A.C., 1997. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. *J. Food Protect* 60, 195–202.
- Sumbly, P., Waldor, M.K., 2003. Transcription of the toxin genes present within the Staphylococcal phage phiSa3ms is intimately linked with the phage's life cycle. *J. Bacteriol.* 185, 6841–6851.
- Tasara, T., Stephan, R., 2007. Evaluation of housekeeping genes in *Listeria monocytogenes* as potential internal control references for normalizing mRNA expression levels in stress adaptation models using real-time PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 269, 265–272.
- Thomas, D.Y., Jarraud, S., Lemerrier, B., Cozon, G., Echasserieu, K., Etienne, J., Gougeon, M.L., Lina, G., Vandenesch, F., 2006. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infect. Immun.* 74, 4724–4734.
- Tremaine, M.T., Brockman, D.K., Betley, M.J., 1993. Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). *Infect. Immun.* 61, 356–359.
- Tseng, C.W., Stewart, G.C., 2005. Rot repression of enterotoxin B expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187, 5301–5309.
- Tseng, C.W., Zhang, S., Stewart, G.C., 2004. Accessory gene regulator control of staphylococcal enterotoxin D gene expression. *J. Bacteriol.* 186, 1793–1801.
- Vandecasteele, S.J., Peetermans, W.E., Merckx, R., Van Eldere, J., 2001. Quantification of expression of *Staphylococcus epidermidis* housekeeping genes with Taqman quantitative PCR during in vitro growth and under different conditions. *J. Bacteriol.* 183, 7094–7101.
- Vandenesch, F., Kornblum, J., Novick, R.P., 1991. A temporal signal, independent of *agr*, is required for *hla* but not *spa* transcription in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 173, 6313–6320.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3 RESEARCH0034.
- Wright, J.D., Holland, K.T., 2003. The effect of cell density and specific growth rate on accessory gene regulator and toxic shock syndrome toxin-1 gene expression in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 218, 377–383.
- Yarwood, J.M., McCormick, J.K., Paustian, M.L., Orwin, P.M., Kapur, V., Schlievert, P.M., 2002. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J. Biol. Chem.* 277, 13138–13147.
- Zhang, S., landolo, J.J., Stewart, G.C., 1998. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). *FEMS Microbiol. Lett.* 168, 227–233.

Abstract

In France *Staphylococcus aureus* is reported to be the most frequent pathogen involved in food-borne diseases associated with milk and dairy products. Food poisoning results from ingestion of staphylococcal enterotoxins (SE) preformed in food by enterotoxigenic strains of *S. aureus*. In order to identify key technological parameters affecting *S. aureus* growth, enterotoxin gene expression and enterotoxin production during uncooked semi-hard cheese manufacturing, the impact of varying certain process parameters was studied with various experimental designs.

To study enterotoxin gene expression during cheese manufacture, we first developed an efficient procedure to recover total RNA from cheese and applied a robust strategy to study gene expression by quantitative RT-PCR.

Based on a survey of practices performed amongst uncooked semi-hard cheese manufacturers, we studied the impact of five technological parameters of the cheese-making process on the behavior of five enterotoxigenic strains producing enterotoxin A, B, C or D and independently inoculated at 10^3 cfu/ml in milk, during the first 72 h of the manufacturing. Whatever the parameters and the strains tested, the *S. aureus* population was found to exceed 10^5 cfu/g of cheese four hours after molding. In the 54 different cheese productions, SEA and SED were the only enterotoxins detected, and in very low (non measurable for SEA) and variable quantities depending on the parameters studied. Enterotoxin production seems to be correlated with an early gene expression during cheese processing (less than 6 hours after milk renneting).

The first experimental design carried out highlighted that among the five parameters studied, temperature and duration of milk maturation had the biggest impact on the SE production. Using response surface methodology, we established mathematical models to describe the relationship between staphylococcal enterotoxin gene expression and production and both milk maturation parameters.

Milk maturation temperature was demonstrated to be the key technological parameter that must be fixed to limit the risk of staphylococcal food poisoning.

Key words : *Staphylococcus aureus*, enterotoxin, cheese, gene expression, modeling

Résumé

En France, *Staphylococcus aureus* est le micro-organisme pathogène le plus souvent incriminé dans des cas de toxi-infections alimentaires collectives par le lait et les produits laitiers. L'intoxication alimentaire résulte de l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques (SE) produites dans les aliments par des souches de *S. aureus* productrices de SE. Dans le but d'identifier les principaux paramètres technologiques qui affectent la croissance de *S. aureus*, l'expression des gènes et la production d'entérotoxines pendant la fabrication de fromage à pâte pressée non cuite, l'impact de différents paramètres du procédé a été étudié à l'aide de plans d'expériences.

Pour étudier l'expression des gènes des entérotoxines au cours de la fabrication de fromage, nous avons tout d'abord développé une méthode efficace pour récupérer l'ARN total à partir de fromage et nous avons appliqué une stratégie robuste pour étudier l'expression de gènes par RT-PCR quantitative.

En se basant sur les résultats d'une enquête sur les pratiques des fabricants de fromages à pâte pressée non cuite, nous avons ensuite étudié l'impact de cinq paramètres technologiques du procédé de fabrication sur le comportement de cinq souches productrices des entérotoxines A, B, C ou D, indépendamment inoculées à 10^3 ufc/ml dans le lait, au cours des 72 premières heures de la fabrication. Quels que soient les paramètres testés ou les souches étudiées, la population de *S. aureus* atteint au moins 10^5 ufc/g de fromage quatre heures après le moulage. Au cours des 54 fabrications fromagères, SEA et SED sont les seules entérotoxines détectées, en quantité très faible (non quantifiable pour SEA) et variable en fonction des paramètres étudiés. La production d'entérotoxine semble corrélée à une expression précoce du gène au cours de la fabrication (moins de 6 heures après l'emprésurage du lait).

Le premier plan d'expériences mis en œuvre a révélé que, parmi les cinq paramètres étudiés, la température et la durée de maturation du lait avaient le plus fort impact sur la production de SE. Par la méthodologie des surfaces de réponses, nous avons ensuite établis des modèles mathématiques pour décrire la relation entre l'expression des gènes et la production d'entérotoxines et les deux paramètres de maturation du lait.

La température de maturation du lait apparaît comme le paramètre clé qui doit être contrôlé pour limiter le risque d'intoxication alimentaire par *S. aureus* dans les fromages à pâte pressée non cuite.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, entérotoxine, expression de genes, fromage, modélisation