

***Bacillus cytotoxicus* dans les matrices alimentaires**

Présenté par Maëlle de Halleux

Promoteur : Prof. Jacques Mahillon (UCL/ELI/MIAE)

Lecteurs : Prof. Claude Bragard (UCL/ELI/ELIM)
Dr. Laurence Delbrassinne (Sciensano)

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention
du diplôme de **Bioingénieur : sciences agronomiques**

Remerciements

La réalisation de ce mémoire, marquant la dernière étape de mon master, n'aurait pas été possible sans les nombreuses personnes qui m'ont aidée, soutenue et encouragée. En préambule de ce travail, je tiens ainsi à remercier tous ceux qui d'une façon ou d'une autre, ont contribué à son élaboration.

Tout d'abord, je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance à mon promoteur, Jacques Mahillon pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire ainsi que pour ses conseils avisés et sa disponibilité.

Ce travail doit beaucoup à l'intérêt témoigné par Marcel, Florent et Carole, qui m'ont encadrée pendant ces 10 derniers mois. Tous trois m'ont grandement aidée et ont éveillé chez moi une curiosité pour la microbiologie. Florent et Marcel m'ont fait découvrir l'univers du travail dans le laboratoire de microbiologie alimentaire et environnementale (MIAE) et son fonctionnement. De plus, Marcel m'a initiée au sujet et j'ai eu l'opportunité de le suivre dans son travail, ce qui fut une source d'inspiration. Ensuite, Carole et sa bonne humeur m'ont vraiment permis de mener ce mémoire à terme, tant sur le plan expérimental que rédactionnel, et ce grâce à ses précieuses recommandations et ses explications détaillées et rigoureuses. Je m'estime plus que chanceuse d'avoir eu l'occasion d'apprendre, ne serait-ce qu'un peu, de leurs connaissances. Merci pour tout ça.

Mes pensées se tournent aussi vers tous les membres du laboratoire MIAE, leur dynamisme, leurs encouragements constants et leurs conseils et remarques pendant et hors les traditionnels group meeting. Bien entendu, je pense également aux autres mémorants, et en particulier Marie, Sébastien, Anthony et Mathilde, avec qui j'ai pu partager de très bons moments.

Je tiens aussi à remercier Claude Bragard et Laurence Delbrassinne d'avoir accepté d'être lecteurs et membres du jury de ce mémoire.

Enfin, entreprendre cinq années d'études universitaires représente une aventure humaine et intellectuelle et son aboutissement doit beaucoup au soutien compréhensif de mes parents, de mes sœurs et de mes amis à qui j'adresse de sincères remerciements.

Maëlle

Liste des abréviations

°C	degré Celsius
µl	microlitre(s)
µm	micromètre(s)
µM	micromolaire(s)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomal
AFSCA	Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire
AP	Antigène protecteur
ARN	Acide ribonucléique
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BET	Bromure d'éthidium
CFSAN	Center for food safety and applied nutrition
CFU	Colony forming unit
Comm. pers.	Communication personnelle
Cry	Crystal
CspA	Cold-shock protein A
Cyt	Cytolytic
CytK	Cytotoxine K
DPA	Acide dipicolinique
ECDC	European centre for disease prevention and control
EDTA	Éthylène diamine tétra-acétique
EFSA	European food safety authority
EPT	Eau peptonée tamponnée
FE	Facteur œdématogène
FL	Facteur létal
g	gramme(s)
h	heure(s)
Hbl	Hémolysine BL
ISO	International organization for standardization
kDa	kilo Dalton
kb	kilo paire de base
l	litre(s)
LB	Lysogeny broth
LNR	Laboratoire national de référence
MIAE	Microbiologie alimentaire et environnementale
mg	milligramme(s)
min	minute(s)
ml	millilitre(s)

mm	millimètre(s)
mM	millimolaire(s)
MLST	Typage par séquençage multilocus
MYP	Mannitol – Egg yolk – Polymyxin
Nhe	Non-hemolytic enterotoxin
NRPS	Synthétase peptidique non ribosomale
OMS	Organisation mondiale de la santé
PA	Phage assay
pb	paire de base
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Électrophorèse sur gel à champ pulsé
RAPD	Random amplification of polymorphic DNA
S.	<i>Salmonella</i>
s.l.	<i>sensu lato</i>
s.s.	<i>sensu stricto</i>
SASP	Small acid soluble proteins
sec	seconde(s)
sv.	serovar
TAE	Tris – acetate - EDTA
TIA	Toxi-infection alimentaire
TIAC	Toxi-infection alimentaire collective
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
UI	Unité internationale
US FDA	Food and drug administration of the United States
UV	Ultra-violet
V	Volts
var.	variété
Vips	Vegetative insecticidal proteins
WHO	World health organization
YOPI	Young, old, pregnant, immunocompromised

Table des matières

I	Introduction	1
1	Étiologie des maladies d'origine alimentaire	1
2	Le groupe <i>Bacillus cereus</i>	5
2.1	<i>Bacillus cereus sensu lato</i>	5
2.1.1	<i>B. cereus</i> s.s.	9
2.1.2	<i>B. anthracis</i>	10
2.1.3	<i>B. cytotoxicus</i>	12
2.1.4	<i>B. thuringiensis</i>	12
2.1.5	<i>B. weihenstephanensis</i>	13
2.1.6	<i>B. mycoides</i> et <i>B. pseudomycoides</i>	14
2.2	Méthodes d'isolement, de dénombrement et de détection	14
3	Importance des spores de <i>B. cereus</i>	16
3.1	Formation des spores et structure	16
3.2	Résistances	18
3.3	Germination	18
3.4	Adhésion	19
4	Toxines de <i>B. cereus</i> responsables des maladies d'origine alimentaire	20
4.1	Intoxication émétique	21
4.2	Toxico-infection diarrhéique	22
II	Objectifs	25
III	Matériel et méthodes	26
1	Milieux de cultures et tampons	26
1.1	Milieu LB agar	26
1.2	Milieu MYP	26
1.3	Gélose au sang frais de mouton	27
1.4	Eau peptonée tamponnée	28
1.5	Solution de Ringer diluée au ¼	28
1.6	« Phage assay medium »	29
1.7	Tampon TAE 50x	29
2	Échantillons	29
3	Détection de souches de <i>B. cytotoxicus</i>	32
3.1	Pré-enrichissement	32
3.2	Ensemencement	33
3.3	Isolement	33
3.4	Identification sur base de critères phénotypiques	33
3.5	Identification sur base de critères génétiques	34
3.5.1	Détection de gènes par le biais de PCR	34
3.5.2	Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)	37
4	Suivi du développement de <i>B. cytotoxicus</i> dans des aliments cuisinés	38
4.1	Évaluation de la charge initiale en <i>B. cytotoxicus</i> dans les produits	39
4.2	Suivi d'aliments préparés en imitant des conditions domestiques	39
4.3	Suivi d'aliments stérilisés et inoculés avec des spores	41

4.3.1	Préparations et énumérations de la charge des suspensions de spores.....	41
4.3.2	Préparation des aliments stérilisés et inoculés avec des spores	43
4.3.3	Séquençage partiel d'ADN ribosomal 16S	44
IV	Résultats et discussion	45
1	Isolement et identification de souches de <i>B. cytotoxicus</i>	45
1.1	Origine des souches de <i>B. cytotoxicus</i> isolées	45
1.2	Phénotypes des colonies isolées mises en culture sur milieux LB et MYP	48
1.3	Activité hémolytique	50
1.4	Détection des gènes de virulence	51
1.5	Comparaison des souches à l'aide des profils RAPD.....	51
2	Suivi du développement de <i>B. cytotoxicus</i> dans les aliments cuisinés.....	55
2.1	Suivi des aliments préparés en imitant des conditions domestiques.....	56
2.2	Suivi des aliments stérilisés et inoculés avec des spores	59
V	Conclusion et perspectives.....	64
	Bibliographie	67
	Annexes.....	79

I INTRODUCTION

1 Étiologie des maladies d'origine alimentaire

Il est loin le temps où la nourriture était uniquement considérée comme une source de nutriments indispensables au bon fonctionnement physiologique de l'être humain. Au cours de l'évolution, en passant par l'établissement de civilisations, l'apparition de l'agriculture, et le développement des technologies modernes, le côté multidimensionnel de l'alimentation n'a cessé de se renforcer. Aujourd'hui, se nourrir est évidemment toujours nécessaire pour assurer des besoins biologiques vitaux mais cette action est bien plus que cela, elle remplit également des fonctions culturelles et sociales (Briones Alonso *et al.*, 2017; Rozin, 2005). Dans les régions du monde où la sécurité alimentaire est assurée, le célèbre adage « Il faut manger pour vivre et non vivre pour manger » ne semble pas tellement appliqué et la notion de plaisir occupe une place prépondérante dans le rapport à l'alimentation qu'ont les individus (Couvreux, 2000). Cependant, il arrive que ce plaisir soit gâché par l'apparition d'une maladie d'origine alimentaire qui se déclare après ingestion de ladite nourriture.

L'OMS estime qu'une personne sur dix tombe malade à cause d'une maladie d'origine alimentaire (OMS, 2015). Plus de 200 maladies transmises par les aliments et aux symptômes variés étaient déjà répertoriées en 1982 (Bryan, 1982). Les manifestations cliniques sont diverses et les plus communes sont caractérisées par celles d'une gastro-entérite allant de légère à aigüe, c'est-à-dire des nausées, vomissements, crampes abdominales, diarrhées, et parfois de la fièvre et des maux de tête (Mead *et al.*, 1999). Mais il existe aussi des cas plus graves comportant des complications telles que des fausses couches, des malformations congénitales, des insuffisances rénales et hépatiques ainsi que des troubles neurologiques (Altekruse *et al.*, 1997). Ces complications peuvent également mener à la mort de la personne ayant développé la maladie (Painter *et al.*, 2013).

Les toxi-infections alimentaires (TIA) à l'origine de ces pathologies sont causées par la consommation de boissons ou d'aliments contaminés soit par des micro-organismes pathogènes incluant les virus, les bactéries, les parasites et les moisissures, soit par des substances chimiques ou des métaux lourds (Tewari and Abdullah, 2015). La production, la récolte, le traitement, le transport, la préparation,

l'emballage, le stockage et le service sont autant d'étapes de la chaîne alimentaire où peut survenir la contamination de la nourriture par l'agent causal (WHO, 2017).

Dans le langage courant, les TIA sont souvent appelées intoxications alimentaires. En réalité, il s'agit d'un abus de langage parce que deux types de TIA sont distingués, les infections et les intoxications (LNR TIA, 2017). Les intoxications découlent de la prise de denrées alimentaires contenant des composés chimiques toxiques ou des toxines formées dans ces aliments par des micro-organismes. Les infections résultent quant à elles de la présence de micro-organismes viables dans la nourriture et qui, une fois ingérés, vont envahir la muqueuse intestinale, s'y multiplier et perturber sa physiologie normale (Cliver and Riemann, 2002). Quand il est question de toxi-infection d'origine bactérienne, une catégorie hybride entre l'infection et l'intoxication peut être mentionnée, il s'agit de l'infection médiée par une toxine, aussi appelée toxico-infection (Vaclavik and Christian, 2014). Cela se produit lorsqu'une bactérie infectieuse est également responsable de la production d'entérotoxine(s) une fois installée dans le tractus gastro-intestinal (Todd, 2011). Le risque qu'une TIA d'origine microbienne soit contractée et son degré de gravité vont dépendre des trois composantes du triangle épidémiologique que sont l'hôte, le micro-organisme et l'environnement qui, dans ce cas précis, n'est autre que l'aliment (Scholthof, 2007).

Chaque année, de nombreux foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sont rapportés partout dans le monde (WHO, 2015). Une TIAC prend place lorsqu'il y a apparition d'au moins deux cas groupés d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, et dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire (Delmas *et al.*, 2006). En Europe, c'est l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) qui se charge de la récolte des données, obtenues grâce à la surveillance réalisée par tous les pays membres (de Valk and Salvat, 2015). Le but premier du suivi des foyers de TIAC est de remonter jusqu'à la source du problème et d'éviter que celui-ci ne se reproduise en mettant en place des mesures préventives et des contrôles ou en adaptant ce qui existe déjà (Vaillant *et al.*, 2012). En 2014, un total de 5 251 TIAC ont été signalées à travers l'Europe (EFSA and ECDC, 2015). Une diminution de 17% a été enregistrée en 2015 avec 4 362 TIAC signalées, nombre lui-même inférieur à celui de 4 786 qui a été atteint en 2016. Les agents étiologiques et la proportion que chacun occupe dans le total TIAC d'une année sont repris dans la Fig. I.1. Il est utile de noter que dans environ un tiers des cas, l'agent causal demeure inconnu. En 2015 et 2016, la majorité des TIAC dont l'agent étiologique était connu a été associée à des bactéries, bactéries qui, dans plus de 90% des cas, étaient soit *Salmonella*, soit *Campylobacter*. La deuxième place est occupée par les toxines bactériennes, dont un tiers étaient des toxines de *Bacillus cereus* en 2015. Ensuite, la troisième position revient aux virus, suivi par d'autres agents responsables (incluant les agents chimiques, l'histamine, la lectine, les biotoxines marines, les toxines de champignon et la scombrotisme) et enfin par les parasites (EFSA and ECDC, 2016; EFSA and ECDC, 2017).

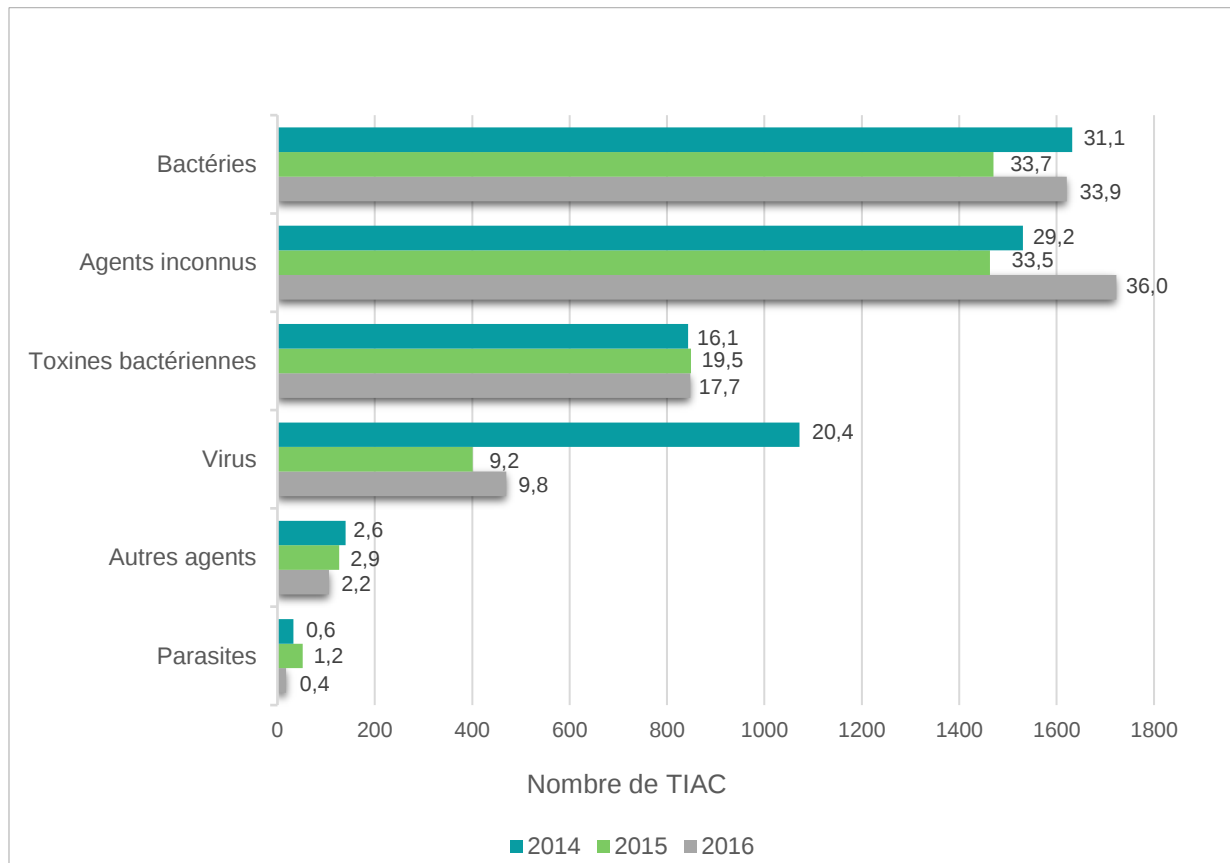


Figure I.1 - Nombre de TIAC signalées par agent causal en Europe en 2014, 2015 et 2016. Le nombre de cas dû à un agent causal par rapport au nombre de cas total de l'année est représenté par un pourcentage se situant à droite de chaque barre (EFSA and ECDC, 2015; EFSA and ECDC, 2016; EFSA and ECDC, 2017).

Si on se focalise sur la Belgique, on constate que le nombre de TIAC enregistrées au laboratoire national de référence varie très peu ces dernières années, avec 311 cas en 2013, 370 en 2014, 351 en 2015 et 377 en 2016. Durant cette période, excepté pour l'année 2016, ce sont les toxines de *B. cereus* qui étaient l'agent le plus souvent rapporté comme étant à l'origine d'un foyer de TIAC en Belgique (LNR TIA, 2014; LNR TIA, 2015; LNR TIA, 2016; LNR TIA, 2017).

Il est important de remarquer que les données relatives aux TIAC en notre possession ne constituent que le sommet de l'iceberg. En effet, les symptômes étant souvent légers et confondus avec ceux d'une « grippe intestinale », la personne concernée ne consulte pas forcément le corps médical (Forsythe, 2010). Et même si elle le fait, il faut encore que le médecin réalise une analyse pour isoler l'agent étiologique et envoie les résultats aux autorités de surveillance (de Valk and Salvat, 2015). Cette sous-déclaration entraîne par voie de conséquence une sous-estimation par rapport aux cas effectivement survenus (Brücker, 2003). Ainsi, même si l'incidence des TIAC au niveau européen a été plutôt stable entre 2010 et 2016 (EFSA and ECDC, 2017), elle demeure importante et vraisemblablement sous-estimée.

Toutes ces informations nous indiquent que les maladies d'origine alimentaire continuent d'être un problème de santé publique mondial et plusieurs raisons explicatives peuvent être mentionnées (WHO, 2008). Tout d'abord, on peut évoquer les nombreux changements apparus dans les pratiques agricoles et dans les chaînes de production alimentaire avec par exemple : l'intensification dans les systèmes d'élevage où certaines pratiques, telles que les conditions de stress vécues par les animaux pendant leur trajet vers l'abattoir et qui affaiblissent leur système immunitaire, semblent responsables d'une augmentation de la contamination des produits liés à cette production (Bhunia, 2007) ; la production à large échelle où de mêmes matières premières mais d'origines différentes sont rassemblées et où la contamination d'une seule suffit à contaminer l'entièreté du lot et ainsi tous les produits qui en découlent (Nyachuba, 2010) ; la globalisation du marché alimentaire qui complexifie les systèmes de transport et de stockage et qui accroît le risque d'une distribution rapide et à grande échelle d'aliments contaminés (Kalyoussef and Feja, 2014). Ensuite, l'évolution des habitudes alimentaires a aussi son rôle à jouer dans la problématique. Par exemple, il y a de réelles demandes de la part des consommateurs pour trouver des produits plus naturels et frais ou alors, à l'inverse, des plats préparés où le délai entre préparation et consommation peut être relativement long, ce qui constitue un réel challenge sanitaire pour les industriels qui les fabriquent (Woteki and Kineman, 2003). Un autre élément important est la tendance croissante qu'ont les individus à manger de la nourriture qui n'est pas cuisinée chez eux. Cela les expose aux risques potentiels d'une mauvaise hygiène dans les établissements de restauration où ils se rendent (WHO, 2008). Pour illustrer cela, il suffit de prendre comme exemple notre pays où entre 2013 et 2016, environ la moitié des foyers de TIAC avait comme lieu d'exposition un restaurant (LNR TIA, 2014; LNR TIA, 2015; LNR TIA, 2016; LNR TIA, 2017). De plus, les changements démographiques et l'augmentation de la population ont eu pour effet d'augmenter le groupe de personnes le plus vulnérable du point de vue de la santé (Newell *et al.*, 2010), appelé communément 'YOPI', c'est-à-dire les enfants (Young), les personnes âgées (Old), les femmes enceintes (Pregnant) et les personnes immunodéprimées (Immunodeficient) (Bhunia, 2007). Enfin, la dernière raison qui peut être avancée est la difficulté de contrôler les agents responsables de la TIA. De nouveaux pathogènes émergent, des pathogènes qui dans le passé n'étaient pas liés à l'alimentation le deviennent et en plus de leur variabilité, certains développent des résistances aux substances antimicrobiennes. On peut notamment citer *S. enterica* sv. Typhimurium DT 104 qui a développé des résistances à plusieurs antibiotiques de prescriptions courantes (OMS, 2002).

Le coût engendré par les TIA est considérable, et ce tant au niveau humain que financier. L'OMS a réalisé une évaluation qui leur attribue 420 000 décès uniquement pour l'année 2010 (WHO, 2015). Si on se penche sur les dépenses, elles sont également considérables. Une étude chiffre le coût total à 468 millions d'euros pour les Pays-Bas en 2011 (Mangen *et al.*, 2015). Il semble dès lors très important de

poursuivre la surveillance des maladies d'origine alimentaire et de continuer à mettre en œuvre des mesures de prévention. Pour ce faire, il est essentiel d'avoir une bonne compréhension des agents associés aux TIA, ce qui passe nécessairement par leur étude.

2 Le groupe *Bacillus cereus*

2.1 *Bacillus cereus sensu lato*

Bacillus cereus sensu lato (*B. cereus s.l.*), aussi couramment appelé le groupe *B. cereus*, appartient au genre *Bacillus*. Il est constitué de bactéries à grandes cellules (largeur $>0,9\mu\text{m}$) ayant une forme de bâtonnet, à coloration Gram-positive, anaérobies facultatives et sporulantes, c'est-à-dire capable de former des endospores. Les spores produites sont ellipsoïdes ou cylindriques et ne dilatent pas les sporanges (Lindbäck and Granum, 2013). Ces caractéristiques participent à faire la distinction entre *B. cereus s.l.* et les autres groupes et espèces du genre *Bacillus*, comme notamment avec le groupe *Bacillus subtilis* (Dromigny, 2009). D'autres particularités importantes pour différencier les espèces du genre *Bacillus* sont l'activité hémolytique, la fermentation de certains hydrates de carbone (*B. cereus* ne fermente pas le mannitol), la motilité et la production de lécithinase (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). La température optimale de croissance des espèces du groupe se situe entre 28°C et 37°C (US FDA/CFSAN, 2006; WHO, 2008) mais elles sont aptes à pousser entre 4°C et 53°C selon l'espèce étudiée. Le groupe *B. cereus* comprend donc des souches psychrotolérantes, d'autres mésophiles et d'autres encore thermotolérantes (Guinebretière *et al.*, 2008).

Sept espèces très proches sont comprises dans le groupe : *B. cereus sensu stricto* (s.s.), *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* et *Bacillus cytotoxicus* (Osimani *et al.*, 2018). Traditionnellement, elles ont été classifiées par leurs caractéristiques phénotypiques, tant sur le plan physiologique que morphologique, (Rasko *et al.*, 2005) comme illustré dans le Tableau I.1.

Tableau I.1 - Principales caractéristiques des espèces du groupe *B. cereus* (Biomérieux, 2016).

Caractéristiques	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. pseudo-mycoides</i>	<i>B. cytotoxicus</i>
T° min de croissance	10°C	10°C	>10°C	4°C	5°C	10°C	20°C
T° max de croissance	45°C	45°C	<50°C	37°C	37°C	40°C	53°C
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-
Production d'indole*	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	+	+	-	+	-	-	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-
Lécithinase du jaune d'œufs	+	+	+	+	+	+F	+F
Amidon**	+	+	+	+	+	+	-
Hémolyse	+	+	-	ND	+	+	ND
Croissance en anaérobiose	+	+	+	+	+	+	+F
Réduction des nitrates*	+	+	+	+	+	+	+
Colonie rhizoïdale	-	-	-	-	+	+	-
Cristal parasporal	-	+	-	-	-	-	-
F : Faiblement positif	ND : Non déterminé		* : Tests API 20E		** : Tests API 50CH		

Néanmoins, les espèces sont étroitement apparentées les unes aux autres au niveau génomique comme démontré par des études sur l'hybridation ADN-ADN, par la comparaison de marqueurs de la diversité chromosomique tels que leurs séquences d'ADN ou d'ARN ribosomal bactérien 16S et 23S et de la région intergénique d'ARN ribosomal 16S-23S. Elles constituent un groupe plus cohérent au niveau de la séquence d'ADN ribosomal 16S lorsqu'on les compare à un autre groupe du genre *Bacillus*, le groupe *B. subtilis* (Fig. 1.2) (Abriouel *et al.*, 2014).

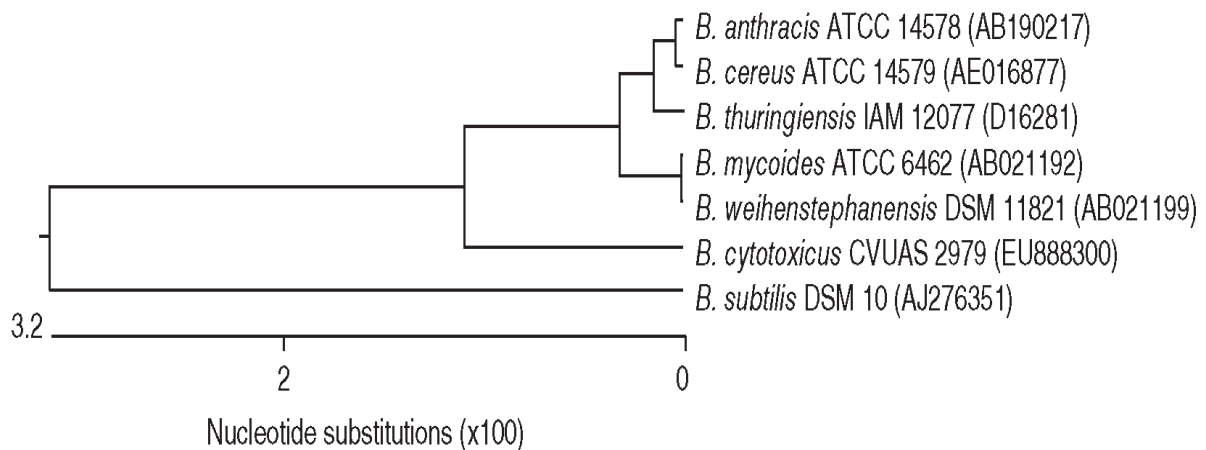


Figure 1.2 - Relations phylogénétiques de *B. cereus* déduites de l'alignement des séquences d'ADN ribosomal 16S de 1500 pb (Abriouel *et al.*, 2014).

La nomenclature de *B. cereus* s.l. est sujette à controverse. Tout d'abord, il y a eu dernièrement de nombreuses propositions quant à l'ajout de nouvelles espèces au sein du groupe. Pour en mentionner quelques-unes, *Bacillus toyonensis* (Jiménez *et al.*, 2013), *Bacillus wiedmannii* (Miller *et al.*, 2016), *Bacillus gaemokensis* (Jung *et al.*, 2010), *Bacillus bingmayongensis* (Liu *et al.*, 2014) et *Bacillus manliponensis* (Jung *et al.*, 2011) ont récemment été décrites. Ensuite, en raison de la proximité génotypique des membres du groupe, divers auteurs considèrent les sept espèces comme étant en réalité une seule et même unité évolutive caractérisée par l'expansion clonale et l'adaptation à divers hôtes et/ou environnements qui ont probablement conduit à la formation de phénotypes distincts, également appelés écotypes, au sein de lignées phylogénétiques majeures (Maughan and Van der Auwera, 2011). À partir des méthodes génétiques conventionnelles, il n'est en effet pas possible de différencier clairement *B. cereus* s.s., *B. anthracis* et *B. thuringiensis*, les trois membres majeurs du groupe (Helgason *et al.*, 2000a). Cette remise en question fait suite à l'utilisation de nouvelles méthodes d'identification moléculaire ayant émergé ces dernières années et qui permettent d'évaluer la diversité génétique et les relations phylogénétiques du groupe *B. cereus* (Maughan and Van der Auwera, 2011). On peut notamment citer les études faites en utilisant des électrophorèses enzymatiques multilocus, des polymorphismes de la longueur des fragments amplifiés, des électrophorèses sur gel à champ pulsé (PFGE), des combinaisons de typage par séquençage multilocus

(MLST) (Oh *et al.*, 2012) ainsi que la comparaison de génomes complets (Liu *et al.*, 2015). Les résultats obtenus lors de ces études mettent généralement en avant la diversité contenue chez *B. cereus s.l.* mais montrent aussi que les membres de chaque espèce peuvent être mélangés. Ils confortent l'idée que les différents taxons devraient être vus comme une seule espèce (Priest *et al.*, 2004).

La discrimination entre les espèces du groupe se réalise également sur base des gènes de virulence portés sur des plasmides, or certains de ces plasmides sont connus pour être des éléments mobiles (Zwick *et al.*, 2012). Si on prend l'exemple de *B. thuriangiensis* qui est caractérisé par la présence de gènes *cry* codant pour des δ -endo-toxines, on remarque que ces gènes sont localisés sur des plasmides (Schnepf *et al.*, 1998). Il en est de même pour la pathogénicité de *B. anthracis* dont les facteurs de virulence se situent sur deux grands plasmides, pXO1 et pXO2 (Ramisse *et al.*, 1996).

En conclusion, outre son côté pratique, la classification de *B. cereus s.l.* basée sur des critères phénotypiques et/ou sur la présence ou l'absence de certains plasmides portant des gènes de virulence est plutôt discutable. En effet, il existe des souches psychrotolérantes qui n'appartiennent pas à *B. weihenstephanensis* (Bartoszewicz *et al.*, 2009). De plus, certains plasmides subissent des transferts horizontaux de gènes et des plasmides connus pour appartenir à *B. anthracis* et étant censés être spécifiques à cette espèce ont été découverts dans d'autres espèces du groupe *B. cereus* (Fiedoruk *et al.*, 2017; Klee *et al.*, 2010). Ces éléments mènent à plonger la compréhension de ce groupe dans une certaine confusion. Afin de remédier à cela, une caractérisation précise de la diversité génomique et l'élaboration d'hypothèses phylogénétiques robustes à propos des relations évolutives entre les membres du groupe paraissent nécessaires (Bazinet, 2017). Ce travail a été amorcé avec le système de classification alternatif proposé par Guinebretière *et al.* (2008). Grâce à un séquençage partiel de *panC*, les différentes espèces de *B. cereus s.l.* peuvent être classées dans un ou plusieurs des sept groupes phylogénétiques présentés (Tableau I.2). Ces groupes se différencient, en outre, par leur température de croissance et leur cytotoxicité (Thorsen *et al.*, 2015).

Le groupe *B. cereus* peut être qualifié d'ubiquitaire dans l'environnement. On a pu isoler des bacilles lui appartenant à partir d'échantillons d'eau douce ou salée, d'air, de sols, de plantes, d'animaux (Pignatelli *et al.*, 2009) et de denrées alimentaires (Gdoura-Ben Amor *et al.*, 2018), échantillons couvrant une large gamme de température, allant par exemple d'aliments réfrigérés à des aliments déshydratés (Guinebretière *et al.*, 2008). En effet, ses différentes souches occupent des niches écologiques très diversifiées, allant de leur cycle de vie saprophytique à un style de vie symbiotique, à dans certains cas, une relation où elles occupent la place de pathogène par rapport à leur hôte (Ceuppens *et al.*, 2013). On retrouve *B. cereus s.l.* sous forme de cellules végétatives ou plus généralement sous forme d'endospores

dans de nombreux sols, qui constituent en fait le réservoir primaire de *B. cereus* s.l. L'omniprésence du groupe dans ces derniers implique qu'un transfert peut s'effectuer vers un hôte en contact avec ce même sol (Vilain *et al.*, 2006). Inévitablement, cela participe aussi au fait que les contaminations alimentaires sont fréquentes et peuvent arriver soit directement sur le lieu de production de la matière première, soit au moment de la transformation à cause de la persistance des spores sur les équipements, car elles ont une forte capacité d'adhérence et peuvent former des biofilms (EFSA, 2005).

Tableau I.2 - Classification phylogénétique du groupe *B. cereus* (Guinebretière *et al.*, 2010).

Groupes phylogénétiques	Espèces	Gamme de températures de croissance (°C)	Toxicité
I-1	<i>B. pseudomycoides</i>	10-43	ND
I-2			
II	<i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i>	7-40	Modérée
III-1	<i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. anthracis</i>	15-45	Élevée
III-2			
III-3			
III-4			
IV-1	<i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i>	10-45	Modérée/élevée
IV-2			
IV-3			
V	<i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i>	8-40	Modérée
VI-1	<i>B. mycoides</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. weihenstephanensis</i>	5-37	Faible
VI-2			
VII	<i>B. cytotoxicus</i>	20-50	Élevée

2.1.1 *B. cereus* s.s.

L'adjectif *cereus* vient du latin *cera*, voulant dire « cire », et qui fait référence à l'aspect cireux ainsi qu'à la couleur qu'ont les colonies lorsqu'elles poussent sur un milieu solide. La souche ATCC 14579 est le premier *B. cereus* s.s. à avoir été isolé en 1887 au Royaume Uni, à partir de l'air d'une étable, et est considérée comme la souche type (d'Ariane, 2013; Frankland and Frankland, 1887). L'espèce comprend des souches tout à fait bénéfiques, c'est notamment le cas de *B. cereus* var. *toyoi* connu

en tant que probiotique pour ses effets positifs sur la santé intestinale de certains animaux (John *et al.*, 2015). Néanmoins, elle contient également des pathogènes opportunistes. En effet, *B. cereus* s.s. constitue l'une des trois espèces du groupe dont certaines souches sont pathogènes pour l'être humain, les deux autres étant *B. anthracis* et *B. cytotoxicus* (Lindbäck and Granum, 2015).

Tout d'abord, cette espèce peut être source de maladies d'origine alimentaire, classées en deux types de syndromes. Il s'agit du syndrome émétique et du syndrome diarrhéique (Schraft and Griffiths, 2006), qui seront expliqués en détails par la suite. En effet, Plazikowski associait déjà des TIA à *B. cereus* s.s. en Europe en 1906 (Jay *et al.*, 2005). Depuis lors, de nombreux autres cas ont été recensés et parmi eux, certains furent mortels (Takabe and Oya, 1976; Mahler *et al.*, 1997; Naranjo *et al.*, 2011; Dierick *et al.*, 2005).

Outre ce lien avec des maladies d'origine alimentaire, *B. cereus* s.s. est également associé à diverses infections, locales et systémiques (Teyssou *et al.*, 1998). Des cas de pneumonies, d'endocardites, de méningites, d'encéphalites, et d'infections oculaires lui sont en effet attribués. Ces types d'infections touchent plus particulièrement les personnes immunodéficientes, les nouveaux nés, les toxicomanes et les patients ayant une plaie traumatique ou post-chirurgicale ou ayant été soignés avec des dispositifs intraveineux (Drobniewski, 1993; Shimoyama *et al.*, 2017; Steen *et al.*, 1992; Berner *et al.*, 1997; Sliman *et al.*, 1987; Marley *et al.*, 1995; Benusic *et al.*, 2015; Beecher *et al.*, 2000; Pitt *et al.*, 2015).

2.1.2 *B. anthracis*

B. anthracis est l'agent étiologique responsable de la maladie du charbon, ou anthrax pour les anglophones (Okinaka and Keim, 2016). Même si les cinquième et sixième plaies d'Egypte rapportées dans la Bible semblent déjà faire mention d'infections similaires à celles provoquées par *B. anthracis*, la découverte de cette espèce dans un échantillon de sang de mouton malade est attribuée à Rayner et Casimir en 1850. Dans les années suivantes, ce fut Robert Koch, aidé de Louis Pasteur, qui étudia de manière approfondie le rôle de cette espèce dans la maladie ainsi que sa transmission à l'homme. Il inventa des méthodes pour purifier ce bacille à partir d'échantillons de sang contaminés et fut le premier à le cultiver de façon à obtenir des cultures pures (Sanchis, 2010; Hugh-Jones and de Vos, 2002). En étant le premier à lier une bactérie spécifique à une maladie précise en 1876, Koch fit avancer la « théorie des germes » et marqua le début de la bactériologie médicale avec son célèbre postulat relatif à l'agent causal d'une maladie (Blevins and Bronze, 2010; Koch, 1962).

Même si les foyers sont rares dans les pays industrialisés comme le Canada, les États-Unis et la majorité de l'Europe, la distribution de la maladie est mondiale et reste endémique dans de nombreux pays d'Asie, d'Afrique et d'Amérique du Sud (Hugh-Jones, 1999). La stabilité des spores dans le sol est assez longue et permet à

B. anthracis d'accéder à ses hôtes directs et majoritaires que sont les herbivores (moutons, chèvres, bovins, chevaux). Tous les mammifères sont susceptibles d'être affectés par la maladie, impliquant occasionnellement des situations létales chez les humains. L'entrée de spores dans l'organisme hôte constitue la première étape nécessaire au développement de la maladie. Elle peut subvenir de trois manières différentes : le plus souvent au travers des légères blessures cutanées ou morsures d'insectes ; par inhalation ; ou au travers d'abrasions mineures du tractus gastro-intestinal (Irenge and Gala, 2012; Derzelle *et al.*, 2015).

Ces trois voies d'infections correspondent à trois formes cliniques différentes de la maladie du charbon chez l'être humain. La première est la forme cutanée qui en représentant plus de 95% des cas est la plus fréquente. Après 2 à 3 jours d'incubation, on peut observer un petit bouton à l'endroit initialement infecté. Il va ensuite y avoir une croissance de vésicules tout autour, cela va finir par sécher, noircir et former une escarre caractéristique. Le plus souvent, la maladie est limitée et des traitements antibiotiques existent pour en guérir. La deuxième forme est similaire à la forme cutanée mais se développe sur la muqueuse intestinale (Boseret *et al.*, 2002; Turnbull *et al.*, 1996). Les humains contractent presque toujours la maladie via une de ces deux formes, soit en manipulant un animal infecté, soit en ingérant de la viande contaminée (Beyer and Turnbull, 2009). Enfin, la dernière est la forme respiratoire qui, bien que moins courante, est considérée comme moyen privilégié si utilisé dans des attaques de bioterrorisme (Inglesby *et al.*, 2002). Ce fut notamment le cas à l'automne 2001 lorsque des lettres contenant une poudre formée de spores de *B. anthracis* furent envoyées par le biais du service postal dans diverses villes des États-Unis, faisant ainsi cinq victimes (Imperiale and Casadevall, 2011; Jernigan *et al.*, 2002).

Quelle que soit la voie d'infection, une fois les spores entrées dans l'organisme, elles sont phagocytées par des macrophages, qui les transportent vers le système lymphatique où elles germent. Ensuite, les bactéries se libèrent, envahissent la circulation sanguine et produisent les facteurs responsables de la virulence (Mock and Fouet, 2001). Les deux facteurs sont une toxine tripartite et une capsule, dont les gènes codants sont respectivement localisés sur pXO1 et pXO2, qui sont deux grands plasmides. La capsule est composée de polypeptides de poly-D-glutamate et empêche la phagocytose des cellules végétatives par le système immunitaire. La toxine tripartite est composée de trois sous-unités protéiques dont deux sont enzymatiques, le facteur œdémogène (FE) et le facteur létal (FL), et dont la troisième est l'antigène protecteur (AP). Ces sous-unités vont s'associer binaires pour former soit la toxine œdémateuse (FE+AP), soit la toxine létale (FL+AP) (Levy *et al.*, 2014; Collier and Young, 2003; Baillie and Read, 2001; Mock and Mignot, 2003; Friebe *et al.*, 2016).

2.1.3 *B. cytotoxicus*

La première souche à avoir été isolée est NVH391-98 lors d'une TIAC en France en 1998 où trois personnes ont perdu la vie suite à une entérite nécrotique analogue à celle causée par *Clostridium perfringens* mais semblant moins sévère (Lund *et al.*, 2000). Cet événement représente le cas de diarrhée d'origine alimentaire le plus grave qu'ont connu nos voisins français. De par son incapacité à croître sous les 17°C et sa capacité à le faire entre 48°C et 53°C, cette souche thermotolérante a été classée dans le groupe phylogénétique VII. D'autres souches similaires, mais pas nécessairement pathogènes, ont aussi été découvertes et finalement, elles ont toutes dernièrement rejoint *B. cereus* s.l. en tant que nouvelle espèce à part entière, devenant ainsi la troisième espèce du groupe connue pour être pathogène pour l'homme (Guinebretière *et al.*, 2013; Auger *et al.*, 2008). Etant donné l'absence présumée chez NVH391-98 lors de sa découverte des entérotoxines connues pour être responsables du syndrome diarrhéique d'origine alimentaire, la pathogénicité particulièrement élevée de cette souche a été attribuée à la production d'une nouvelle toxine formée de pore appelée cytotoxine K-1 (CytK-1) (Lund *et al.*, 2000; Lapidus *et al.*, 2008; Fagerlund *et al.*, 2004). C'est donc à CytK-1, qui est spécifique au groupe phylogénétique VII et qui est un marqueur fiable de détection, qu'est revenue la responsabilité de la lyse de cellules épithéliales dans l'intestin, provoquant alors une diarrhée (Guinebretière *et al.*, 2010; Hardy *et al.*, 2001). Le syndrome diarrhéique et les toxines associées sont détaillés dans le point 4 de ce chapitre I.

Jusqu'à présent, la majorité des souches qui ont été isolées à partir de la nourriture ont été trouvées dans des produits d'origines végétales, et même plus particulièrement dans des produits en lien avec la pomme de terre (Contzen *et al.*, 2014; Guinebretière *et al.*, 2013; Glasset *et al.*, 2016; Böhm *et al.*, 2015; Turner *et al.*, 2006).

2.1.4 *B. thuringiensis*

Cette espèce est celle du groupe qui est connue pour son intérêt économique en tant qu'insecticide. En 2004, elle représentait 90% du marché des bio-insecticides qui lui-même représente environ 2% du marché global des insecticides (Chattopadhyay *et al.*, 2004; Bravo *et al.*, 2011). C'est sa capacité à être pathogène pour certains insectes, nématodes, protozoaires et acariens qui est utilisée pour contrôler divers nuisibles dans les jardins et les champs, ainsi que pour combattre les insectes vecteurs de la malaria ou de la fièvre jaune. En effet, *B. thuringiensis* peut produire des inclusions parasporales, également appelées cristaux protéiques et constituées de toxines, durant la sporulation et qui ont une action larvicide. Cette production est aussi le seul moyen de distinguer *B. thuringiensis* de *B. cereus* (Patino-Navarrete and Sanchis, 2017; Schnepf *et al.*, 1998; Chaufaux, 1995). Les toxines produites comprennent des protéines « crystal » (Cry), qui sont les facteurs de virulence obligatoires, des protéines « cytolytic » (Cyt) et des protéines « Vips », pour

vegetative insecticidal proteins. Les deux premières classes de toxines citées sont des δ -endo-toxines et ce sont elles qui forment les cristaux protéiques alors que les dernières sont sécrétées dans le milieu durant la phase végétative de croissance. Les gènes de ces diverses protéines sont localisés sur des grands plasmides (Zheng *et al.*, 2017; Bravo *et al.*, 2011; Vachon *et al.*, 2012; Palma *et al.*, 2014).

En plus d'être entomopathogène, certaines souches de *B. thuringiensis* possèdent aussi les gènes codant pour les mêmes entérotoxines que celles produites par *B. cereus* et potentiellement impliquées dans le syndrome diarrhéique (Cho *et al.*, 2015; Gaviria Rivera *et al.*, 2000). Cependant, malgré cette implication potentielle, l'espèce a rarement été associée à des TIA. Cela peut être dû à une sous-estimation causée par la difficulté de distinguer *B. cereus* et *B. thuringiensis* dans les méthodes de détection habituelles en microbiologie alimentaire (McIntyre *et al.*, 2008). Outre les maladies d'origine alimentaire, *B. thuringiensis* a aussi été relié à d'autres infections touchant l'être humain telles que la nécrose de tissus associées à des plaies, des infections oculaires et des périodontites (Hernandez *et al.*, 1999; Callegan *et al.*, 2006; Helgason *et al.*, 2000b).

2.1.5 *B. weihenstephanensis*

Cette espèce a été ajoutée au groupe *B. cereus* après la parution de l'article de Sabine Lechner (1998) et ce, dans le but de clairement distinguer les souches psychrotolérantes des autres. Dans ce papier, elle est différenciée par son aptitude à pousser entre 4 et 7°C mais pas à 43°C. Néanmoins, il a été montré que certaines souches psychrotolérantes de *B. cereus* s.l. n'appartiennent pas à *B. weihenstephanensis*. Une autre caractéristique distinctive mise en avant est leur capacité à synthétiser une protéine « cold shock » A (CspA) particulière, mais là encore, des souches poussant à 43°C et possédant ce variant de *cspA* ont été identifiées (Lechner *et al.*, 1998; Bartoszewicz *et al.*, 2009; Stenfors and Granum, 2001).

Malgré ces critères de discrimination qui semblent discutables, ces bacilles psychrotolérants sont connus pour causer des problèmes d'altération de la nourriture. De plus, ils possèdent les déterminants génétiques des toxines associées aux syndromes diarrhéique et émétique et peuvent ainsi être potentiellement responsables de cas de TIA, même si actuellement aucun cas n'a encore été relaté. Au vu de tous ces éléments, cette espèce est considérée comme problématique dans l'industrie agro-alimentaire et en particulier dans le secteur des aliments réfrigérés (Baron *et al.*, 2007; Stenfors *et al.*, 2002; Hoton *et al.*, 2009 ; Thorsen *et al.*, 2009; Samapundo *et al.*, 2011a).

2.1.6 *B. mycoides* et *B. pseudomycoides*

D'un point de vue étymologique, le mot *mycoides* signifie « similaire à un champignon ». En effet, *B. mycoides* et *B. pseudomycoides* sont caractérisés par des colonies qui ont une croissance rhizoïdale avec production de filaments qui peuvent s'étendre sur plusieurs centimètres (Fig. I.3). Outre cette distinction phénotypique avec les autres *B. cereus* s.l., ces deux espèces possèdent des profils en acides gras différents et cela permet de les distinguer des cinq espèces du groupe *B. cereus* mais aussi entre elles. Un autre moyen pour discriminer ces deux bacilles est la capacité qu'à *B. mycoides* à produire de l'acétanilide (Jensen *et al.*, 2003; Nakamura, 1998; Nakamura and Jackson, 1995). Peu d'études ont été faites à leur sujet et les connaissances les concernant sont relativement limitées (Tourasse *et al.*, 2006). Toutefois, il a été montré que certaines souches possédaient des gènes ou fragments de gènes d'entérotoxines présumées (Swiecicka and Mahillon, 2006; Oltuszk-Walczak and Walczak, 2013) et des souches auraient été isolées lors de TIA au Canada (McIntyre *et al.*, 2008).

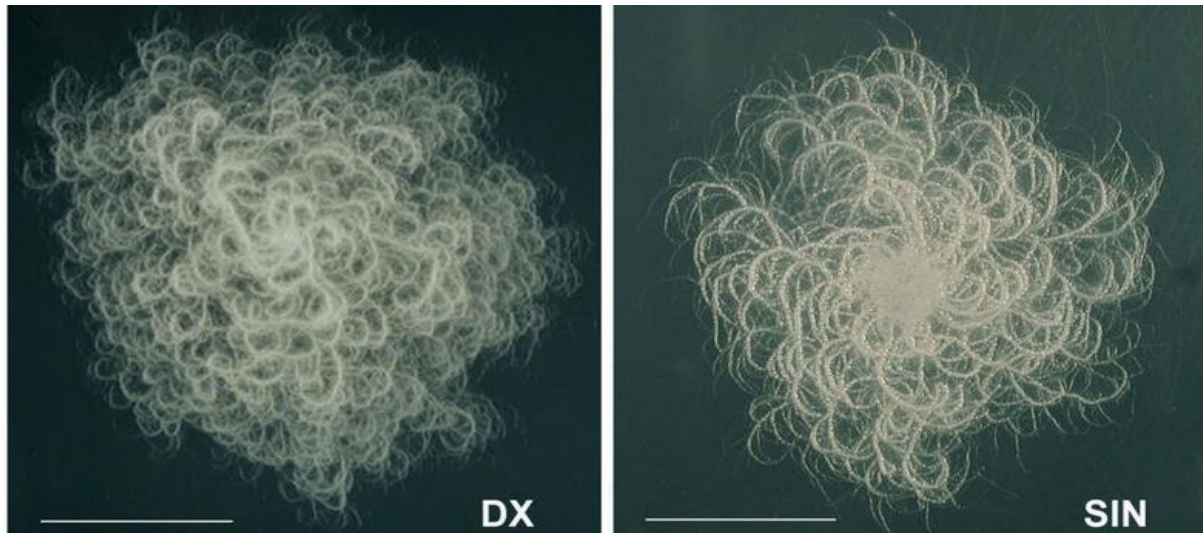


Figure I.3 - Colonies de *B. mycoides*. Les colonies sont formées par des cellules bacillaires reliées bout à bout formant des filaments qui fonctionnent comme des faisceaux avec une direction de courbure génétiquement déterminée. A gauche, DX pour dextre, avec des projections courbées dans le sens des aiguilles d'une montre et à droite, SIN pour senestre, avec une courbure opposée. Barre d'échelle = 1 centimètre (Di Franco *et al.*, 2002).

2.2 Méthodes d'isolement, de dénombrement et de détection

Excepté *B. mycoides* et *B. pseudomycoides*, la majorité des souches du groupe *B. cereus* ont un phénotype similaire sur boîte de Pétri. En effet, sur des milieux de culture classiques contenant de l'agar, elles se développent en tant que grandes colonies (de 3 à 8mm de diamètre) de forme circulaire à asymétrique, de couleur plutôt pâle ou blanche, d'aspect mat ou granuleux, et souvent avec des bords irréguliers (Logan and de Vos, 2015; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Les méthodes d'isolement et d'énumération à partir d'échantillons environnementaux, cliniques et alimentaires se réalisent en utilisant des milieux de cultures sélectifs conventionnels (Fricker *et al.*, 2008).

En microbiologie alimentaire, l'organisation internationale de normalisation préconise, dans sa norme ISO 7932:2004, l'utilisation du milieu « mannitol, egg yolk, polymyxin » (MYP) pour le dénombrement des colonies de *B. cereus* présomptifs. La méthode consiste à dénombrer les colonies caractéristiques sur le milieu MYP ainsi qu'à effectuer une confirmation grâce à un test d'hémolyse sur de la gélose au sang frais de mouton, après des incubations de 24h à 30°C sur deux milieux. Le milieu MYP a été développé par Mossel en 1967. Ses caractéristiques clés résident dans l'incapacité de *B. cereus* à fermenter le mannitol et dans la capacité qu'ont la plupart des souches à produire de la lécithinase. Ainsi, les colonies de *B. cereus* qui s'y forment sont de couleur rose car mannitol-négatif, et généralement entourées d'un halo blanchâtre qui résulte de la dégradation de la lécithine présente dans le jaune d'œuf (Fig. 1.4). L'ajout de polymyxine sert à inhiber une partie de la microflore secondaire et est censé conférer sa sélectivité au milieu. Les souches de *B. cereus* ont une activité hémolytique et le milieu non sélectif qu'est la gélose au sang de mouton sert à attester de cette activité (ISO, 2004; Mossel *et al.*, 1967; Ehling-Schulz *et al.*, 2004a). Lors de la croissance d'une bactérie sur une telle gélose, il est en effet possible d'apprécier la lyse des globules rouges qui composent ce milieu. L'hémolyse provoquée par *Bacillus* peut être de deux grands types, α ou β , entre lesquels il existe des situations intermédiaires (Fig. 1.5). L'hémolyse- β est caractérisée par une colonie autour de laquelle une large zone d'hémolyse complète se forme. L'hémolyse- α se manifeste, quant à elle, par une légère zone de couleur verdâtre à brunâtre entourant la colonie et due à une décoloration et une perte de potassium des globules rouges (Adams *et al.*, 2015; Madigan *et al.*, 1997).

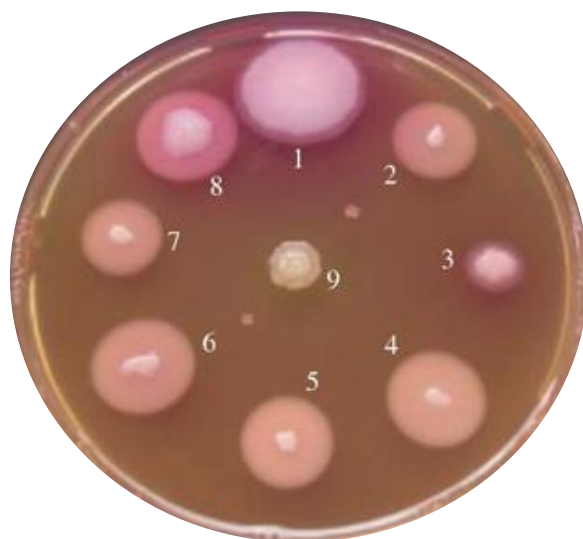


Figure 1.4 - Colonies de *B. cereus* sur le milieu MYP (Fricker *et al.*, 2008).

Légende : 1 : NVH 391-98 (souche de référence *cytK-1*, *B. cytotoxicus*) ; 2 : NC 7401 (isolat d'un foyer émetique) ; 3 : RIVM BC67 (isolat de matières fécales humaines) ; 4 : RIVM BC90 (isolat de matières fécales humaines) ; 5 : WSBC 10204 (*B. weihenstephanensis*) ; 6 : WSBC 10882 (isolat d'un foyer émetique) ; 7 : F4810 / 72 (souche de référence émetique) ; 8 : ATCC 14579 (*B. cereus*) ; 9 : *B. licheniformis* (contrôle négatif).

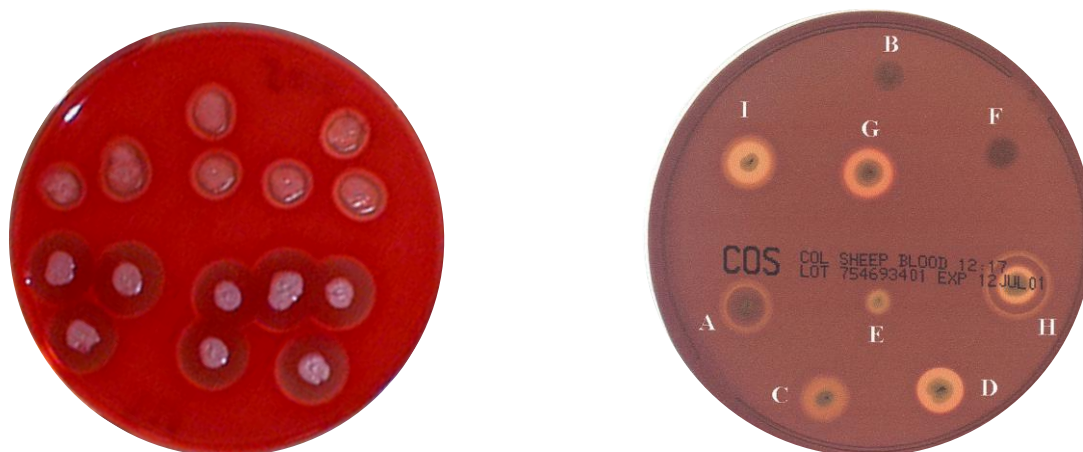


Figure 1.5 - À gauche : Hémolyse- α dans la partie supérieure et hémolyse- β dans la partie inférieure sur de la gélose au sang (Andersson *et al.*, 2004). À droite : Neuf types d'hémolyse trouvés chez 198 souches de *B. cereus* et *B. thuringiensis* (Vilas-Boas *et al.*, 2002).

Cependant, comme elle le précise clairement avec le terme « présumptifs », cette norme ISO 7932:2004 utilisée de façon routinière dans les laboratoires ne permet pas de différencier les membres du groupe *B. cereus* s.l. En conséquence, la prévalence précise de chaque espèce ne peut être déterminée avec cette méthode. D'autres tests et techniques peuvent être mis en œuvre pour permettre une discrimination. On peut citer les tests de mobilité pour discriminer *B. anthracis* des autres, des tests biochimiques, ou encore l'utilisation de techniques moléculaires comme par exemple une extraction d'ADN suivie par une « polymérase chain reaction » (PCR) pour détecter la présence de certains gènes caractéristiques (ISO, 2004; Frentzel *et al.*, 2018; England Public Health, 2015; Velusamy *et al.*, 2010).

3 Importance des spores de *B. cereus*

Une des raisons majeures qui explique la difficulté qu'a l'industrie agro-alimentaire à empêcher la contamination de ses produits par *B. cereus* est liée à la capacité de ce bacille à former des spores. Ces dernières sont résistantes à la chaleur, aux radiations, aux agents désinfectants, à la dessiccation et autres stress environnementaux. Et lorsqu'on combine cela avec leur capacité d'adhérer aux surfaces, on comprend qu'il est très compliqué d'éradiquer complètement *B. cereus* d'un environnement dans lequel ses spores sont présentes (Delbrassinne and Mahillon, 2015; Rosenquist *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2017). Certaines étapes principales du cycle de vie des bactéries sporulantes sont détaillées dans ce point 3.

3.1 Formation des spores et structure

Lorsque des cellules de *B. cereus* sont confrontées à des conditions défavorables telles qu'un déficit en nutriments dans leur milieu, elles ont la capacité de sporuler. C'est un processus au cours duquel elles vont se différencier en formant au sein de leur cytoplasme des endospores, plus couramment appelées spores, qui sont des formes de résistance pour assurer la survie. En effet, ces structures

dormantes et extrêmement résistantes, particulièrement à la chaleur, peuvent subsister pendant plusieurs années dans l'environnement (Leggett *et al.*, 2012; Stragier and Losick, 1996). Bien que la majorité des études portent sur *B. subtilis*, une autre espèce du genre *Bacillus*, les connaissances qui en découlent sont généralement valables pour les autres membres du genre. La formation de spores à partir d'une cellule végétative nécessite de nombreux changements morphologiques qui peuvent être divisés en sept grandes étapes. Pour résumer, il y a division asymétrique entre la cellule mère et une petite préspore, la première va englober la deuxième et va finir par être lysée et libérer l'endospore (Setlow and Johnson, 2012; Hilbert and Piggot, 2004; Errington, 1993). La sporulation, elle-même induite par différents facteurs, peut survenir dans différents environnements et les conditions sous lesquelles elle a lieu vont déterminer les propriétés de la spore formée. Par exemple, la température de sporulation va avoir un impact sur la résistance à divers stress, sur la germination ainsi que sur la composition des structures de la spore (de Vries *et al.*, 2005; Planchon *et al.*, 2011).

Les propriétés de dormance, de germination et de résistance des spores bactériennes sont dues à leur structure unique qui est bien différente de celle d'une cellule végétative et qui est constituée de plusieurs composants assemblés lors de la sporulation (Foster and Johnstone, 1990). Comme illustré sur la Fig. 1.6, une spore de *B. cereus* est composée d'un cœur ou protoplasme pauvre en eau, riche en « small acid soluble proteins » (SASP), en calcium et en acide dipicolinique (DPA), entouré dans l'ordre d'une membrane interne, d'une paroi cellulaire germinale, d'un cortex constitué de peptoglycane, d'une membrane externe, de tunique et finalement d'un exosporium (Wells-Bennik *et al.*, 2016; Sunde *et al.*, 2009).

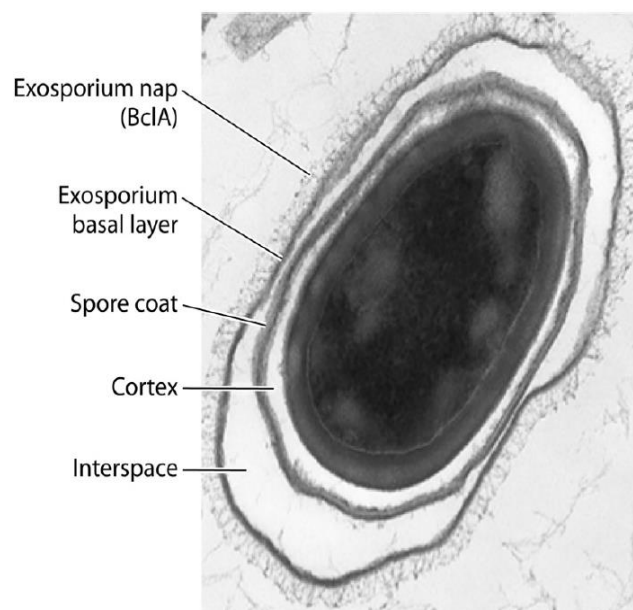


Figure 1.6 - Spore de *B. anthracis* vue au microscope électronique en transmission (Stewart, 2015).

3.2 Résistances

Comme mentionné précédemment, c'est la structure particulière de la spore et sa composition qui lui confèrent ses propriétés de résistance envers différents agents incluant la dessiccation, le gel, le dégel, les chaleurs humide et sèche, les radiations γ et UV, les hautes pressions et un nombre important de produits chimiques toxiques. Néanmoins, il peut exister de grandes variations de résistances entre des spores de différentes souches, espèces ou genres (Setlow, 2016).

Si on les compare aux cellules en croissance, les spores ont une plus grande résistance face aux traitements thermiques avec chaleur humide et cela est majoritairement dû au faible contenu en eau de leur noyau, conséquence de la teneur élevée en DPA. Généralement, plus le noyau est déshydraté, plus la spore est résistante. Le DPA est chélaté avec des cations métalliques divalents ou plus rarement monovalents et entre tous, c'est l'ion calcium qui confère la plus grande résistance à la chaleur humide. Un autre mécanisme qui protège les spores, tant de la chaleur humide que sèche cette fois, est la limitation des dégâts faits à l'ADN grâce à la protection engendrée par sa saturation avec des SASP. De nombreux autres facteurs inhérents ou environnementaux participent à la résistance des spores au moment où celles-ci subissent un traitement thermique. Mais il est utile de rappeler que les caractéristiques environnementales présentes avant le traitement thermique, telles que la composition du milieu de sporulation, ont également une influence sur la résistance des spores. On peut aussi mentionner les températures de croissance et de sporulation qui sont positivement corrélées à la résistance des spores à la chaleur (Rajkovic *et al.*, 2008a; Carlin *et al.*, 2010; Setlow, 2016; Setlow, 2006).

Cette résistance à la chaleur a pour conséquence une non-destruction des spores par les traitements thermiques légers qui peuvent avoir lieu lors des procédés de fabrication des aliments, tels que la pasteurisation, et *B. cereus* peut ainsi se retrouver dans le produit final. Ces traitements, ainsi que la cuisson des denrées alimentaires, éliminent la majorité des cellules végétatives qui composent la flore accompagnatrice et peuvent activer la germination des spores dans la nourriture. Il peut s'ensuivre une croissance de cellules végétatives, soit parce que les conditions de refroidissement et de stockage sont inappropriées, soit parce que les souches sont psychrotolérantes et peuvent croître aux températures de réfrigération. Cette croissance risque de causer des TIA ou d'altérer l'aliment contaminé, comme par exemple le lait qui peut prendre un goût amer ou même cailler (Brown, 2000; Hanson *et al.*, 2005; Carlin *et al.*, 2006; De Bellis *et al.*, 2015; Hayrapetyan *et al.*, 2016; Røssland *et al.*, 2003).

3.3 Germination

Malgré sa grande résistance à de nombreux facteurs, la spore à l'état de dormance reste sensible à son environnement et lorsqu'elle détecte un retour des

conditions favorables, elle va initier sa germination et la poursuivre en dégradant ses propres structures. Elle va pouvoir se développer et évoluer vers une cellule végétative métaboliquement active, semblable à celle qui avait sporulé au départ (Setlow, 2003; Paidhungat and Setlow, 2002). Par définition, la germination est donc principalement un processus aboutissant à la perte des propriétés spécifiques des spores telles que leur structure unique, leur extrême résistance et leur dormance (Postollec *et al.*, 2012; Moir, 2006). Il s'agit d'un processus séquentiel dans lequel la première étape comprend la libération d'ions et de DPA engendrant une réhydratation partielle du protoplasme et une légère perte de résistance à la chaleur. La seconde étape est l'hydrolyse du cortex et une réhydratation complète du noyau qui par conséquence restaure l'activité enzymatique et entraîne une croissance suite à la synthèse de macromolécules. Cela se traduit par la perte de la réfractabilité lors de l'observation au microscope à contraste de phase et une diminution de la capacité à diffuser la lumière (Soni *et al.*, 2016; Kutima and Foegeding, 1987; Soni *et al.*, 2018).

La spore perçoit le retour à des conditions favorables grâce à certaines molécules présentes dans son environnement proche, appelées germinants, qui vont interagir avec des récepteurs localisés sur la membrane interne de la spore. Les germinants peuvent être de deux types, les germinants nutritifs et les non nutritifs. Les plus courants appartenant à la première catégorie sont les acides aminés incluant le L-alanine, les sucres et les ribosides. Les germinants non nutritifs incluent quant à eux les sels, les surfactants cationiques comme le dodecylamine, le calcium dipicolinate (DPA - Ca^{2+}), le lysozyme et les hautes pressions (van de Voort and Abee, 2013; Setlow, 2003; Moir and Cooper, 2015). Avant l'addition de germinants, pour être capable de germer, la spore doit généralement subir une étape préalable d'activation qui peut notamment être réalisée par une exposition à la chaleur (Fernández *et al.*, 2001; Gould, 2006).

3.4 Adhésion

De par leur hydrophobicité globale et la présence d'appendices sur l'exosporium, les spores de *B. cereus* ont une capacité d'adhésion importante. Cette capacité facilite leur présence sur les surfaces dans les lignes de production des industries agro-alimentaire et complique les procédures de nettoyage pour assurer une bonne hygiène. Ces spores peuvent ainsi être à l'origine de contaminations. Leur aptitude à initier la formation de biofilms constitue également un vrai problème pour ce secteur industriel (Stewart, 2015; Andersson *et al.*, 1995; Ryu and Beuchat, 2005; Faille *et al.*, 2013).

4 Toxines de *B. cereus* responsables des maladies d'origine alimentaire

Il est important de se rappeler que même s'il est fréquent de trouver des cellules végétatives ou des spores de *B. cereus* s.l. dans des matrices alimentaires, ces bacilles ne constituent généralement qu'une partie de la flore totale, ne sont pas pathogènes dans la plupart des cas et s'ils le sont, il faut qu'ils soient présents en quantité suffisante que pour provoquer une maladie (Adams *et al.*, 2015). Néanmoins, les souches qui sont pathogènes peuvent être à l'origine de deux types de toxi-infections alimentaires, selon la ou les toxines produites. Le premier, causé par une ou plusieurs entérotoxines, se traduit par des diarrhées tandis que le second, causé par une toxine émétique, aboutit à des vomissements. Leurs caractéristiques respectives sont reprises dans le Tableau I.3.

La première preuve d'une implication de *B. cereus* dans une TIAC remonte au début des années 1950. En effet, Steinar Hauge rapporte qu'un dessert à base de sauce à la vanille fortement contaminé par *B. cereus* est responsable d'une maladie diarrhéique (Hauge, 1955). Le syndrome émétique provoqué par *B. cereus* est quant à lui cité pour la première fois environ 20 ans plus tard lors de maladies accompagnées de vomissements après ingestion de riz frit provenant de restaurants chinois (Mortimer and McCann, 1974). Suite à ces événements, *B. cereus* a été reconnu comme pouvant être la cause de maladies d'origine alimentaire, le plus souvent bénignes mais pouvant aussi s'avérer mortelles (Morris, 1981; Chin, 2000).

Tableau I.3 - Caractéristiques des deux types de maladies causées par *B. cereus* (Granum and Lindbäck, 2012; Glasset *et al.*, 2016).

Caractéristiques	Syndrome diarrhéique	Syndrome émétique
Type de toxines	Protéines ; entérotoxine(s)	Peptide cyclique ; toxine émétique
Endroit de production de la toxine	Dans l'intestin grêle de l'hôte	Préformée dans l'aliment
Dose infectieuse	10^3 à 10^5 – 10^7 cellules (totales)	10^5 – 10^8 cellules (par g d'aliment)
Temps d'incubation	8 – 16h (occasionnellement >24h)	0,5 – 5h
Durée de la maladie	12 – 24h (occasionnellement plusieurs jours)	6 – 24h
Symptômes	Douleur abdominale, diarrhée aqueuse avec nausée occasionnelle	Nausée, vomissements et malaise (parfois suivis de diarrhées, à cause de la production d'entérotoxines)
Aliments les plus fréquemment impliqués	Viandes, soupes, légumes, puddings, sauces, lait et produits laitiers	Riz cuit et frit, pâtes, pâtisseries et nouilles

4.1 Intoxication émétique

Selon plusieurs études, les souches émétiques de *B. cereus* sont assez rares dans l'environnement, représentant environ 1,5% des souches (Hoton *et al.*, 2009 ; Ceuppens *et al.*, 2011). Le céréulide, la toxine préformée dans la nourriture par ces souches et conduisant à une intoxication, est à l'origine du syndrome émétique, caractérisé par des nausées et des vomissements survenant rapidement, c'est-à-dire dans un délai de 0,5 à 6 heures après le moment où la nourriture contaminée est ingérée. Les aliments les plus souvent associés au syndrome émétique sont riches en amidon tels que les pâtes et le riz, qui n'auraient pas été conservés dans des conditions de températures appropriées après leur cuisson (Kramer and Gilbert, 1989; Schoeni and Lee Wong, 2005). Une explication potentielle à ces associations fréquentes est l'incapacité qu'ont les souches émétiques de *B. cereus* à hydrolyser l'amidon. À cause de cette propriété, les aliments contaminés peuvent paraître tout à fait normaux au niveau de leurs goût, odeur et aspect, malgré le nombre important de *B. cereus* contenu dedans (Pirttijärvi *et al.*, 1999; Agata *et al.*, 1996). Les symptômes d'une telle intoxication due à *B. cereus* sont similaires à ceux causés par *Staphylococcus aureus* et il est par conséquent fréquent de confondre les deux (Wambo *et al.*, 2011).

La toxine émétique céréulide, de masse moléculaire 1,2 kDa, est un dodecadepsipeptide cyclique constitué d'une séquence de deux acides aminés et deux oxyacides répétée trois fois, (D-O-Leu-D-Ala-D-O-Val-D-Val)₃ (Agata *et al.*, 1994; Granum and Lund, 1997). Cette molécule est thermostable puisqu'elle résiste à la cuisson, aux températures de friture et même à l'autoclavage à 121°C pendant plus de 15 minutes. Grâce à sa structure rigide, elle tolère aussi la large gamme de pH qui va de 2 à 11 et ne perd pas son activité lorsqu'elle est en contact avec diverses enzymes protéolytiques (Rajkovic *et al.*, 2008b; Agata *et al.*, 2002). À cause de ces diverses propriétés, il est difficile d'éliminer le céréulide de la nourriture une fois qu'il s'y est formé et s'il est ingéré, il est très probable qu'il reste intact dans l'estomac et puisse ainsi se lier, sous sa forme active, à certaines cellules. En effet, les vomissements résultent de la stimulation du nerf vague afférent qui innerve l'estomac suite à la liaison du céréulide aux récepteurs 5-HT₃ (Agata *et al.*, 1995). De plus, structurellement fort semblable à la valinomycine, le céréulide a été reconnu comme capable d'agir en tant que puissant ionophore au potassium (Teplova *et al.*, 2006). Par conséquent, il peut entraîner une perturbation de l'activité mitochondriale des cellules hépatiques en inhibant l'oxydation des acides gras et ainsi causer de graves dommages au foie (Kotiranta *et al.*, 2000 ; Ehling-Schulz *et al.*, 2004a; Mahler *et al.*, 1997). Des indices pointent également dans le sens d'une implication potentielle dans des cas de diabète suite à une exposition chronique à de faibles concentrations de céréulide (Vangoitsenhoven *et al.*, 2015).

Le céréulide est le produit d'une synthèse peptidique non-ribosomale. En effet, il est constitué de plusieurs sous-unités qui sont assemblées grâce à une synthétase peptidique non ribosomale (NRPS) codée par des gènes *ces*. Ce groupe de gènes de 24 kb est localisé sur un grand plasmide dont le squelette génétique est semblable à celui de pXO1 impliqué dans la virulence de *B. anthracis* (Hoton *et al.*, 2005; Ehling-Schulz *et al.*, 2006a; Ehling-Schulz *et al.*, 2006b; Van der Auwera *et al.*, 2013).

La régulation de la synthèse du céréulide est un mécanisme complexe où l'expression des gènes de la toxine est liée aux phases du cycle de vie de *B. cereus* et aux conditions spécifiques, telle que la disponibilité en nutriments dans les matrices alimentaires (Lücking *et al.*, 2015; Ehling-Schulz *et al.*, 2015). La production de la toxine démarre à la fin de la phase de croissance logarithmique et atteint son maximum au début de la phase stationnaire. Outre ce lien qu'à la production avec la phase de croissance, la synthèse est également influencée par des facteurs externes. En effet, plusieurs études ont montré qu'en changeant la température d'incubation, la disponibilité en oxygène et le milieu de culture ou matrice alimentaire, il est possible d'obtenir différentes quantités de céréulide (Ehling-Schulz *et al.*, 2004a; Häggblom *et al.*, 2002; Finlay *et al.*, 2000; Apetroaie-Constantin *et al.*, 2008; Thorsen *et al.*, 2009; Jääskeläinen *et al.*, 2004).

Étant donné que les déterminants génétiques du céréulide sont connus, il est possible de détecter les souches émétiques potentielles de *B. cereus* en réalisant des tests PCR. Les premières amorces pour la détection de *ces*, nommées CER1 et EMT1, qui ciblaient un fragment de 188 pb, ont été développées par Horwood *et al.* (2004). Dans le courant de l'année qui a suivi, deux autres sets d'amorces ont également été proposés, ceux-ci permettant d'avoir des tailles d'amplicons supérieures (Ehling-Schulz *et al.*, 2004b; Ehling-Schulz *et al.*, 2005). Néanmoins, cette technique de PCR ne permet pas de savoir si oui ou non le céréulide est produit. Pour repérer le céréulide, il faut utiliser d'autres méthodes telles que des tests sur des cultures cellulaires ou sur la mobilité de spermatozoïdes de verrat, ainsi que des méthodes chromatographiques et moléculaires (Andersson *et al.*, 1998; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

4.2 Toxico-infection diarrhéique

Le syndrome diarrhéique causé par *B. cereus* se produit surtout après la consommation de produits protéiques (LNR TIA, 2017). Il se traduit par des douleurs abdominales et des épisodes de diarrhée aqueuse, manifestations ressemblant fortement à celles causées par *C. perfringens* (Goepfert *et al.*, 1972; Le Loir *et al.*, 2003). Ces symptômes ne semblent pas être provoqués par l'ingestion de toxines préformées dans les aliments car les toxines incriminées sont thermolabiles et ne résistent pas aux protéases du tractus gastro-intestinal (Turnbull *et al.*, 1979). L'hypothèse actuelle (Fig. 1.7) est que cette toxico-infection fait suite à l'ingestion d'aliments contaminés par des cellules végétatives ou des spores de *B. cereus* dont certaines sont capables de survivre au passage de l'estomac et d'atteindre l'intestin

grêle. Une fois arrivées là, il est très peu probable qu'elles se développent et produisent leurs toxines dans le lumen intestinal où ces deux actions sont inhibées par la microflore endogène et les enzymes digestives. Dès lors, il est supposé que leur croissance s'effectue dans la couche de mucus qui recouvre la surface intestinale et il est même possible qu'elles puissent adhérer aux entérocytes et interagir avec ces derniers. Il s'ensuit une production d'entérotoxines qui vont endommager les cellules épithéliales proches en y formant des pores, causant ainsi une lyse osmotique responsable de la diarrhée (Duport *et al.*, 2016; Berthold-Pluta *et al.*, 2015).

Contrairement au syndrome émétique pour lequel la toxine causale est bien connue, la ou les entérotoxine(s) produites par *B. cereus* et responsable(s) de la diarrhée ne sont pas clairement identifiées. En effet, diverses entérotoxines

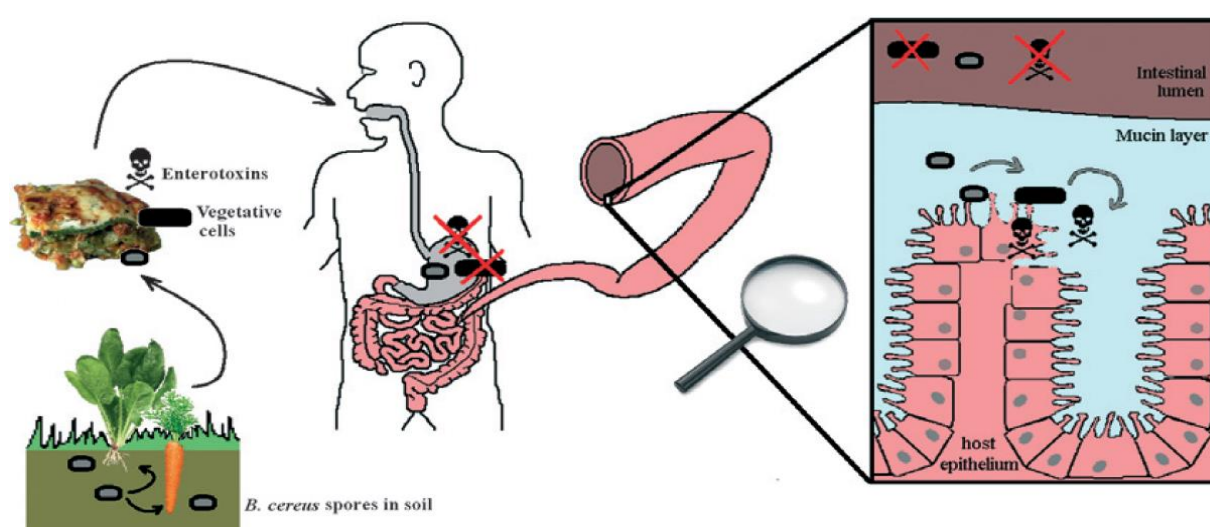


Figure 1.7 - Hypothèse concernant le mode d'action de *B. cereus* causant une toxico-infection diarrhéique. Après la consommation d'aliments contaminés par des spores, des cellules végétatives et/ou entérotoxines de *B. cereus*, la majorité des entérotoxines et des cellules végétatives sont inactivées lors du passage gastrique. La communauté microbienne endogène limite la croissance végétative de *B. cereus*, et la production d'entérotoxines intestinales est peu susceptible d'affecter l'hôte en raison de la dégradation rapide de ces entérotoxines par les sécrétions digestives de l'hôte. Les spores de *B. cereus* ingérées et/ou les cellules végétatives adhèrent d'abord à la muqueuse intestinale, ce qui est suivi par la germination (dans le cas des spores), la croissance végétative et la production d'entérotoxines, qui endommagent l'épithélium de l'hôte. Les objets ne sont pas dessinés à l'échelle (Ceuppens *et al.*, 2011).

potentielles ont été associées au syndrome diarrhéique causé par *B. cereus*. Les candidates les plus probables sont au nombre de trois, dont les gènes sont activés par un régulateur pléiotrope, PlcR. Deux sont des complexes protéiques, l'hémolysine BL (Hbl) et l'entérotoxine non hémolytique (Nhe), et une est une protéine seule, la cytotoxine K (CytK). Elles sont toutes capables de former des pores et ainsi de perturber l'intégrité de la membrane plasmique des cellules épithéliales. De plus, d'autres facteurs de virulence tels que d'autres hémolysines et diverses enzymes comme des métalloprotéases peuvent aussi contribuer à la pathogénicité de *B. cereus*. Actuellement, on ne sait toujours pas si c'est l'une de ces molécules ou une combinaison qui est à l'origine des symptômes diarrhéiques (Doll *et al.*, 2013; Bottone, 2010; Haug *et al.*, 2010; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008; Castiaux *et al.*, 2015).

La première entérotoxine potentielle qui a été décrite, Hbl, est formée de trois composantes et appartient aux toxines de type A-B, chez lesquelles la sous-unité B intervient dans la liaison cellulaire et la sous-unité A, enzymatiquement active, est transloquée à travers la membrane de la cellule hôte vers le cytoplasme. La fonction de la sous-unité B est assurée par la composante B de l'hémolysine BL, codée par le gène *hblA*, et les deux composantes lytiques L1 et L2, codées respectivement par les gènes *hblD* et *hblC*, jouent le rôle de la sous-unité A (McKillip, 2000; Rajkovic *et al.*, 2008a). L'interaction des trois composantes avec la cellule hôte entraîne la formation d'un pore transmembranaire qui conduit à la lyse cellulaire (Ceuppens *et al.*, 2011). Hbl est une toxine hémolytique, entérotoxique, cytotoxique, dermonécrotique, et elle provoque une augmentation de la perméabilité vasculaire (Beecher and Wong, 1997).

Une deuxième toxine potentielle à laquelle le syndrome diarrhéique a été attribué est l'entérotoxine non-hémolytique isolée en Norvège en 1995, appartenant également au type de toxine A-B et composée elle aussi de trois composantes que sont NheA, NheB et NheC, codées par l'opéron *nheABC* (Granum and Lund, 1997; Six *et al.*, 2012; Fagerlund *et al.*, 2008). Les trois composantes sont indispensables pour l'activité biologique et le ratio qui permet d'atteindre une cytotoxicité maximale est de 10:10:1 pour respectivement, NheA, NheB et NheC. L'entérotoxine non-hémolytique est donc une entérotoxine cytotoxique et à l'inverse de ce que son nom laisse penser, hémolytique mais moins que Hbl (Senesi and Ghelardi, 2010).

Contrairement aux deux autres entérotoxines, la cytotoxine K, aussi appelée hémolysine IV et codée par *cytK*, n'est pas un complexe protéique tripartite mais une protéine simple. Il s'agit d'une protéine cytotoxique, nécrotique et hémolytique de 34 kDa appartenant à la famille des « β -barrel pore-forming toxins ». Les toxines incluses dans cette famille sont sécrétées sous forme soluble puis assemblées en un pore transmembranaire. CytK a été isolée pour la première fois à partir de NVH391-98, la souche type de l'espèce *B. cytotoxicus*, découverte lors de la TIA qui a causé la mort de trois personnes en France (Samapundo *et al.*, 2011b; Ramarao and Sanchis, 2013). Elle a été considérée comme l'agent responsable de ces décès mais depuis lors, il a été montré que l'entérotoxine Nhe a également pu être impliquée (Logan, 2012). Initialement désignée CytK, cette protéine a été renommée CytK-1 après la découverte de CytK-2, un variant ayant 89% d'identité mais dont le potentiel cytotoxique pour les cellules Véro et CaCo2 est cinq fois moindre. Le gène *cytK-1*, variant original, est présent uniquement chez les souches du groupe phylogénétique VII, soit chez *B. cytotoxicus*, et le gène *cytK-2* y est quant à lui toujours absent. Ces caractéristiques constituent ainsi une méthode d'identification des souches de *B. cytotoxicus* (EFSA Panel on Biological Hazards, 2016).

II OBJECTIFS

Les toxi-infections d'origine alimentaire posent des problèmes importants de santé publique au niveau mondial et sont majoritairement causées par des pathogènes bactériens et viraux. Parmi les sept espèces recensées chez *B. cereus s.l.*, *B. cytotoxicus* est la dernière à avoir rejoint le groupe. Tout comme les autres membres appartenant à *B. cereus s.l.*, elle est capable de produire des endospores, difficiles à éliminer une fois présentes dans l'industrie agro-alimentaire. Néanmoins, cette espèce se différencie par la capacité de ses souches à croître à des températures allant jusqu'à 53°C, qualifiées de thermotolérantes, et potentiellement productrices d'une entérotoxine propre à l'espèce, la cytotoxine K-1. Cette dernière a été associée au syndrome diarrhéique, pouvant s'avérer mortel comme ce fut apparemment le cas de la souche de référence NVH391-98 à la fin des années 1990. De par sa découverte récente, la prévalence de cette espèce dans l'environnement, sa diversité et les niches écologiques qu'elle occupe n'ont été que peu étudiées. C'est dans le but d'approfondir les connaissances sur *B. cytotoxicus* que ce mémoire a été réalisé.

Un des deux objectifs principaux est l'isolement et la caractérisation de souches de *B. cytotoxicus* dans d'autres matrices alimentaires que celles où elles ont déjà été identifiées par le passé. Pour ce faire, des étapes de caractérisation, phénotypique et génotypique, seront effectuées après l'identification de souches thermotolérantes appartenant au groupe *B. cereus* dans des aliments disponibles sur le marché belge.

Le deuxième objectif majeur est de procéder à une évaluation de la charge en *B. cytotoxicus* dans des aliments cuisinés et conservés à température ambiante pendant plusieurs jours, condition de stockage inappropriée pouvant subvenir dans un ménage. Il est notamment connu que le niveau de contamination initial de *B. cytotoxicus* dans les produits à base de pommes de terre est généralement assez bas (< 200 CFU/g) (Contzen *et al.*, 2014) mais l'évolution dans le produit après préparation n'est pas documentée. Un suivi du développement de cette bactérie dans certaines matrices alimentaires et de son niveau de contamination sera réalisé afin de situer le risque potentiel de TIA.

III MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 Milieux de cultures et tampons

Tous les milieux de cultures et solutions préparés sont stérilisés dans un autoclave, modèle 2540 ML de la marque Tuttnauer, pendant 15min à une température de 121°C. Après autoclavage, les milieux de cultures solides alors contenus dans des flacons (Schott Duran) sont coulés dans des boîtes de Pétri stériles de 92mm de diamètre et de 16mm de hauteur (Sarstedt) et laissés à refroidir et à sécher à température ambiante pendant 24 heures avant d'être placés au réfrigérateur à 4°C.

1.1 Milieu LB agar

Un des milieux utilisés pour la culture des bactéries est le milieu Lysogeny Broth (LB) de Sigma-Aldrich. Il s'agit d'une poudre comprenant du chlorure de sodium permettant de conserver l'équilibre osmotique, de l'extrait de levure et du tryptone comme sources d'éléments nutritifs et enfin de l'agar pour solidifier le milieu. Les quantités des différents composés par litre de milieu sont reprises dans le Tableau III.1.

Tableau III.1 - Composition du milieu de culture LB.

Composants	Concentration (g/l)
Tryptone (végétal)	10,0
Extrait de levure	5,0
Chlorure de sodium (NaCl)	5,0
Agar	15,0
pH (25°C) final = 7,0 ± 0,2	

1.2 Milieu MYP

Le milieu « mannitol, egg yolk, polymyxin » (MYP) est une gélose sélective pour *B. cereus* conçue par Mossel (Mossel *et al.*, 1967). Il est employé pour détecter et dénombrer les cellules végétatives et les spores de *B. cereus* dans les produits alimentaires et son utilisation est recommandée par la norme ISO 7932:2004. Son

fonctionnement est basé sur l'absence de fermentation du mannitol par *B. cereus* et sur la capacité de certaines souches à produire de la lécithinase. Le Tableau III.2 donne sa composition. Le rouge de phénol, présent comme indicateur coloré, le tryptone, l'extrait de viande, le D-mannitol et le chlorure de sodium sont contenus dans un milieu de base déshydraté (Biokar). Afin de préparer du MYP, 225ml d'eau distillée sont additionnés à 11,125g de milieu de base déshydraté dans un flacon (Schott Duran) et l'ensemble est stérilisé. Ce flacon refroidit au bain marie jusqu'à ce qu'il atteigne 47°C, moment où sont ajoutés 25ml d'une émulsion stérile de jaune d'œufs avec polymyxine B (Biokar). L'homogénéisation s'effectue en agitant le flacon et la solution est ensuite coulée dans des boîtes de Pétri (Sarstedt). La gélose ainsi obtenue est supposée être sélective grâce à l'ajout de polymyxine B qui inhibe la flore secondaire et à laquelle *B. cereus* est résistante. L'identification des colonies présumées de *B. cereus* se réalise grâce au halo opaque qui les entoure, formé suite à la dégradation de la lécithine du jaune d'œuf en produits insolubles, ainsi que grâce à leur couleur rose, signe que l'indicateur coloré n'a pas viré au jaune et que le mannitol n'a donc pas été fermenté.

Tableau III.2 - Composition du milieu MYP.

Composants	Quantité/l
Tryptone	10,0 g
Extraits de viande	1,0 g
D-mannitol	10,0 g
Chlorure de sodium	10,0 g
Rouge de phénol	25,0 mg
Agar agar bactériologique	13,5 g
Emulsion de jaune d'œufs	100,0 ml
Sulfate de polymyxine B	100 000 UI
pH (25°C) final = 7,2 ± 0,2	

1.3 Gélose au sang frais de mouton

La gélose au sang frais de mouton (Bio-Rad) est un milieu Columbia (Tableau III.3) où est ajouté 5% de sang frais de mouton. C'est un milieu de culture peu sélectif mais permettant de mettre en évidence le pouvoir hémolytique des bactéries. Lorsque la bactérie mise en culture sur ce milieu réalise l'hémolyse- β , les globules rouges sont complètement dégradés et les colonies sont entourées d'une zone transparente. S'il y a hémolyse- α , la perte de potassium des globules rouges entraîne une décoloration caractérisée par une zone verdâtre à brunâtre autour de la colonie. L'hémolyse- γ est quant à elle caractérisée par l'absence d'hémolyse autour de la colonie.

Tableau III.3 - Composition du milieu Columbia.

Composants	Concentration (g/l)
Mélange spécial de peptone	23,0
Chlorure de sodium	5,0
Amidon	1,0
Agar	10,0
pH (25°C) final = 7,3 ± 0,2	

1.4 Eau peptonée tamponnée

L'eau peptonée tamponnée (EPT) est un milieu liquide jaune clair, non-sélectif, utilisé pour le pré-enrichissement des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. Sa composition (Bio-Rad) est indiquée dans le Tableau III.4. Riche en nutriments, il permet de revivifier des bactéries stressées et d'activer leur croissance. Après sa préparation, l'EPT est conservée au réfrigérateur à 4°C avant son utilisation.

Tableau III.4 - Composition de l'eau peptonée tamponnée.

Composants	Concentration (g/l)
Digestat enzymatique de caséine	10,0
Chlorure de sodium	5,0
Hydrogénophosphate disodique anhydre	3,5
Dihydrogénophosphate de potassium	1,5
pH (25°C) final = 7,0 ± 0,2	

1.5 Solution de Ringer diluée au ¼

La solution de Ringer au ¼ est un liquide isotonique utilisé pour effectuer les dilutions décimales d'échantillons ainsi que pour suspendre la culture de spores de *B. cereus* s.l. Sa composition est décrite dans le Tableau III.5. Ce liquide est obtenu après dissolution d'un comprimé de Ringer (Oxoid) dans 500ml d'eau distillée.

Tableau III.5 - Composition du liquide de Ringer au ¼.

Composants	Concentration (g/l)
Chlorure de potassium	0,105
Chlorure de sodium	2,25
Chlorure de calcium hexahydraté	0,12
Hydrogénocarbonate de potassium	0,05
pH final = 7,0	

1.6 « Phage assay medium »

Le « phage assay (PA) medium » est un milieu liquide produit à partir de bouillon nutritif déshydraté (Merck) (Tableau III.6) supplémenté avec 5g/l de chlorure de sodium (VWR), 0,2g/l de sulfate de magnésium heptahydraté (Merck), de 0,05g/l de sulfate de manganèse (II) monohydraté (Fluka Chemika) et de 0,15g/l de chlorure de calcium dihydraté (Sigma) (Abdelmassih *et al.*, 2011). Il est utilisé comme milieu de sporulation pour *B. cereus*.

Tableau III.6 - Composition du bouillon nutritif.

Composants	Concentration (g/l)
Extraits de viande	3,0
Peptone (animal)	5,0
pH (25°C) final = 7,0 ± 0,2	

1.7 Tampon TAE 50x

Le tampon TAE, abréviation pour trishydroxyméthylaminométhane (Tris), acétate et éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) est préparé à partir d'eau milliQ et est composé de 242g/l de Tris, 57,1ml/l d'acide acétique (VWR) et 100ml/l d'EDTA 500 mM. Il est utilisé pour les gels d'électrophorèse.

2 Échantillons

Afin d'obtenir un meilleur aperçu des matrices alimentaires contenant des souches de *B. cytotoxicus*, un total de 39 produits différents ont été analysés et sont repris dans le Tableau III.7. Parmi eux, il y a deux catégories principales. La première comprend les aliments allant du numéro 1 à 19, qui sont ceux contenant de la pomme de terre sous forme soit brute, soit d'amidon, soit de flocons. La deuxième, reprenant les numéros 19 à 39, est constituée par des aliments en poudre ou ayant subi une étape de traitement thermique durant leur production, telle qu'une déshydratation ou un séchage par exemple, mais sans trace de pomme de terre dans leur composition. Pour chaque produit, au minimum un échantillon est prélevé pour analyse et lorsqu'il y a plusieurs échantillons provenant d'un même produit, il s'agit alors d'échantillons issus d'aliments identiques mais qui ont des numéros de lots différents.

Tableau III.7 - Matrices alimentaires analysées pour évaluer l'occurrence de *B. cytotoxicus*.

Aliment // marque	Lieu d'achat // origine
1 Purée de pommes de terre // Delhaize	Delhaize, Louvain-la-Neuve
2 Purée nature // 365 - Delhaize	Delhaize, Louvain-la-Neuve
3 Rondelles de pommes de terre // Delhaize	Delhaize, Incourt // Belgique
4 Purée maison à base de pommes de terre fraîches	Match, Grez-Doiceau // Belgique
5 Gnocchis // Bertagni	Delhaize, Incourt // Italie
6 Fécule de pommes de terre // Soubry	Delhaize, Louvain-la-Neuve
7 Chips au sel // Everyday	Colruyt, Grez-Doiceau // Belgique
8 TUC crisp finely salted // LU	Colruyt, Grez-Doiceau
9 Oven baked crispy thins goût emmental // Lays	Delhaize, Incourt
10 Mexican fajita spice mix // Poco Loco	Colruyt, Grez-Doiceau
11 Mix pour Bahmi Special // Conimex	Delhaize, Louvain-la-Neuve // Pays-Bas
12 Soupe instantanée aux tomates // Royco	Spar, Louvain-la-Neuve // Belgique
13 Soupe instantanée Saint-Germain crunchy // Royco	Colruyt, Grez-Doiceau ; Spar et Louis Delhaize, Louvain-la-Neuve // Belgique
14 Soupe instantanée aux légumes // Natur Compagnie	Bi'Ok, Gastuche // Allemagne
15 Soupe instantanée aux champignons // Natur Compagnie	Bi'Ok, Gastuche // Allemagne
16 Soupe instantanée St-Germain pois avec croûtons // Menuto	Aldi, Louvain-la-Neuve
17 Nouilles instantanées // Mr.Noodles	Action Perwez // Bangladesh
18 Cube de bouillon de légumes // Knorr	Delhaize, Incourt
19 Sauce chasseur // Knorr	Colruyt, Grez-Doiceau
Suite à la page suivante	

Aliment // marque	Lieu d'achat // origine
20 Curcuma // Flavi	Delhaize, Louvain-la-Neuve
21 Curcuma bio // Cook	Färm, Louvain-la-Neuve // Madagascar
22 Epices de curcuma // Delhaize	Delhaize, Louvain-la-Neuve
23 Curcuma longa // Ethiquable	Oxfam, Louvain-la-Neuve // Inde
24 Gingembre séché	// Mali
25 Coffee-mate // Nestlé	Delhaize, Incourt
26 Lait écrémé instantané // Régilait	Delhaize, Incourt
27 Pudding goût vanille // Dr. Oetker	Delhaize, Incourt
28 Sucre cristallisé fin // Everyday	Colruyt, Grez-Doiceau // Belgique
29 Champignons de Paris coupés en conserve // Everyday	Colruyt, Grez-Doiceau
30 Cèpes séchés // Le montagnard	Colruyt, Grez-Doiceau
31 Soupe instantanée à la tomate avec Xtra Pasta // Royco	Colruyt, Grez-Doiceau
32 Soupe de légumes instantanée aux pâtes // Natur Compagnie	Bi'Ok, Gastuche // Allemagne
33 Potage déshydraté Chorba // Maggi	Delhaize, Louvain-la-Neuve // Maroc
34 Potage déshydraté Harira // Maggi	Delhaize, Louvain-la-Neuve // Maroc
35 Bouillon de légumes instantané // Morga	Bi'Ok, Gastuche // Suisse
36 Aloe vera déshydraté // Mes Zépices	Mes Zépices, site Internet // Thaïlande
37 Galettes de riz // Everyday	Colruyt, Grez-Doiceau // Belgique
38 Crackers hot // Becky's	Action, Perwez // Thaïlande
39 Mangues séchées // Jama fruits	Action, Perwez // Burkina Faso

3 Détection de souches de *B. cytotoxicus*

La détection des souches de *B. cytotoxicus* dans les échantillons alimentaires se réalise en suivant un déroulement en 5 étapes (Fig. III.1).

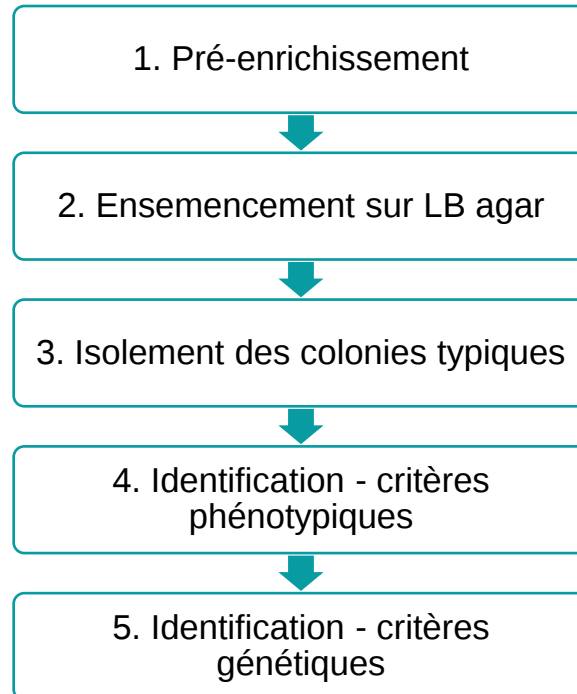


Figure III.1 - Organigramme reprenant les 5 étapes pour détecter les souches de *B. cytotoxicus* dans un échantillon.

3.1 Pré-enrichissement

L'aliment à analyser est mélangé à l'aide d'une cuillère stérilisée et 10g sont transférés dans un sac stomacher stérile muni d'un filtre latéral (VWR). L'échantillonnage s'effectue en prélevant au minimum à 5 endroits différents dans l'emballage afin d'obtenir un échantillon représentatif. Afin d'obtenir un inoculum liquide, 90g d'EPT sont ajoutés au 10g d'aliment. Le sac stomacher, renfermant ainsi la première dilution de l'aliment, est placé deux fois pendant 30 sec dans un Star Blender LB400 Stomacher (VWR) afin de mélanger et d'homogénéiser son contenu. Pour certains échantillons, une pipette sérologique stérile (Sarstedt) est introduite dans le sac stomacher du côté du filtre et 10ml de la suspension y sont aspirés pour être ensuite transférés dans un tube à essai stérile. Ce dernier est ensuite placé dans un bain marie à 80°C pendant 10min. Ce traitement thermique a pour but de réduire la flore végétative accompagnatrice et de stimuler la germination des spores bactériennes. Pour finir, le sac stomacher, ainsi que le tube traité thermiquement lorsqu'il est présent, sont incubés dans une étuve bactériologique (Binder) pendant 24h à 50°C, température qui fait de ce pré-enrichissement une étape sélective pour les souches de *B. cytotoxicus* (Contzen *et al.*, 2014).

3.2 Ensemencement

Après les 24h de pré-enrichissement, le sac stomacher est placé dans un Star Blender LB400 Stomacher (VWR) pendant 30 sec et le tube traité thermiquement est vortexé (Velp Scientifica) durant environ 10 sec. Comme décrit sur la Fig. III.2, des dilutions décimales sont faites dans du Ringer ¼ à partir des suspensions mères et sont étalées sur LB agar grâce à des étaleurs stériles (Sarstedt). L'étalement est réalisé en double, une série de boîtes de Pétri est incubée à 37°C tandis que l'autre série est incubée à 50°C.

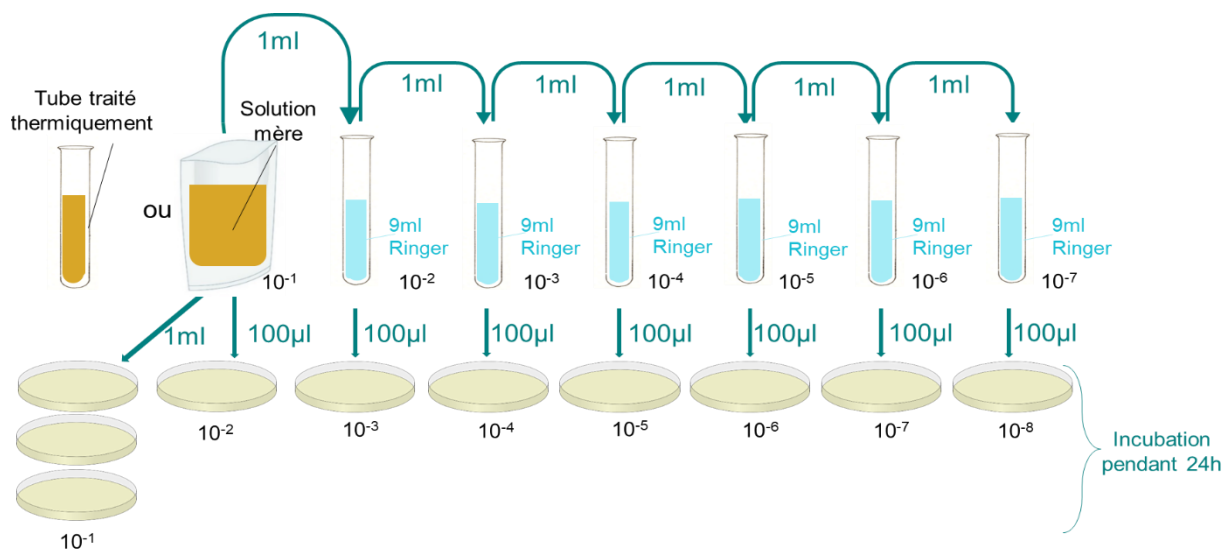


Figure III.2 - Dilutions et ensemencement sur le milieu LB.

3.3 Isolement

Une fois sorties des incubateurs, les boîtes de Pétri sont observées pour détecter une ou des colonies aux caractéristiques typiques de *B. cereus*, c'est-à-dire des colonies plates, d'aspects beige et mat. Si de telles colonies sont présentes, une à cinq d'entre elles sont sélectionnées par température et par traitement. Chaque colonie est striée selon la méthode quatre quarts sur deux boîtes de Pétri contenant de la gélose LB, l'une étant incubée à 37°C et l'autre à 50°C, et ce pendant une nuit. Si leur phénotype est encore caractéristique de *B. cereus* après une nuit, les colonies incubées à 37°C sont ensuite restriées sur du LB agar et incubées à 50°C.

3.4 Identification sur base de critères phénotypiques

Les souches thermotolérantes isolées vont également être striées sur le milieu MYP incubé à 37°C et à 50°C, afin de vérifier qu'elles ne fermentent pas le mannitol et pour voir si elles possèdent une activité lécithinase. Ces *B. cytotoxicus* présumptifs sont également repiqués sur la gélose au sang frais de mouton et incubés une nuit à 37°C pour évaluer leur activité hémolytique. Si ces deux autres moyens d'identification confortent l'hypothèse qu'il s'agit de souches de *B. cytotoxicus* présumptifs, ces dernières sont conservées dans des microtubes à vis de 1,5 ml (Sarstedt) contenant

un mélange de 30% de glycérol (Merck), présent en tant que cryoprotecteur, et 70% de LB liquide (Sigma-Aldrich) dans un congélateur (Sanyo) à -80°C.

3.5 Identification sur base de critères génétiques

3.5.1 Détection de gènes par le biais de PCR

La détection de gènes constitue un moyen de caractérisation supplémentaire des souches suspectes isolées à partir des échantillons. En effet, elle permet de détecter le gène *cytK-1*, qui est caractéristique des souches de *B. cytotoxicus*. Lorsqu'il s'avère qu'une souche possède le gène de la cytotoxine K-1, la présence des déterminants génétiques du céréulide et celle du gène de la cytotoxine K-2 sont aussi vérifiées. À ce jour, *ces* et *cytK-2* ne sont pas connus pour se trouver chez *B. cytotoxicus* et on s'attend ainsi à ne pas les détecter chez les souches *cytK-1* positives.

Principe de la détection

La PCR est une méthode d'amplification *in vitro* d'un fragment d'ADN ciblé. Ce fragment est multiplié de façon spécifique grâce à des amorces complémentaires à la séquence à répliquer. La réaction est effectuée par des répétitions cycliques de trois étapes : la dénaturation de la double hélice d'ADN en deux simples brins sous l'effet de la chaleur ; l'hybridation des amorces aux extrémités de la séquence cible, suite à une baisse de la température ; et enfin, la synthèse d'une copie du fragment d'intérêt grâce à une polymérase thermorésistante. Une fois la PCR terminée, on obtient une quantité d'ADN suffisante que pour être placée dans un gel d'électrophorèse, permettant de visualiser le résultat.

Réalisation des PCR

Pour effectuer une PCR, il est nécessaire de préparer, pour chaque souche, un microtube contenant un mélange réactionnel dans lequel se trouve une certaine quantité d'ADN de la souche (Tableau III.8). Pour obtenir cet ADN bactérien, une colonie fraîche venant d'une culture sur gélose LB datant de la veille est suspendue dans 50µl d'eau miliQ stérile. Les différentes amorces utilisées, ainsi que les souches de référence servant de contrôles positifs, sont indiquées dans le Tableau III.9.

Tableau III.8 - Composition de 25 µl de mélange réactionnel pour détecter *ces*, *cytK-1* et *cytK-2*.

Composants	Volume (µl)
H ₂ O miliQ stérile	9
Go Taq buffer 5x	5
dNTPs 2 mM	2,5
MgCl ₂ 25 mM	1,5
Go Taq polymérase	0,125
Amorce F 10µM	2,5
Amorce R 10µM	2,5
ADN	2

Tableau III.9 - Amorces et souches de références utilisées pour les PCR (Guinebretière *et al.*, 2006; Ehling-Schulz *et al.*, 2005; Ehling-Schulz *et al.*, 2004b).

Gène	Amorces	Séquences (5' → 3')	Taille du fragment	Souches de référence
cyt-K1	CK1F	CAATTCCAGGGGCAAGTGTC	426 pb	NVH391-98 (<i>B. cytotoxicus</i>)
	CK1R	CCTCGTGCATCTGTTTCATGAG		
cyt-K2	CK2F	CAATCCCTGGCGCTAGTGCA	585 pb	ATCC 14579 (<i>B. cereus</i>)
	CK2R	GTGIAGCCTGGACGAAGTTGG		
ces	CesF1	GGTGACACATTATCATATAAGGTG	1272 pb	Kinrooi 5975c (<i>B. cereus</i>)
	CesR2	GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA		
ces	EM1F	GACAAGAGAAATTTCTACGAGCAAGTACAAT	635 pb	Kinrooi 5975c (<i>B. cereus</i>)
	EM1R	GCAGCCTTCCAATTACTCCTTCTGCCACAGT		

Lorsque tous les microtubes sont prêts, y compris celui du contrôle positif et celui du contrôle négatif, ils sont placés dans un thermocycleur (Bio-Rad), soit dans le modèle T100 thermal cycler, soit dans le modèle C1000 thermal cycler. Le thermocycleur est alors programmé pour exécuter les divers cycles temps-températures nécessaires à la réalisation de la PCR. En fonction des amorces employées pour la PCR, les programmes varient légèrement, chacun étant repris dans le Tableau III.10.

Tableau III.10 - Programmes PCR pour la détection de *cytK-1*, *cytK-2* et *ces*.

Couple(s) d'amorces	Étape	Température (°C)	Durée	Nombre de cycle
CK1F - CK1R	Dénaturation initiale	94°C	5'	30x
		94°C	30''	
	Amplification	61°C	30''	
		72°C	1'	
	Élongation finale	72°C	5'	
	Conservation	10°C	∞	
CK2F - CK2R	Dénaturation initiale	94°C	5'	30x
		94°C	30''	
	Amplification	57°C	30''	
		72°C	1'	
	Élongation finale	72°C	5'	
	Conservation	10°C	∞	
CesF1 - CesR2 et EM1F - EM1R	Dénaturation initiale	94°C	5'	30x
		94°C	1'	
	Amplification	60°C	1'	
		72°C	1'	
	Élongation finale	72°C	5'	
	Conservation	10°C	∞	

Électrophorèse sur gel

Les produits PCR sont analysés à l'aide d'une électrophorèse sur gel qui permet de mettre en évidence l'amplification de la séquence ciblée. Cette technique permet de séparer les fragments d'ADN en fonction de leurs poids moléculaires, et ce via l'application d'un champ électrique. Le gel est préparé en diluant 0,8% d'agarose (ChemCruz) dans le tampon TAE 0,5x. La solution est ensuite portée à ébullition pour assurer la dissolution de l'agarose. Après un refroidissement jusqu'à environ 50°C, 5µl de bromure d'éthidium (BET) (solution stock de 10mg/ml) sont ajoutés pour 100ml de solution. Le BET est un agent qui complexe l'ADN et permet à ce dernier d'émettre dans le rose lorsque soumis à une lumière UV. Après agitation, la solution est versée dans un moule où un peigne est ajouté pour former les puits de charge. Le gel solidifié

est alors placé dans une cuve d'électrophorèse Mupid©One (Advance) contenant du TAE-BET. Le premier puits sert d'échelle de mesure de poids moléculaire et est rempli par 2µl de smartladder (Eurogentec). Des mélanges de 5µl de produit PCR et 1µl de tampon de charge sont placés dans les puits suivants. Le tampon de charge utilisé est une solution 6x concentrée de bleu de bromophénol et de saccharose, dans les proportions suivantes : 0,25% (w/v) de bleu de bromophénol et 40% (w/v) de saccharose. Après une migration de 30min à 100V, les ADN sont révélés sous UV (Gel Doc XR, Bio-Rad). Les photos des gels sont traitées avec le logiciel Quantity One.

3.5.2 Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

Les souches identifiées comme *B. cytotoxicus* avec les résultats PCR sont soumises à une étape supplémentaire de caractérisation, la RAPD. Elle est employée pour évaluer la diversité génétique des souches et vérifier si certaines d'entre elles sont clonales. La RAPD est, du point de vue de la réalisation, très similaire à la PCR, mais constitue une variante de cette dernière car une seule amorce, non spécifique et d'environ dix nucléotides, est utilisée. L'amplification s'effectue ainsi de manière aléatoire sur le génome. OPA2, OPA3, OPA9, OPA10 et PM13 sont les cinq amorces qui ont été utilisées. Leurs séquences respectives se trouvent dans le Tableau III.11. La composition du mélange réactionnel, préparé dans un tube (Sarstedt) à l'aide de pointes de pipettes à filtre (Sarstedt) labelisés Biosphere®plus, est reprise dans le Tableau III.12 et le programme du thermocycleur dans le Tableau III.13. L'électrophorèse est réalisée sur un gel d'agarose à 1,2% pour les amorces OPA, et à 2% pour l'amorce PM13. Pour la RAPD, un mélange de 10 µl de produit PCR et 2 µl de tampon de charge est placé dans les puits et le temps de migration est de 45min à 100V.

Tableau III.11 – Amorces utilisées dans le cadre des RAPD (Hu *et al.*, 2004 ; Henderson *et al.*, 1994).

Amorce	Séquence (5' → 3')
OPA2	TGCCGAGCTG
OPA3	AGTCAGCCAC
OPA9	GGGTAACGCC
OPA10	GTGATCGCAG
PM13	GAGGGTGGCGGCTCT

Tableau III.12 - Composition de 20 µl de mélange réactionnel pour RAPD.

Composants	Volume (µl)
H ₂ O miliQ stérile	7
Go Taq buffer 5x	4
dNTPs 2 mM	2
MgCl ₂ 25 mM	1
Go Taq polymérase	0,1
Amorce 10µM	5
ADN	1

Tableau III.13 - Programme PCR pour la RAPD.

Amorce(s)	Étape	Température (°C)	Durée	Nombre de cycle
OPA2, OPA3, OPA9 et OPA10	Dénaturation initiale	95°C	5'	45x
	Amplification	95°C	5''	
		32°C	1'	
		72°C	2'	
	Élongation finale	72°C	7'	
	Conservation	10°C	∞	
PM13	Dénaturation initiale	95°C	3'	35x
	Amplification	95°C	1'	
		40°C	1'	
		72°C	8'	
	Élongation finale	72°C	16'	
	Conservation	10°C	∞	

4 Suivi du développement de *B. cytotoxicus* dans des aliments cuisinés

Les flocons et poudres de pommes de terre destinés à préparer de la purée sont un type de produits connu pour être souvent contaminé par *B. cytotoxicus* (Contzen *et al.*, 2014). Dans un premier temps, le niveau de contamination des flocons de pommes de terre (n°1 dans le Tableau III.7) est évalué avant préparation, soit directement dans le produit brut. Ensuite, afin d'évaluer le développement de *B. cytotoxicus* dans cette matrice alimentaire, le niveau de contamination est également évalué après préparation de la purée, et ce sur une période de deux jours. Finalement, en plus de confectionner et de conserver la purée dans des conditions qualifiées de domestiques, elle est également préparée avec des flocons stérilisés et inoculés avec des spores de *B. cytotoxicus* dans le but de suivre le développement de ce bacille sans la présence d'une quelconque flore accompagnatrice.

Cette expérimentation n'est pas effectuée uniquement pour les flocons de pommes de terre, elle l'est aussi pour la soupe instantanée Saint-Germain de Royco (n°13 dans le Tableau III.7). En effet, comme cela sera mentionné ultérieurement dans les résultats, il s'agit d'un produit où des *B. cytotoxicus* ont été détectés suite à l'exécution des étapes reprises dans la section III.3, et c'est un produit nécessitant également une préparation avant d'être consommé et pour lequel un suivi peut être réalisé.

4.1 Évaluation de la charge initiale en *B. cytotoxicus* dans les produits

La détection des souches dans les échantillons comme décrit dans le point III.3 a eu lieu suite à un pré-enrichissement et constitue ainsi une approche qualitative qui ne permet pas de déterminer la charge en *B. cytotoxicus* initialement présente dans le produit. Afin de déterminer ce niveau initial, une approche quantitative a été effectuée pour les flocons de pommes de terre et pour la soupe instantanée en poudre.

Une série de dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-5} est réalisée à partir de l'aliment qui se présente sous forme de poudre ou de flocons et ces dilutions seront étalées sur de la gélose MYP (Fig III.3) grâce à des étaleurs stériles (Sarstedt). La première dilution est homogénéisée deux fois pendant 30 sec à l'aide d'un Star Blender LB400 Stomacher (VWR) et les tubes à essai le sont à l'aide d'un vortex (Velp Scientifica).

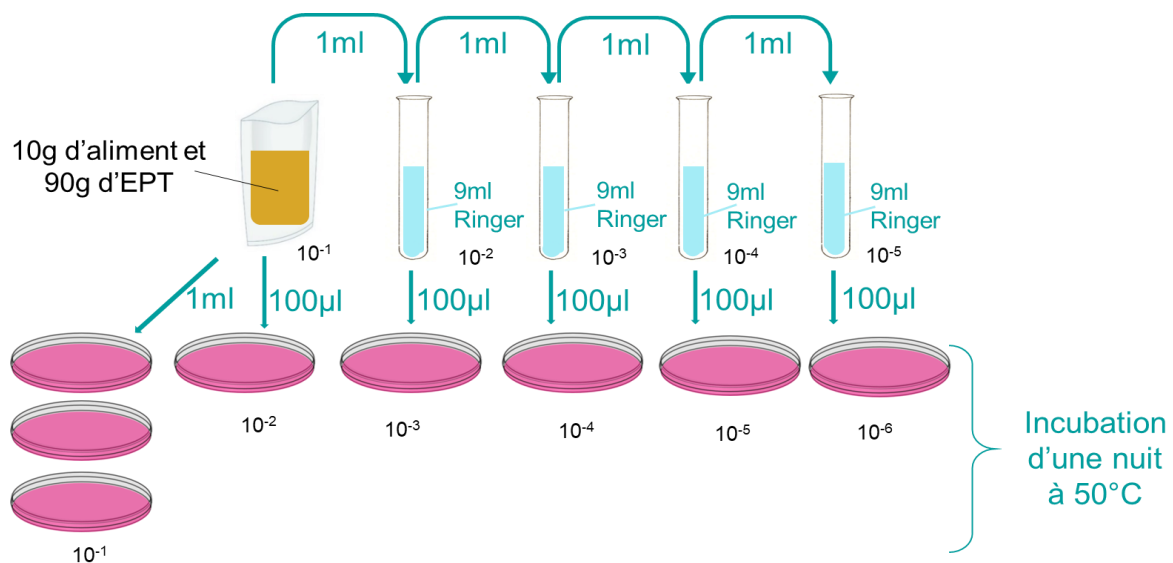


Figure III.3 - Dilutions et ensemencement sur milieu MYP.

Après l'incubation dans une étuve bactériologique (Binder), la charge en *B. cytotoxicus* est déterminée en comptant le nombre de colonie(s) aux caractéristiques typiques de *B. cereus*, c'est-à-dire des colonies plates, d'aspects beige et mat.

4.2 Suivi d'aliments préparés en imitant des conditions domestiques

Les suivis sont réalisés pour la purée de pommes de terre ainsi que pour la soupe instantanée Saint-Germain et s'effectuent en suivant les étapes décrites ci-après :

1. Préparation de l'aliment en suivant les indications données par le fabricant sur l'emballage du produit (Annexe A) en utilisant de l'eau venant du robinet et chauffée jusqu'à ébullition. L'homogénéisation du produit et de l'eau, à l'aide d'une cuillère préalablement stérilisée, est réalisée jusqu'à obtention de l'hydratation de la totalité de la poudre ou des flocons. Ce moment où la préparation de l'aliment est finie entraîne directement l'étape 2 et est appelé H0.

2. Ensemencement des dilutions réalisées à partir de l'aliment préparé en vue d'y déterminer la charge en *B. cytotoxicus*. Cette étape consiste à prendre 10g d'aliment préalablement mélangé avec une cuillère stérile et de les placer dans un sac stomacher avec filtre latéral (VWR) où 90g d'EPT sont ajoutés. Le tout est homogénéisé deux fois 30 sec dans un Star Blender LB400 Stomacher (VWR). 10ml sont prélevés et introduits dans un tube à essai stérile, qui est ensuite traité thermiquement à 80°C pendant 10 min. À partir des deux solutions mères que sont le sac stomacher et le tube à essai, des séries de dilutions sont réalisées et étalées sur des boîtes de Pétri contenant de gélose MYP, boîtes ensuite incubées à 50°C pendant une nuit (Fig. III.4).

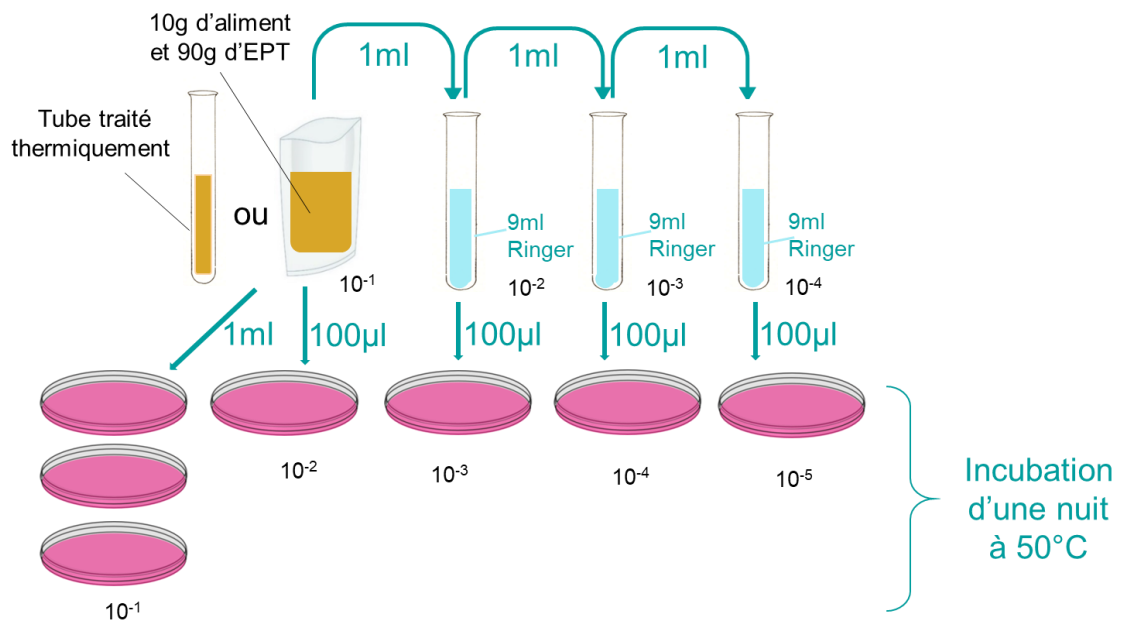


Figure III.4 - Dilutions et ensemencement sur le milieu MYP.

3. Incubation de la purée préparée ou de la soupe préparée dans une étuve bactériologique (Ovan) à 20°C, température fixée comme température ambiante, afin de reproduire les conditions d'un oubli de mise au réfrigérateur.
4. Détermination du nombre de *B. cytotoxicus* sur les boîtes de Pétri après leur nuit passée à l'incubateur. Elle est réalisée grâce au comptage des CFU ayant une couleur rose caractéristique et éventuellement entourée d'un halo blanc sur MYP.
5. Les étapes 2 à 4 sont également reproduites à 6, 24 et 48h après la préparation de l'aliment (moments respectivement notés H6, H24 et H48).

Cette expérimentation en 5 étapes est répétée plusieurs fois dans les mêmes conditions, trois fois pour la soupe et quatre fois pour la purée.

4.3 Suivi d'aliments stérilisés et inoculés avec des spores

Afin d'évaluer le développement de *B. cytotoxicus* dans l'aliment préparé lorsque ce bacille constitue la seule contamination initialement présente dans la soupe en poudre et dans les flocons de pommes de terre, ces dernières matrices sont stérilisées et ensuite inoculées avec une certaine concentration de spores avant d'être préparées. La mise en œuvre de ce suivi est possible suite à la réalisation de deux étapes principales, la production de suspensions de spores et la préparation des matrices alimentaires stérilisées et inoculées avec ces spores.

4.3.1 Préparations et énumérations de la charge des suspensions de spores

Des spores ont été produites pour quatre souches différentes, la souche de référence de *B. cereus*, ATCC 14579, la souche de référence de *B. cytotoxicus*, NVH391-98, une souche *cytK-1* positive isolée dans les flocons de pommes de terre Delhaize (ligne n°1 dans le Tableau III.7), et une souche *cytK-1* positive détectée dans la soupe instantanée Saint-Germain de Royco (ligne n°13 dans le Tableau III.7).

Pour chaque souche, la préparation et l'énumération de la charge des suspensions s'effectuent en suivant les étapes décrites ci-dessous :

1. Suspension d'une colonie fraîche venant d'une culture sur gélose LB datant de la veille dans un Erlenmeyer (Pyrex) contenant 25ml de milieu PA stérile.
2. Fermeture des Erlenmeyers à l'aide de bouchon de cellulose recouvert d'une couche d'aluminium.
3. Incubation de la suspension dans un agitateur incubateur (GLF) à 37°C sous une agitation de 120 tours par minute.
4. Transfert de la suspension de spores dans des tubes à vis (Sarstedt) de 50ml après 7 jours d'incubation telle que décrit en 3.
5. Centrifugation du Falcon 15min à 4000 tours par min dans une centrifugeuse 2-16KL (Sigma).
6. Lavage du culot avec 25ml de solution Ringer au ¼.
7. Réalisation de deux répétitions supplémentaires des opérations 5 et 6.
8. Dilutions de la suspension de spores et ensemencement sur de la gélose LB comme représenté sur la Fig. III.5. Le transfert d'une solution vers le tube à essai de la dilution suivante s'effectue grâce à des pipettes sérologiques stériles (Sarstedt) et l'étalement sur la gélose est réalisé à l'aide d'étaleurs stériles (Sarstedt).

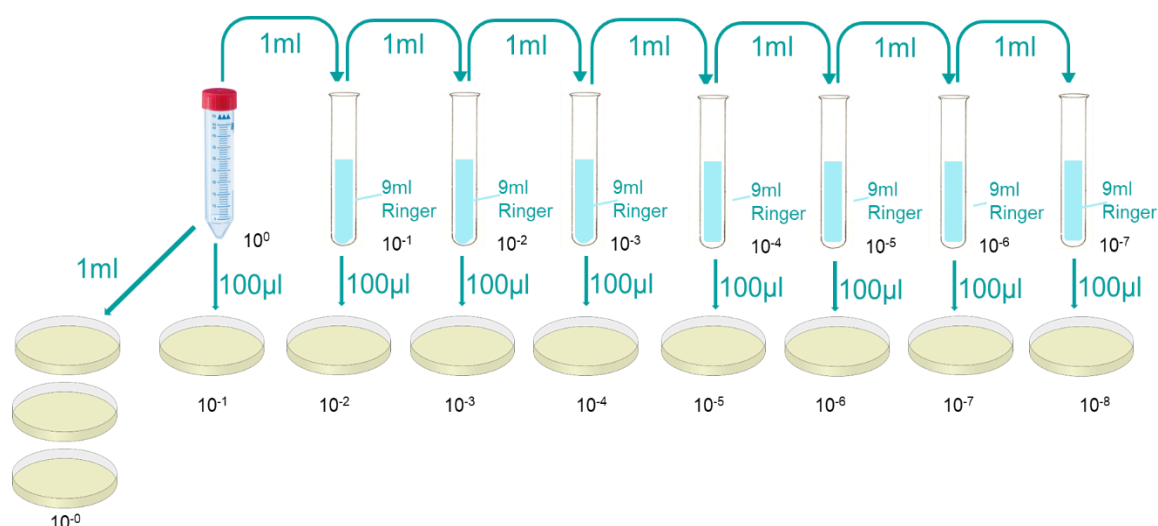


Figure III.5 – Dilutions et ensemencements de la suspension de spores.

9. Dilution de la suspension de spores et ensemencement sur de la gélose LB en suivant le même mode opératoire que celui présenté dans le point 8 à quelques différences près : le tube à essai contenant la dilution 10⁻¹ est traité thermiquement à 80°C pendant 10min pour éliminer les cellules végétatives ; ce dernier sert à préparer les dilutions suivantes ; l'étalement sur boîte de Pétri est ainsi uniquement réalisé pour les tubes à essai, la détection étant donc possible à partir de 100 CFU/ml.
10. Incubation des boîtes de Pétri ensemencées au point 8 et 9. S'il s'agit des boîtes de Pétri résultant de l'ensemencement de la suspension de spores d'ATCC 14579, elles sont incubées dans une étuve bactériologique (Memmert) pendant une nuit à 30°C alors que celles résultant de l'ensemencement des suspensions de spores des trois autres souches sont incubées dans une étuve bactériologique (Binder) pendant une nuit à 37°C.
11. Stockage de la suspension de spores dans un réfrigérateur à 4°C.
12. Dénombrement du nombre total de CFU par ml en comptant les colonies présentes sur les boîtes de Pétri ensemencées et incubées comme décrit dans les points 8 et 10.
13. Dénombrement du nombre total de spores par ml en comptant les colonies présentes sur les boîtes de Pétri ensemencées et incubées comme décrit dans les points 9 et 10.

Afin de s'assurer de la stabilité des suspensions de spores formées, d'autres énumérations du nombre total de CFU par ml et du nombre de spores par ml ont lieu après 3 jours et 10 jours de réfrigération. Pour ce faire, les étapes 8 à 13 du protocole ci-dessus sont reproduites, et ce pour les quatre suspensions de spores des quatre souches.

Outre la stabilité, trois jours après réfrigération des suspensions, la thermorésistance des spores est également testée. Pour ce faire, pour chaque suspension, quatre tubes à essai contenant chacun 9ml de Ringer au $\frac{1}{4}$ et 1ml de la suspension, soit correspondants à la dilution 10^{-1} , sont préparés. Les quatre tubes à essai préparés à partir d'une même suspension subissent chacun un traitement thermique différent, l'un est placé pendant 10min dans un bain marie à 85°C , un autre à 90°C , le troisième à 95°C et enfin le dernier à 100°C . Quatre séries de dilutions allant chacune jusque 10^{-7} sont réalisées à partir des quatre tubes à essais et 100 μl de chaque dilution est étalée sur milieu LB agar. Les boîtes de Pétri sont incubées une nuit à 37°C et les colonies dénombrées le lendemain.

4.3.2 Préparation des aliments stérilisés et inoculés avec des spores

Pour chaque aliment, les flocons de pommes de terre et la soupe en poudre, la préparation et le suivi du développement de *B. cytotoxicus* dans la matrice alimentaire s'effectuent en suivant les étapes décrites ci-dessous :

1. Stérilisation de deux Berlin contenant la même masse de l'aliment, tous deux recouverts d'aluminium. La stérilisation est effectuée à 121°C durant 15min dans un autoclave 2540 ML (Tuttnauer).
2. Transfert de l'aliment contenu dans un des Berlin dans un sac stomacher.
3. Inoculation, des aliments contenus dans le sac stomacher et dans le tricorné, avec la suspension de spores préparée à partir de la souche *cytK-1* positive isolée depuis ce même aliment. La concentration inoculée est identique à celle présente initialement dans le produit, concentration déterminée suite au protocole du point 4.1 de ce chapitre III. Cette concentration est obtenue grâce à une dilution appropriée de la suspension de spores dans du Ringer au $\frac{1}{4}$.
4. Dénombrement de *B. cytotoxicus* dans l'aliment inoculé mais non préparé afin de s'assurer de l'efficacité de l'inoculation. Une quantité d'EPT 9 fois supérieure à la masse contenue dans le sac stomacher y est ajoutée. Le sac stomacher est placé deux fois 30 sec dans un Star Blender LB400 Stomacher (VWR). À partir de cette solution mère contenue dans le sac stomacher, une série de dilutions allant jusqu'à 10^{-4} est réalisée et ces dilutions sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant de gélose LB. Les boîtes sont ensuite incubées à 50°C pendant une nuit, nuit après laquelle les colonies de *B. cytotoxicus* développées sur les boîtes sont comptées.
5. Exécution des étapes 1 à 5 du protocole de la section 4.2 de ce chapitre III à partir du deuxième Berlin contenant l'aliment stérilisé et inoculé décrit en 1 et 3 ci-dessus. Les étapes sont identiques, excepté deux changements : l'eau du robinet utilisée est préalablement autoclavée ; le milieu sur lequel sont étalées les dilutions est du LB agar et non du MYP.
6. Répétition des étapes 1 à 5 mais où l'inoculation décrite dans le point 3 s'effectue avec la solution de spores de NVH391-98, la souche de référence.

4.3.3 Séquençage partiel d'ADN ribosomal 16S

Dans le cadre de certains dénombrements de suspensions de spores ou d'aliments stérilisés et inoculés avec des spores, il est arrivé que plusieurs phénotypes soient observés sur milieu LB. Afin de s'assurer qu'il s'agisse de *B. cytotoxicus*, l'identification de ces souches est vérifiée par le séquençage partiel de l'ADN ribosomal 16S. Ce séquençage fait suite à une PCR qui amplifie les fragments d'ADN des souches. La composition des 50 µl de milieu réactionnel de la PCR et les séquences des amorces utilisées sont respectivement reprises dans les Tableaux III.14 et III.15.

Tableau III.14 - Composition de 50 µl de mélange réactionnel pour RAPD.

Composants	Volume (µl)
H ₂ O miliQ stérile	21
Go Taq buffer 5x	10
dNTPs 2 mM	5
MgCl ₂ 25 mM	3
Go Taq polymérase	0,25
Amorce F 10µM	5
Amorce R 10µM	5
ADN	1

Tableau III.15 – Amorces utilisées pour l'amplification de fragments d'ADNr 16S (Chen *et al.*, 2015)

Amorce	Séquence (5' → 3')
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT

Les échantillons sont placés dans un thermocycleur modèle T100 thermal cycler (Bio-Rad) et subissent des cycles tels que détaillés dans le Tableau III.16.

Tableau III.16 - Cycle de température utilisé pour la PCR d'amplification de l'ADNr 16S.

Étape	Température (°C)	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	95°C	5'	
Amplification	95°C	1'	30x
	52°C	1'	
	72°C	1'	
Élongation finale	72°C	10'	
Conservation	10°C	∞	

Une fois la PCR terminée, l'ADN contenu dans le produit PCR est purifié grâce au GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich). Le séquençage en double sens est ensuite réalisé par la société MacroGen Europe et après traitement, les séquences sont alignées par le programme « BLAST » sur le site web NCBI.

IV RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats et discussion sont présentés en deux parties. Tout d'abord, l'isolement de souches de *B. cytotoxicus* dans des matrices alimentaires et ensuite, le développement de ces souches dans l'aliment si celui-ci n'est pas consommé tel que vendu, mais nécessite une étape de préparation.

1 Isolement et identification de souches de *B. cytotoxicus*

Quatre produits parmi les 39 analysés, soit environ 10%, contenaient des *B. cytotoxicus* après pré-enrichissement. L'identification des souches isolées a été effectuée en premier lieu grâce à certaines caractéristiques phénotypiques et confirmée ensuite par une caractéristique génétique typique. En effet, grâce à l'ensemencement fait à partir d'une solution mère pré-enrichie à 50°C pendant 24h, à l'isolation des colonies sur base de critères phénotypiques, ainsi qu'à l'utilisation d'analyse PCR pour détecter le gène *cytK-1*, l'identification des souches thermotolérantes de *B. cytotoxicus* est réalisée avec spécificité.

1.1 Origine des souches de *B. cytotoxicus* isolées

B. cytotoxicus a été isolé à partir de deux types de flocons destinés à préparer de la purée de pommes de terre. Les deux produits (n° 1 et 2 dans le Tableau III.7) sont vendus par Delhaize mais l'un est commercialisé sous la marque classique du groupe alors que l'autre appartient à la gamme 365. De plus, la présence de *B. cytotoxicus* a également été détectée dans des chips TUC crisp produits par LU, ainsi que dans de la soupe instantanée saveur Saint-Germain crunchy de la marque Royco (respectivement n° 8 et 13 dans le Tableau III.7). Les compositions de ces aliments figurent dans le Tableau IV.1. Afin de vérifier si la présence de *B. cytotoxicus* dans les produits était due à un événement isolé ou si elle était récurrente, ils ont été testés deux fois chacun. C'est-à-dire qu'un deuxième emballage du même produit mais fabriqué à une date différente, numéro du lot et date de péremption faisant foi, a également été analysé. Cette deuxième analyse, qui a été positive dans tous les cas, a confirmé que la première détection n'était apparemment pas un cas isolé et que des souches de *B. cytotoxicus* pouvaient être trouvées dans des produits identiques mais produits à des moments différents dans l'année.

Tableau IV.1 – Composition des produits à partir desquels *B. cytotoxicus* a été isolé.

Aliment // Marque	Ingrédients
Purée nature // 365 - Delhaize	Pommes de terre, émulsifiant : mono- et diglicérides d'acides gras, stabilisant : diphosphate disodique, curcuma, antioxydant : palmitate d'ascorbyle - acide citrique.
Purée de pommes de terre // Delhaize	Pommes de terre 92 %, lait en poudre écrémé 3,9 %, sel iodé, émulsifiant : mono- et diglicérides d'acides gras, stabilisant : diphosphate disodique, aromates, curcuma, antioxydant : palmitate d'ascorbyle.
TUC crisp finely salted // LU	Flocons de pomme de terre 56% (contient des sulfites), amidon de maïs, huile de tournesol, farine de blé, lactose (de lait), sucre, fibres d'avoine, huile de colza, poudres à lever (phosphates de calcium, carbonate acide de sodium), émulsifiant (lécithine de soja), arôme, sel de mer 0,84%, protéines de lait, correcteur d'acidité (acide citrique). Peut contenir de l'œuf.
Soupe instantanée Saint-Germain crunchy // Royco	Ingrédients après préparation avec 200ml d'eau : Eau, petit pois 18%, pomme de terre, légumes (oignon, épinards, poireau, céleri à couper), sirop de glucose, amidon de pomme de terre, graisse de palme, croûtons 0,6% (farine de blé, graisse de palme, sel, levures, antioxydant : extrait de romarin), arômes (contient de l'orge et du lait), sel, exhausteurs de goût : E508, E621, E627 et E631, morceaux de jambon 0,1% (viande de porc, graisse de palme, sel, conservateur : E250, antioxydants : E310, E320 et E330), curcuma, arôme de fumée, lactose, protéines de lait, émulsifiant : E471, stabilisant : E450. Peut contenir des traces de soja.

À partir de ces quatre produits, 23 souches de *B. cytotoxicus* ont été isolées au total (Tableau IV.2). Lors de l'analyse de certains des 39 produits, un tube à essai contenant 10ml de la solution mère a subi un traitement thermique de 10min à 80°C, ces 10ml ont ensuite été pré-enrichis et utilisés pour réaliser une série de dilutions ensemencées sur milieu gélosé. Cette étape supplémentaire était effectuée dans l'optique d'obtenir une détection de *B. cytotoxicus* potentiellement plus aisée, en stimulant la germination des spores tout en éliminant les cellules végétatives, et donc une grande partie de la flore accompagnatrice. Néanmoins, en pratique, elle n'a pas participé à une détection facilitée. En effet, les échantillons avec ou sans traitement thermique d'un même produit ont montré des charges bactériennes totales similaires, caractérisées par des tapis bactériens sur boîte de Pétri allant généralement jusqu'à la dilution 10^{-5} . De plus, les produits où *B. cytotoxicus* a été découvert n'avaient pas été soumis à cette étape. Par conséquent, il est possible d'effectuer l'isolement de *B.*

cytotoxicus sans traitement thermique préalable au pré-enrichissement de l'échantillon.

Tableau IV.2 – Liste des noms donnés aux souches de *B. cytotoxicus* isolées.

Origine des souches		Noms
Purée nature		F365D11 à F365D15
Purée de pommes de terre		FD11 à FD15
TUC crisp finely salted	1 ^{er} lot	TC11 à TC14
	2 ^{ème} lot	TC21
Soupe instantanée Saint-Germain crunchy	1 ^{er} lot	RSG11 à RSG14
	2 ^{ème} lot	RSG21 à RSG24

La présence de *B. cytotoxicus* dans les deux types de flocons de pommes de terre ne s'est pas révélée être une surprise parce qu'au laboratoire MIAE, des analyses réalisées par Marcel Koné et portant sur 20 types de flocons différents y rapportent une prévalence de 100% de *B. cytotoxicus*. De plus, Contzen *et al.* (2014) avaient également obtenu une prévalence élevée, supérieure à 80% dans ce genre de produits. Pour les autres produits, sur 3 types de chips différents, seulement un contenait des souches de *B. cytotoxicus* et sur 5 types de soupes instantanées contenant de la pomme de terre, c'est également un seul type qui s'est avéré contenir *B. cytotoxicus*. En effet, après avoir détecté des souches dans la soupe Saint-Germain de Royco, une soupe instantanée aux tomates appartenant à la même gamme Royco, une soupe Saint-Germain mais de marque Menuto, ainsi que des soupes instantanées fabriquées à partir de produits issus de l'agriculture biologique, ont été analysées mais aucun *B. cytotoxicus* n'a pu y être trouvé.

Lors de ce mémoire, les produits dans lesquels des *B. cytotoxicus* ont été découverts appartiennent tous à la catégorie d'aliments contenant de la pomme de terre. En effet, aucun *B. cytotoxicus* n'a été détecté dans l'autre catégorie, celle reprenant les aliments sans pomme de terre mais, sous forme de poudre ou ayant subi une étape de traitement thermique.

Néanmoins, malgré ces résultats négatifs, plusieurs éléments intéressants peuvent être soulignés. En se référant à Guinebretière *et al.* (2013), on constate que des souches de *B. cytotoxicus* ont été isolées à partir d'autres produits déshydratés que ceux à base de pomme de terre, produits d'origine végétale, comme notamment des épices et de la semoule. Connaissant ce dernier élément, une attention toute particulière a ainsi été portée au curcuma, dénominateur commun entre trois des quatre aliments où *B. cytotoxicus* a été détecté lors de ce mémoire. Cette épice est effectivement présente dans les deux types de flocons ainsi que dans la soupe Saint-Germain. Bien qu'un faisceau de preuves important lie *B. cytotoxicus* aux produits à base de pomme de terre (Contzen *et al.*, 2014), il n'a pas été démontré formellement que cette dernière était la source de contamination et le curcuma, autre caractéristique

partagée par plusieurs produits contaminés, pourrait s'avérer être en cause. Un élément appuyant ce raisonnement est le fait que des *B. cereus* ont déjà été détectés dans le curcuma (Fogele *et al.*, 2018). Pour tester cette hypothèse, quatre curcumas différents ont été analysés. Après avoir obtenu des résultats négatifs pour ceux des marques Flavori et Delhaize, deux marques proposant des produits issus de l'agriculture biologique ont été testés mais encore une fois, *B. cytotoxicus* n'y fut pas trouvé. Par conséquent, aucun élément nouveau ne tend à impliquer le curcuma plutôt que la pomme de terre mais il était nécessaire de creuser cette piste pour s'en assurer.

Ainsi, toutes les informations tirées de nos analyses d'échantillons indiquent que la présence de *B. cytotoxicus* dans les aliments testés positivement semble liée à des produits déshydratés à base de pomme de terre ou fabriqués à partir de ceux-ci. Si l'on suppose que le sol en contact avec les pommes de terre constitue la niche écologique de *B. cytotoxicus*, on peut suggérer que cette espèce thermotolérante est présente dans les aliments déshydratés en raison de l'effet sélectif des traitements thermiques réalisés lors de la fabrication de ces denrées (Kakade *et al.*, 2011) ainsi que suite à l'absence de croissance bactérienne compétitive dans ces aliments grâce à leur faible activité en eau (Guinebretière *et al.*, 2008). En effet, les bactéries capables de former des spores qui les rendent résistants à la chaleur et à la dessiccation peuvent potentiellement survivre au processus de déshydratation, ce n'est pas le cas pour tous les microorganismes mais cela s'avère être valable pour *B. cytotoxicus* (Doan and Davidson, 2000).

1.2 Phénotypes des colonies isolées mises en culture sur milieux LB et MYP

L'isolement des souches a été possible grâce à une première étape qui consiste à identifier, sur milieu LB agar, les souches ayant un phénotype caractéristique de *B. cytotoxicus*, c'est-à-dire des colonies plates à bordure lisse ou irrégulière, de couleur beige, mate et de taille petite à moyenne (Fig. IV.1).

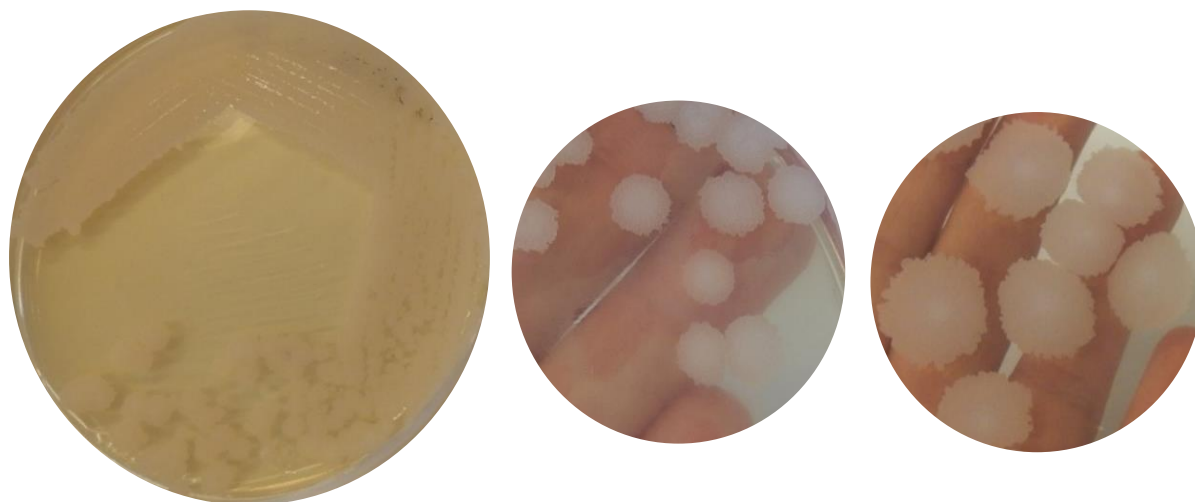


Figure IV.1 - Caractéristiques de la souche RSG22 isolée sur milieu LB à 37°C pendant 24h. Colonies rondes à bordure irrégulière de 5mm à 17mm de diamètre.

Lorsque les souches semblaient appartenir à l'espèce d'intérêt quand mise en culture sur LB, ces mêmes souches ont été placées sur milieu MYP, milieu supposé sélectif pour les *B. cereus*. Les 23 souches étaient de couleur rose sur MYP, couleur attestant qu'elles ne fermentaient pas le mannitol. Par contre, au niveau de l'activité lécithinase, des différences ont pu être notées entre les souches. En effet, certaines, comme celles isolées à partir du premier lot de soupe instantanée Saint-Germain de Royco (RSG11 à RSG14), étaient entourées d'un halo plus ou moins grand, indiquant la capacité des souches à dégrader la lécithine présente dans le milieu (Fig. IV.2). Outre ces quatre-là, seules FD11 et FD12 étaient entourées de ce halo caractéristique. Ainsi, seules 6 souches sur les 23 au total exprimaient l'activité lécithinase.

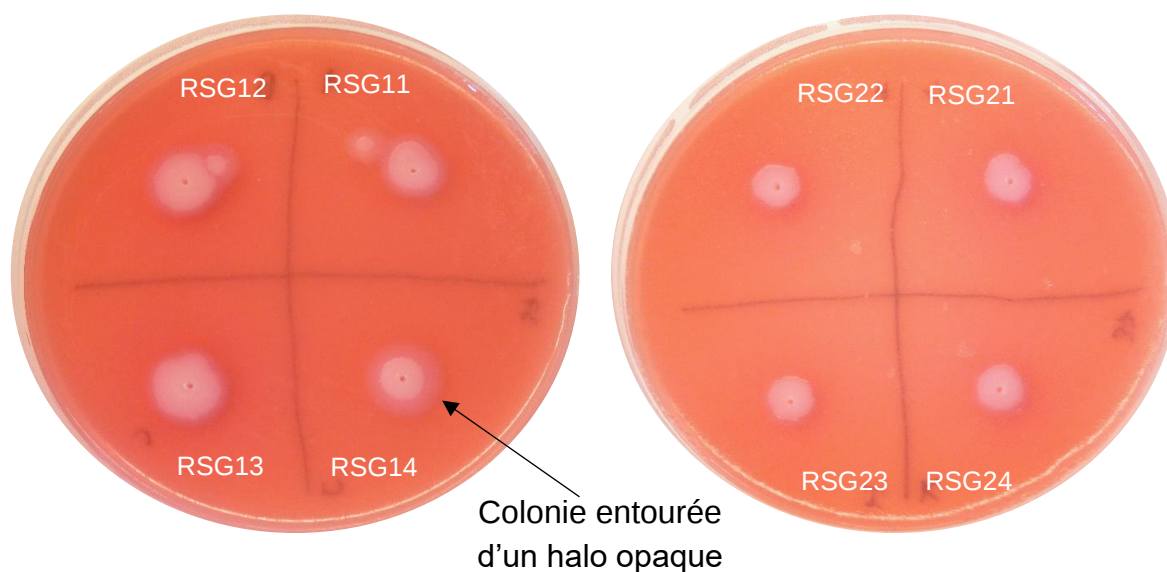


Figure IV.2 - Colonies de *B. cytotoxicus* mises en culture sur milieu MYP à 37°C.

Malgré ces observations, les souches lécithinase négative ont tout de même été considérées comme appartenant potentiellement à l'espèce *B. cytotoxicus* car comme déjà rapporté par le passé, ce critère ne semble pas fiable à 100% pour l'identification des souches. En effet, d'après Fricker *et al.* (2008), la souche NVH391-98 ne montre pas les caractéristiques d'une activité lécithinase sur MYP alors que selon Guinebretière *et al.* (2013), cette souche de référence exprime positivement ou faiblement cette activité sur le même milieu. Ainsi, il est nécessaire de se méfier de ce critère lors de l'identification et de garder en tête le fait que certaines souches de *B. cytotoxicus* sont atypiques lorsqu'il s'agit d'exhiber ou non l'activité lécithinase.

Une autre observation à propos des milieux, tant pour le LB que pour le MYP, est le fait que la température à laquelle sont incubées les boîtes de Pétri influence la morphologie des colonies. Pour les deux milieux, la plupart des colonies ont un diamètre légèrement supérieur lorsqu'incubées à 50°C plutôt qu'à 37°C. Il semble donc que la croissance est plus rapide à une température plus élevée. De plus, la morphologie des colonies sur le milieu MYP est radicalement différente entre les boîtes incubées à 37°C et les boîtes incubées à 50°C, elles ont un aspect filamenteux à 50°C qui n'est absolument pas visible à 37°C (Fig. IV.3).

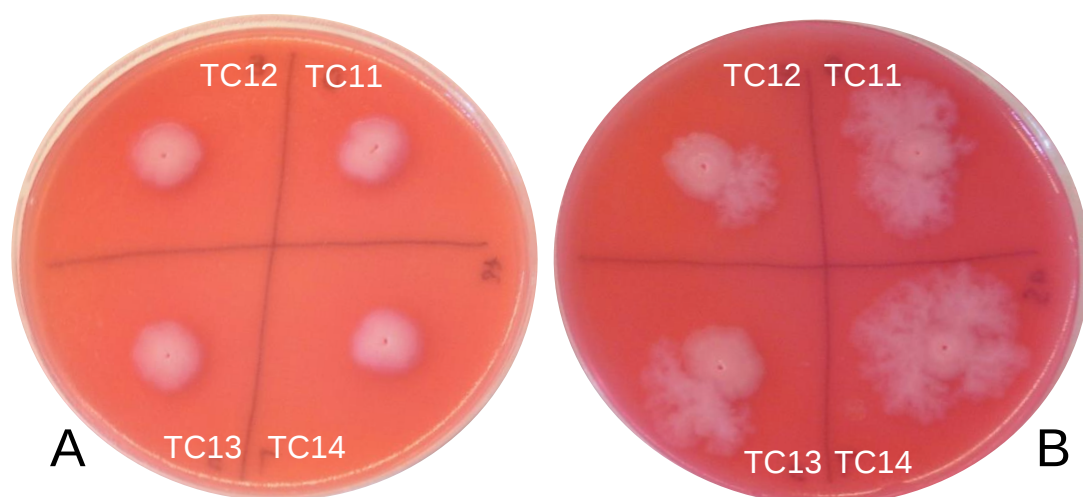


Figure IV.3 - Influence de la température sur l'aspect des colonies incubées à 37°C (A) et à 50°C (B).

1.3 Activité hémolytique

Les souches isolées possédaient toutes une activité hémolytique. À l'exception des souches du deuxième lot de soupe Saint-Germain dont l'hémolyse était de type α , toutes les autres souches présentaient une hémolyse β (Tableau IV.3 et Fig. IV.4).

Tableau IV.3 - Type d'hémolyse des souches isolées.

Hémolyse de type β	Hémolyse de type α
F365D11 à F365D15 ; FD11 à FD15 ; TC11 à TC14 ; TC21 ; RSG11 à RSG14	RSG21 à RSG24

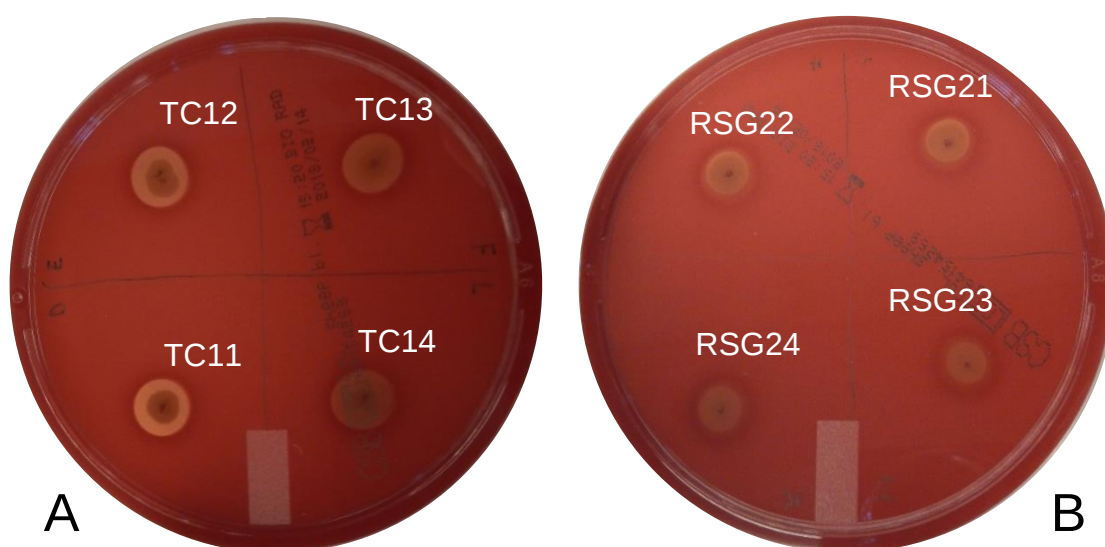


Figure IV.4 - Résultats du test d'hémolyse pour certaines souches, hémolyse β (A) et hémolyse α (B).

1.4 Détection des gènes de virulence

Afin de vérifier si les souches isolées étaient bien porteuses du gène *cytK-1*, caractéristique propre à l'espèce *B. cytotoxicus*, la détection de ce gène a été réalisée par PCR. Les résultats obtenus après l'amplification de *cytK-1*, à l'aide du couple d'amorces CK1F/CK1R, ont été positifs pour les 23 souches isolées à partir de nos quatre produits et une partie de ces résultats est illustrée sur la Fig. IV.5. En effet, les fragments amplifiés ont bien une taille similaire à la taille du fragment amplifié pour le contrôle positif, qui est de 426 pb.

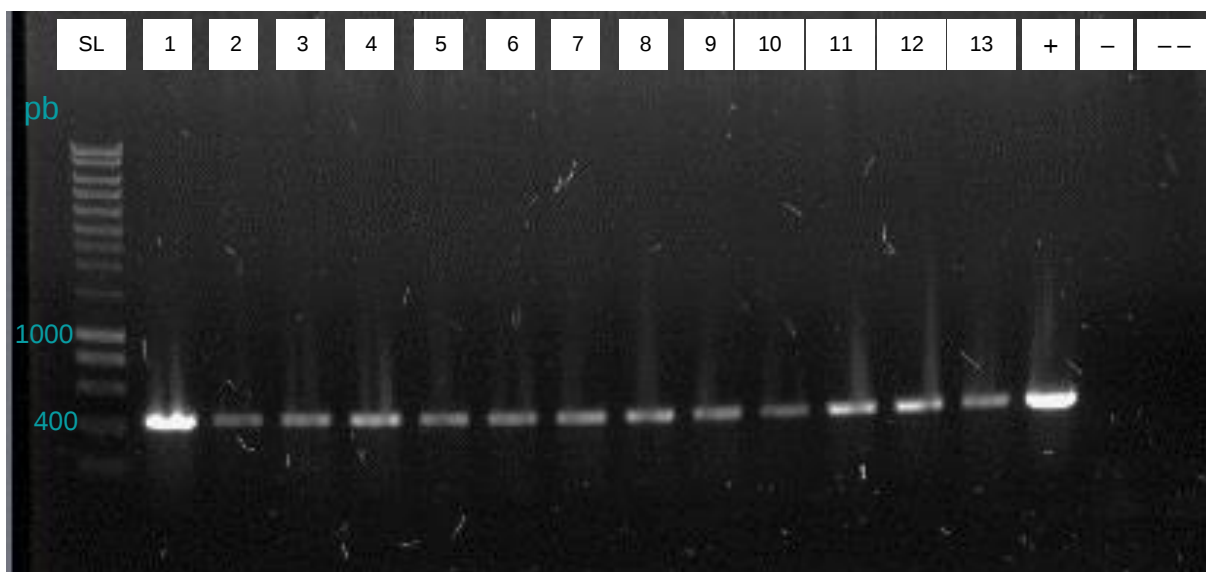


Figure IV.5 - Résultat d'électrophorèse des produits PCR pour l'amplification du gène *cytK-1*. Légende : SL : marqueur de poids moléculaire ; 1 : RSG11 ; 2 : RSG12 ; 3 : RSG13 ; 4 : RSG14 ; 5 : RSG21 ; 6 : RSG22 ; 7 : RSG23 ; 8 : RSG22 ; 9 : TC11 ; 10 : TC12 ; 11 : TC13 ; 12 : TC14 ; 13 : TC21 ; + : NVH 391-98 (contrôle positif, souche de référence *cytK-1*, *B. cytotoxicus*) ; - : ATCC 14579 (contrôle négatif, *B. cereus*) ; -- : mélange réactionnel sans ADN (contrôle négatif).

Des étapes de détection du gène *cytK-2* et des déterminants génétiques du céréulide, ces, ont également été réalisées, avec les couples d'amorces CK2F/CK2R, et EM1F/EM1R et CesF1/CesR2. La recherche des gènes de la cytotoxine K-2 et de la synthétase peptidique non-ribosomale a été négative pour les 23 souches isolées alors que les contrôles positifs réalisés pour ces gels d'électrophorèse possédaient bien une bande de la taille du fragment amplifié par les amorces. Les 23 souches isolées ne possèdent donc pas le gène de la cytotoxine K-2 et ne sont pas émétiques. Ainsi, elles peuvent être considérées comme des souches de *B. cytotoxicus*, et ce avec une forte probabilité puisqu'elles possèdent le gène *cytK-1* et sont thermotolérantes.

1.5 Comparaison des souches à l'aide des profils RAPD

Afin d'avoir un aperçu de la diversité des souches et vérifier si certaines d'entre elles étaient clonales, des RAPD ont été réalisées pour 7 des 23 souches. En effet, les 10 souches isolées à partir des deux produits de flocons de pommes de terre n'ont pas été soumises à cette partie de l'expérimentation et parmi les 13 autres souches, 7

ont été sélectionnées. Les raisons sont les suivantes : lors des recherches menées au laboratoire MIAE, des RAPD de souches provenant des deux mêmes emballages de flocons que ceux utilisés pour isoler nos 10 souches avaient déjà été effectuées (Marcel Koné comm. pers.) ; pour les isolats des TUC crisp et la soupe instantanée Saint-Germain, les caractéristiques phénotypiques ainsi qu'une première approche de RAPD ont laissé supposer que les souches issues d'un même lot étaient clonales, ainsi pour chaque lot, seul une (pour le lot n°2 de TUC) ou deux souches (pour les lots n°1 et n°2 de soupe et le lot n°1 de TUC) ont été utilisées pour les RAPD.

Cette technique de criblage rapide pour différencier les souches en amplifiant aléatoirement des fragments d'ADN a été réalisée plusieurs fois avec des amorces différentes dans le but de confronter les résultats obtenus pour chaque amorce. Lors de ce mémoire, cinq amorces différentes, OPA2, OPA9, OPA10, OPA3 et PM13, ont été utilisées mais uniquement les trois premières permettaient une discrimination entre les souches et seuls les résultats de celles-là sont présentés. En analysant un à un les trois gels d'électrophorèse reprenant les produits PCR, chacune des trois amorces les plus discriminantes permet de classer les 7 souches isolées et les deux souches de référence (NVH884-00 et NVH391-98) utilisées en tant que contrôles positifs, en trois ou cinq profils génétiques différents selon l'amorce utilisée (Tableau IV.4).

Tableau IV.4 - Profils génétiques établis par RAPD pour chaque amorce.

OPA2				
Profil 1	Profil 2	Profil 3	Profil 4	Profil 5
NVH391-98	NVH884-00	TC12, TC13	RSG13, RSG14, TC21	RSG23, RSG22
OPA9				
Profil 1	Profil 2	Profil 3	Profil 4	Profil 5
NVH391-98, TC21	NVH884-00	TC12, TC13	RSG13, RSG14	RSG23, RSG22
OPA10				
Profil 1	Profil 2	Profil 3		
NVH884-00, NVH391-98, TC21	RSG13, RSG14, RSG23, RSG22	TC12, TC13		

Ces profils génétiques ont donc été établis sur base des bandes visibles sur les Fig. IV.6, IV.7 et IV.8, mais une remarque peut être formulée. En effet, pour certains profils, il existe des bandes d'une intensité faible mais bien présentes en jouant sur le contraste et la luminosité des photos. Ces bandes sont prises en compte lors de la classification des souches, et par conséquent, certaines souches très proches les unes des autres ont été classées dans des profils différant par une unique bande.

Pour OPA2 (Fig. IV.6), on constate que les profils 1, 2 et 4 sont proches. Mais les profils 4 et 1 possèdent une faible bande supplémentaire juste sous les 800 pb, bande que le profil 2 ne possède pas. La différence entre le profil 1 et le profil 4 est quant à elle expliquée par la bande entre 400 et 600 pb présente dans le profil 1. Ainsi, les deux souches de références, NVH391-98 et NVH884-00, respectivement profil 1 et 2, sont proches du profil 4 qui comprend 2 souches isolées à partir du premier lot de soupe Saint-Germain et la souche isolée à partir du deuxième lot de TUC crisp. Pour ce qui est des profils 3 et 5, ceux-ci sont bien différenciés des trois autres profils.

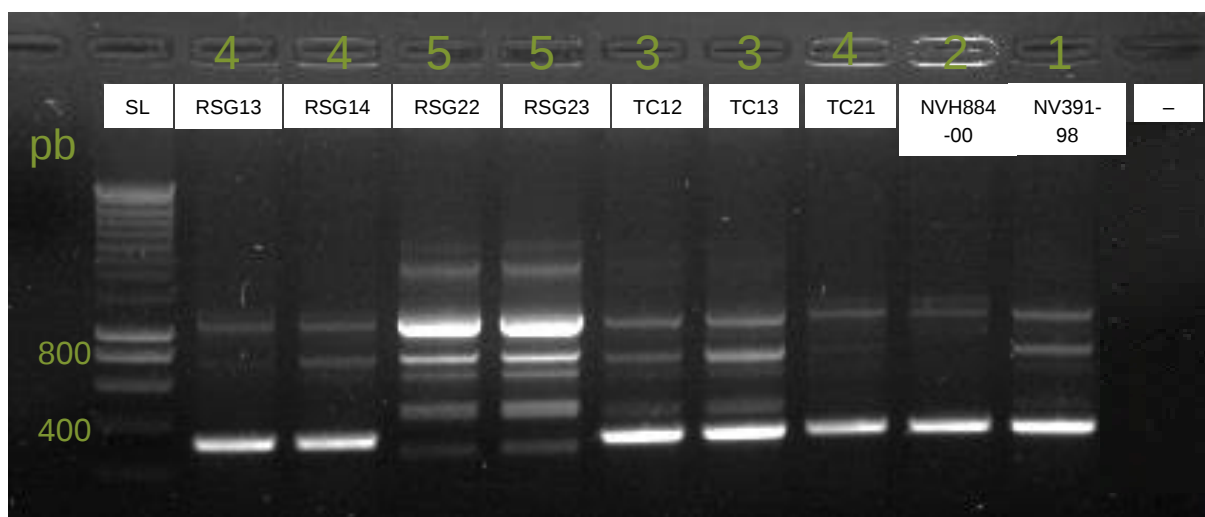


Figure IV.6 - Profils génétiques des souches isolées établis suite à la RAPD avec l'amorce OPA2. Légende : SL : marqueur de poids moléculaire ; - : mélange réactionnel sans ADN (contrôle négatif).

En ce qui concerne OPA9 (Fig. IV.7), la classification s'est révélée plus aisée que pour l'amorce OPA2. En effet, à l'exception des profils 2 et 3 qui sont proches, les autres profils génétiques sont bien distincts. Le profil 3 ne diffère du profil 2 que par la présence d'une bande supplémentaire se trouvant entre 400 et 600 pb.

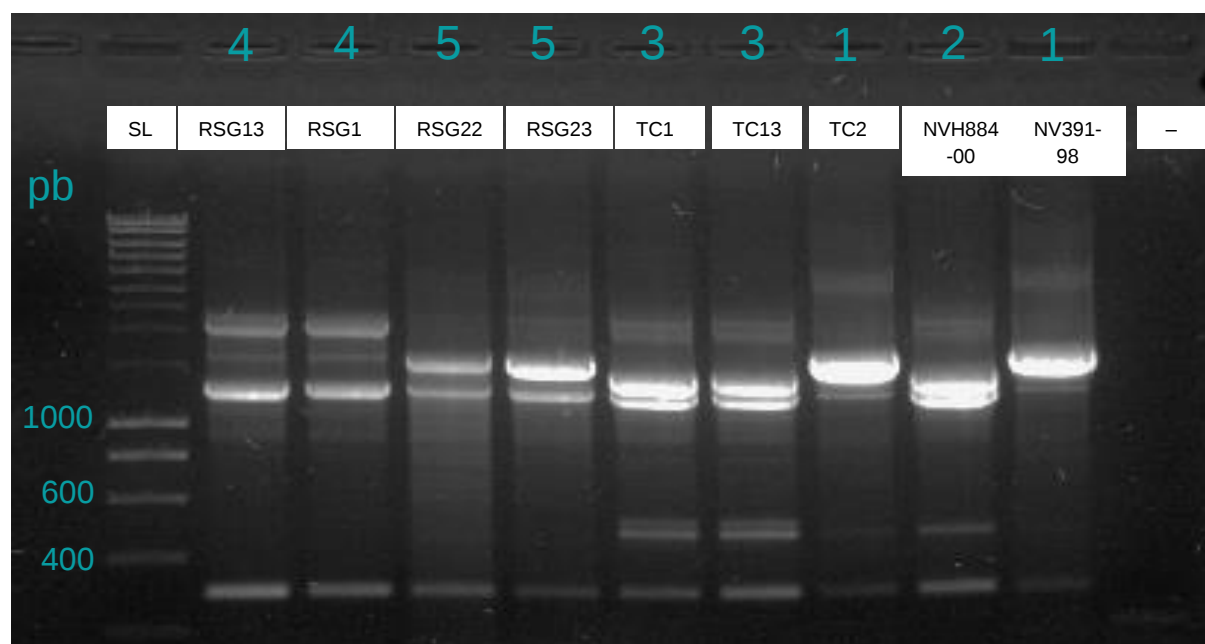


Figure IV.7 - Profils génétiques des souches isolées établis suite à la RAPD avec l'amorce OPA9. Légende : SL : marqueur de poids moléculaire ; - : mélange réactionnel sans ADN (contrôle négatif).

En observant le gel d'électrophorèse obtenu pour la RAPD réalisée avec OPA10 (Fig. IV.8), trois profils génétiques peuvent être établis. Le profil 3, comprenant les souches isolées à partir des deux lots de soupe instantanée Saint-Germain, est clairement différent des deux autres profils. Ces deux autres profils sont par ailleurs assez proches l'un de l'autre, la seule différence étant le bande présente à hauteur de 600 pb. Pour ce gel d'électrophorèse, le blanc est composé d'une bande légèrement en dessous de 1200 pb alors qu'il est supposé ne pas contenir d'ADN bactérien. Il a ainsi été pris en considération lors de la lecture des résultats. Cela permet de rappeler que la RAPD est une technique délicate à cause des amorces qui ne sont pas spécifiques et capables d'amplifier des fragments dès que de l'ADN est présent. Ainsi, malgré les précautions prises, telles que l'utilisation de tubes et de pointes de pipettes labelisés Biosphere©plus, la contamination avec un ADN étranger n'a pas été évitée.

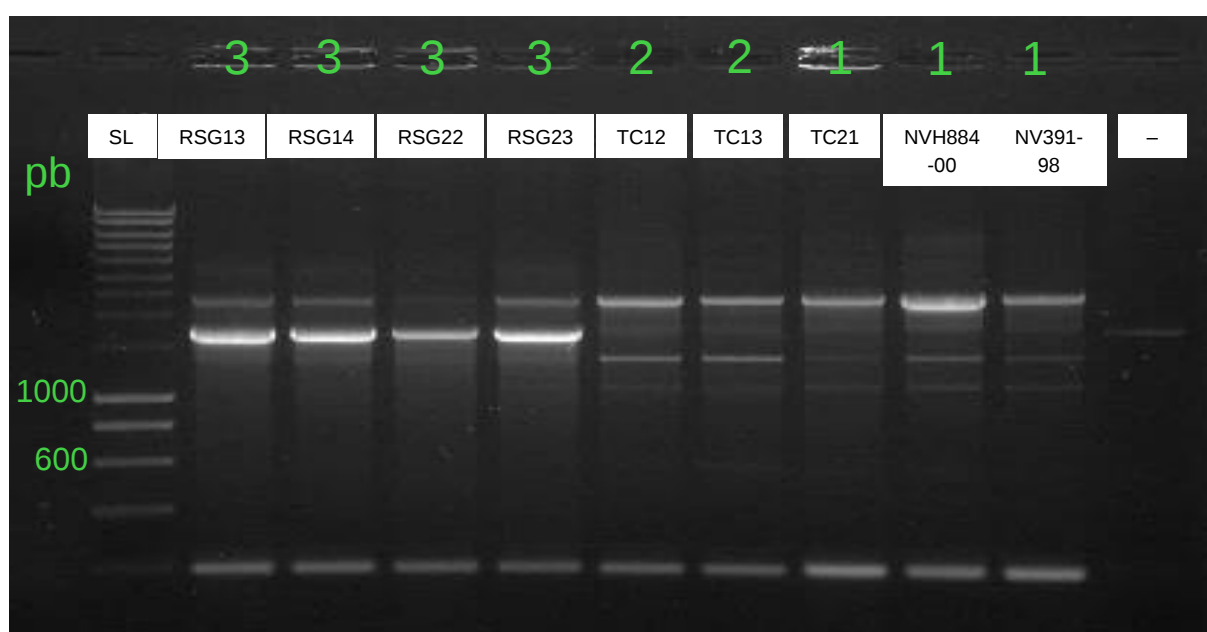


Figure IV.8 - Profils génétiques des souches isolées établis suite à la RAPD avec l'amorce OPA10. Légende : SL : marqueur de poids moléculaire ; - : mélange réactionnel sans ADN (contrôle négatif).

Se basant sur ces informations, en confrontant les profils obtenus pour chaque amorce tout en tenant compte des remarques faites suite à l'observation des Fig. IV.7, IV.8 et IV.9, un classement global des souches en cinq profils génétiques peut être proposé (Tableau IV.5). Il en ressort que les souches isolées lors de ce mémoire présentent le même profil et semblent ainsi clonales uniquement lorsqu'issues d'un même numéro de lot d'un même produit. Ce sont OPA2 et OPA9 qui permettent d'effectuer cette observation alors qu'OPA10, en revanche, discrimine plutôt les différents produits. Cette distinction entre les isolats d'un même aliment mais fabriqué à des moments différents est cohérente avec les résultats obtenus pour certains critères de caractérisation phénotypique. Par exemple, les souches de soupe instantanée Saint-Germain ne possédaient pas la même activité hémolytique sur gélose au sang frais de mouton selon le numéro de lot depuis lequel elles avaient été isolées. Un autre point à souligner dans cette distribution en profils est le fait que les

souches isolées à partir de la soupe instantanée Saint-Germain paraissent plus éloignées des souches de référence que les souches isolées à partir des TUC crisp. En effet, parmi tous les isolats, seule la souche isolée depuis le deuxième lot de TUC crisp présente un profil similaire à celui de la souche de référence NVH391-98 et le profil 3, reprenant les souches du premier lot de TUC crisp, partage également des similarités avec le profil 2 qui est constitué de NVH884-00. Afin de confirmer ou d'infirmer ce classement global des souches en profils, la réalisation de techniques plus spécifiques telles que des PFGE ou MLST pourrait s'avérer utile.

Tableau IV.5 - Distribution des souches de *B. cytotoxicus* dans les différents profils RAPD globaux.

Profil 1	Profil 2	Profil 3	Profil 4	Profil 5
NVH391-98, TC21	NVH884-00	TC12, TC13	RSG13, RSG14	RSG23, RSG22

Ainsi, les souches isolées présentent une diversité de profils génétiques et c'est également ce qui avait été trouvé dans des travaux réalisés précédemment au laboratoire MIAE sur l'étude de la diversité des souches de *B. cytotoxicus* issues d'aliments. En effet, lors de son mémoire, Zoenabo Douamba avait isolé des souches à partir de soupes marocaines et de flocons de pommes de terre et les avait classées en quatre profils (Douamba Z., 2016). Marcel Koné a quant à lui étudié des *B. cytotoxicus* provenant notamment de plus de 20 types de flocons de pommes de terre avant de les classer en 7 profils. Par soucis de clarté des RAPD, ce sont NVH391-98 et NVH884-00, identifiées par Marcel comme appartenant à deux profils différents, qui ont servi de points de comparaison avec nos souches de *B. cytotoxicus*. Une comparaison de ces dernières à la totalité des profils établis au laboratoire MIAE et voir si un autre rapprochement peut être effectué constitue une étape additionnelle à réaliser dans le futur.

2 Suivi du développement de *B. cytotoxicus* dans les aliments cuisinés

Jusqu'à présent, les souches de *B. cytotoxicus* ont uniquement été isolées à partir d'aliments d'origine végétale. Dans une étude de 2014 ciblée sur les denrées contenant de la pomme de terre, la prévalence la plus élevée a été observée pour les produits déshydratés tels que les flocons destinés à préparer de la purée. La contamination de ce dernier type de produit est généralement de l'ordre de 200 CFU/g au maximum (Contzen *et al.*, 2014). C'est le même ordre de grandeur que celui obtenu lors de l'analyse quantitative, c'est-à-dire sans pré-enrichissement, réalisée sur les flocons de pommes de terre de marque Delhaize (n°1 dans le Tableau III.7) où 250 CFU/g ont été détectés.

Cette analyse quantitative a été réalisée en utilisant le milieu MYP, milieu sur lequel quatre phénotypes différents de *B. cytotoxicus* ont été observés à partir du même échantillon (Fig. IV.9). Afin de vérifier qu'il s'agissait de cette espèce, un criblage du gène *cytK-1* a été effectué et s'est révélé positif pour les quatre phénotypes. Ainsi, cette observation indique une nouvelle fois qu'il est nécessaire d'être attentif lors de l'utilisation du milieu MYP et ne pas partir du principe qu'une espèce y exprime un phénotype unique. Pour ce qui est de la quantification de la contamination de la soupe instantanée Saint-Germain, le niveau de contamination était plus bas que la limite de détection de 10 CFU/g car aucun *B. cytotoxicus* n'a pu être observé sur les boîtes de Pétri ensemencées avec les dilutions de soupe. Contzen *al.* (2014) avaient quant à eux rapporté une contamination en *B. cytotoxicus* de 300 CFU/g pour une des soupes instantanées testée dans leur expérimentation.

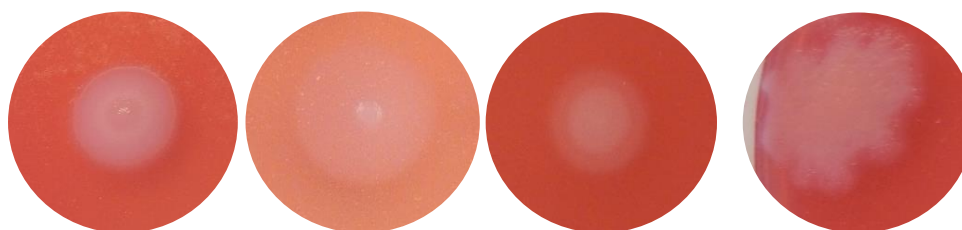


Figure IV.9 - Quatre phénotypes de *B. cytotoxicus*, présents dans les flocons de pommes de terre, observés sur le milieu MYP.

Cependant, même si la charge initiale en *B. cytotoxicus* dans les denrées contaminées a déjà été investiguée, il n'existe aucune information concernant le développement de ce bacille dans ces matrices alimentaires après préparation et conservation. En effet, la préparation de l'aliment entraîne la réhydratation du produit qui peut engendrer la germination des spores de *B. cytotoxicus* (Logan, 2012). Cette addition d'eau modifie également la nature de la matrice en augmentant son activité en eau, ce qui favorise la croissance bactérienne (Rahman and Labuza, 2007). Le but des recherches menées pour ce volet était donc de suivre l'évolution de la charge en *B. cytotoxicus* dans la purée de pommes de terre préparée avec des flocons ainsi que dans la soupe instantanée Saint-Germain préparée. Bien qu'il soit peu probable que cette dernière soit conservée après préparation étant donné que 200ml de soupe sont généralement consommés en une fois, cela reste une éventualité et l'expérience a donc également été réalisée.

2.1 Suivi des aliments préparés en imitant des conditions domestiques

Afin d'imiter des conditions de conservation inappropriées des aliments, pouvant entraîner un danger pour le consommateur, la purée et la soupe ont été préparées et conservées à 20°C pendant 48h. Cette durée de 48h a été définie après un premier test qui s'est déroulé sur 72h et durant lequel une légère odeur de rance se dégageait des aliments à partir de 48h, odeur insoutenable à 72h. De plus, pour la purée, un changement de couleur dû à l'oxydation s'opérait en surface, également à partir de 48h. Ainsi, il a été considéré que les qualités organoleptiques des aliments

après 48h étaient détériorées au point qu'aucun individu ne le consommerait au-delà de cette limite. De ce fait, le suivi réalisé comprend quatre évaluations de la charge en *B. cytotoxicus*, qui ont eu lieu directement après la préparation (H0), en H6, en H24 et en H48.

Pour la purée, quatre suivis, effectués dans les mêmes conditions, ont été réalisés. Le milieu utilisé pour effectuer les évaluations de la charge en *B. cytotoxicus* était le MYP et les colonies dénombrées possédaient, tout comme lors de l'analyse quantitative, quatre phénotypes différents qui ont tous été pris en compte. De plus, le milieu MYP qui est supposé être sélectif pour *B. cereus* n'a pas empêché le développement de la flore accompagnatrice, et ce dès les évaluations de charge faites en H6. Ce phénomène peut être dû à une résistance d'autres bactéries vis-à-vis de cet antibiotique ou à une diminution de la stabilité de la polymyxine B lorsque présente dans le MYP et lorsque soumise à une température de 50°C, qui est la température d'incubation utilisée alors que celle recommandée par le marque commercialisant ce milieu est de 30°C. En effet, la dégradation de la polymyxine B est plus rapide lorsque soumise à une température plus élevée mais également lorsqu'elle se trouve dans un milieu basique, ce qui est le cas du milieu MYP, ayant un pH de $7,2 \pm 0,2$ (Orwa *et al.*, 2002). Lors de certaines répétitions réalisées en H24 et H48, cette flore accompagnatrice, facilement affaiblie avec la pasteurisation, était trop importante que pour pouvoir dénombrer les colonies de *B. cytotoxicus* dans les échantillons n'ayant pas subi de traitement thermique. Ainsi, les moyennes des résultats obtenus lors des suivis (Fig. IV.10) comprennent quatre valeurs, excepté la moyenne des évaluations des échantillons non traités thermiquement en H24 qui en comprend trois et celle des échantillons non traités thermiquement en H48 qui n'en comprend que deux.

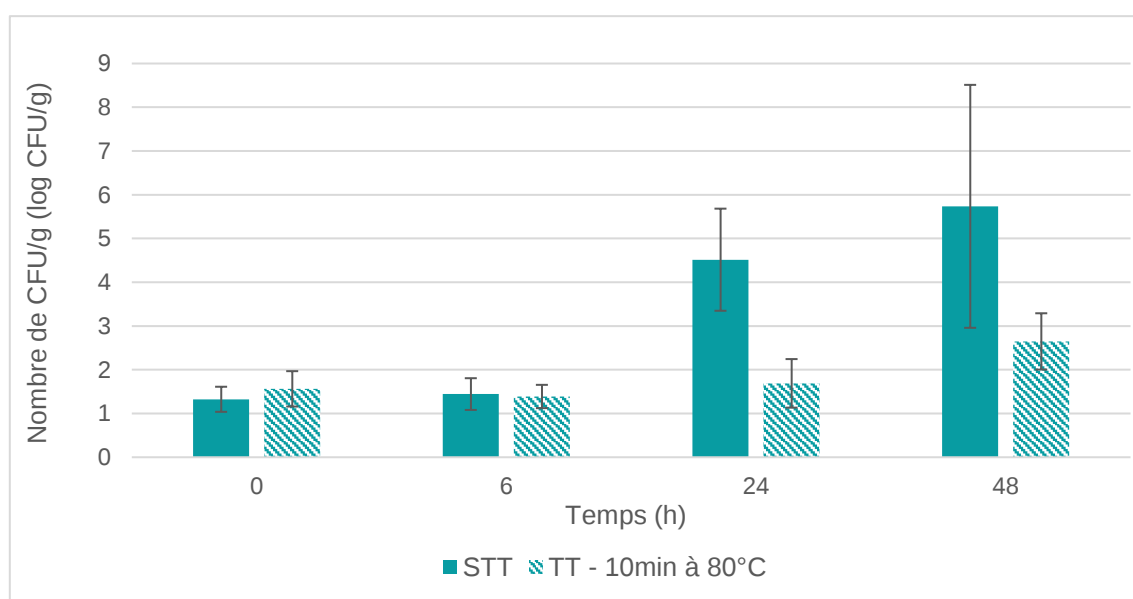


Figure IV.10 - Evaluation de la charge en *B. cytotoxicus* dans la purée préparée à partir de flocons de pommes de terre et conservée à 20°C. Les barres d'erreur représentent les déviations standard entre les différentes répétitions.

Légende : SST : sans traitement thermique ; TT- 10min à 80°C : traitement thermique, pasteurisation de 10min à 80°C.

Cette Fig. IV.10 illustre le développement de *B. cytotoxicus* dans la purée. Juste après la préparation et 6h après celle-ci, la différence entre la purée avec ou sans traitement thermique n'est pas significative. Ainsi, la charge en *B. cytotoxicus*, comprise entre 10 et 100 CFU/g, est constituée principalement de spores. Cette charge est inférieure à la contamination initiale des flocons de pommes de terre, probablement à cause de l'ajout d'eau chaude qui peut endommager certaines cellules. Ensuite, 24h après la préparation, la purée traitée thermiquement montre encore un niveau de contamination de l'ordre de 10^1 CFU/g tandis que celle non traitée contient 10^4 CFU/g. Ainsi 24h après préparation, la purée est contaminée principalement par des cellules végétatives provenant de la germination et du développement de spores présentes en H6 et dans une moindre mesure, elle contient toujours également des spores non germées. Au bout de 48h, l'écart type est important et s'explique par la plus grande variabilité observée entre les répétitions. La quantité de spores augmente d'un facteur 10 par rapport à H24 et la quantité de cellules végétatives est similaire à celle présente en H24. Ainsi entre 24 et 48h, certaines cellules continuent à se développer alors que d'autres sporulent. On constate qu'après 48h, la purée contient au total plus de 10^5 CFU/g en *B. cytotoxicus*, charge éventuellement limitée par une flore accompagnatrice présente et sans doute en compétition pour les nutriments.

Le syndrome diarrhéique est connu pour être déclenché par une dose infectieuse généralement comprise entre 10^5 et 10^7 CFU/g. Cependant, des cas apparus suite à l'ingestion d'aliments contenant 10^3 CFU/g ont également déjà été rapportés (Granum and Lindbäck, 2012; Glasset *et al.*, 2016). Ainsi, même de faibles quantités de germes ne peuvent être considérées comme sans danger lorsque présentes dans l'aliment. Les résultats obtenus lors de ce mémoire montrent qu'après 24h de conservation à 20°C, la dose en *B. cytotoxicus* atteinte dans la purée s'élève à 10^3 CFU/g et celle-ci monte à plus de 10^5 CFU/g après 48h, doses présentant un risque potentiel pour la santé du consommateur. En effet, malgré la présence d'une telle contamination, aucune information ne nous permet de savoir si les souches produisent ou non la ou les toxine(s) diarrhéique(s). Par principe de précaution, il est donc conseillé de consommer ce produit déshydraté à base de pommes de terre le plus rapidement possible après sa préparation ou si conservé, de le placer à une température inférieure à 7°C pour éviter la multiplication des micro-organismes.

En ce qui concerne la soupe, après avoir réalisé deux répétitions de suivi, l'expérimentation a été arrêtée à cause de la flore accompagnatrice qui était dominante et rendait impossible l'énumération des colonies de *B. cytotoxicus*. En effet, cette flore s'est révélée présente dès les évaluations de charge en H6 et dominante en H24, et ce tant pour l'échantillon non traité thermiquement que pour celui qui l'était (Fig. IV.11).

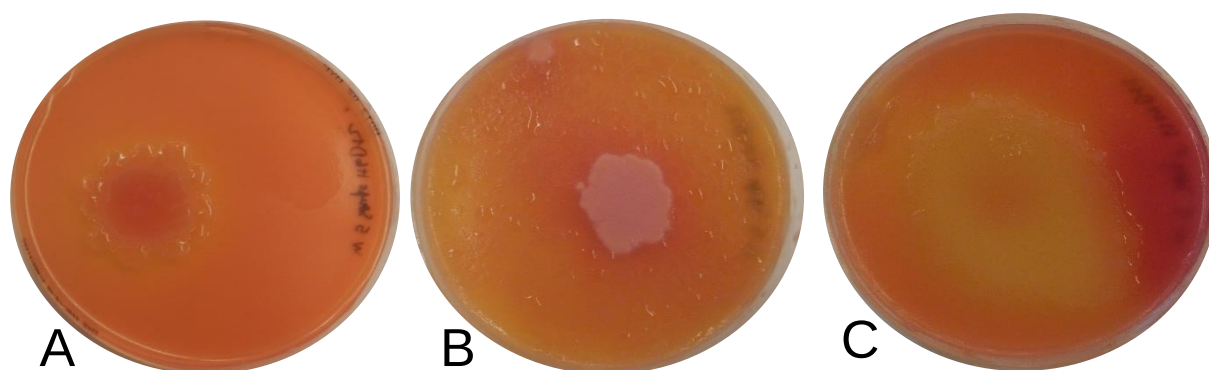


Figure IV.11 - Colonies se développant après ensemencement de la dilution 10^{-1} des échantillons de purée sans traitement thermique en H6 (A), sans traitement thermique en H24 (B) et avec traitement thermique en H24 (C).

Ainsi, la présence de la flore accompagnatrice ne permet pas toujours de réaliser l'évaluation de la charge en *B. cytotoxicus*. Bien qu'elle ne fût pas détectée lors des analyses quantitatives des produits avant préparation, cette flore accompagnatrice est vraisemblablement contenue initialement dans l'aliment. Elle pourrait également être issue de l'eau ajoutée pour la préparation même si les analyses effectuées sur l'eau utilisée indiquent qu'aucun microorganisme n'y est présent (Annexe B). Pour la purée, il s'agit d'une flore annexe dominante uniquement lors de certaines répétitions, à partir de H24 au minimum et qui est fortement diminuée après traitement thermique alors que pour la soupe, cette flore est présente dès H6 et non affectée par la pasteurisation. Dès lors, pour avoir un aperçu du comportement de *B. cytotoxicus* dans ces matrices alimentaires sans qu'aucune flore accompagnatrice potentiellement compétitrice ne soit présente, les aliments ont été stérilisés et inoculés avec des spores d'une souche de *B. cytotoxicus* issue de cet aliment.

2.2 Suivi des aliments stérilisés et inoculés avec des spores

La première étape de cette expérimentation a été la production de spores nécessaires pour inoculer les produits une fois ceux-ci stérilisés. Pour ce faire, le protocole destiné à faire sporuler les souches a été réalisé pour une souche de *B. cytotoxicus* issue des flocons de pommes de terre, FD14, ainsi que pour un isolat de soupe instantanée Saint-Germain, RSG22. De plus, les souches de référence de *B. cereus* s. s. et de *B. cytotoxicus*, ATCC14579 et NVH391-98, ont également subi ce même protocole pour servir de contrôles et points de comparaison. La stabilité des spores produites (Fig. IV.12) a été évaluée en dénombrant les suspensions de spores le jour de la fin du processus de sporulation (J0), ainsi que 4 jours (J4) et 10 jours (J10) après. Les quatre suspensions de spores, avant et après traitement thermique, contenaient une charge comprise entre 10^7 et 10^8 CFU/ml (excepté la suspension de spores d'ATCC 14579 qui a été pasteurisée en J0 où 10^6 CFU/ml ont été détectées). Ainsi, les suspensions de spores produites ont été considérées comme stables dans le temps et ont été utilisées pour l'inoculation des aliments stérilisés.

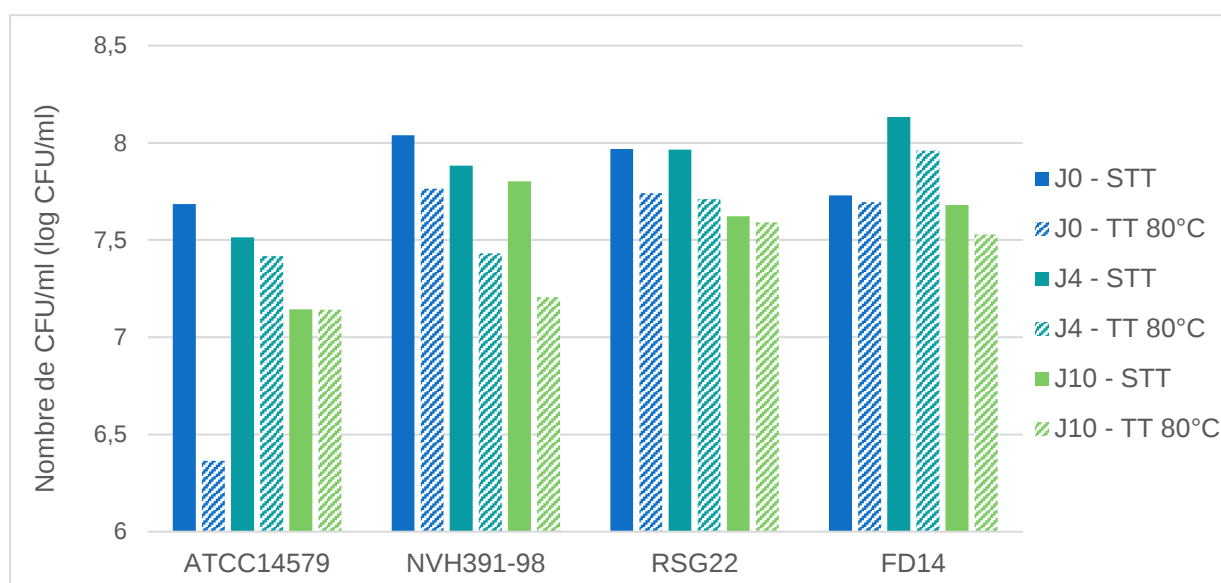


Figure IV.12 - Stabilité des spores.

Légende : STT : sans traitement thermique ; TT 80°C : traitement thermique, pasteurisation de 10min à 80°C.

Étant donné que pour préparer la soupe et la purée, un ajout d'eau bouillante est effectué, eau qui sera par conséquent en contact avec les spores, une analyse de la thermorésistance des spores a été conduite (Fig. IV.13). Les résultats obtenus indiquent que les spores de *B. cytotoxicus*, tant pour la souche de référence que pour nos isolats, résistent à l'application durant 10min de températures allant jusque 100°C, mais que cette résistance diminue plus on augmente en température. Ils sont en adéquation avec ceux d'une étude précédente qui rapporte une résistance à la chaleur importante pour les spores du groupe phylogénétique VII, groupe auquel appartient l'espèce *B. cytotoxicus* (Luu-Thi et al., 2014).

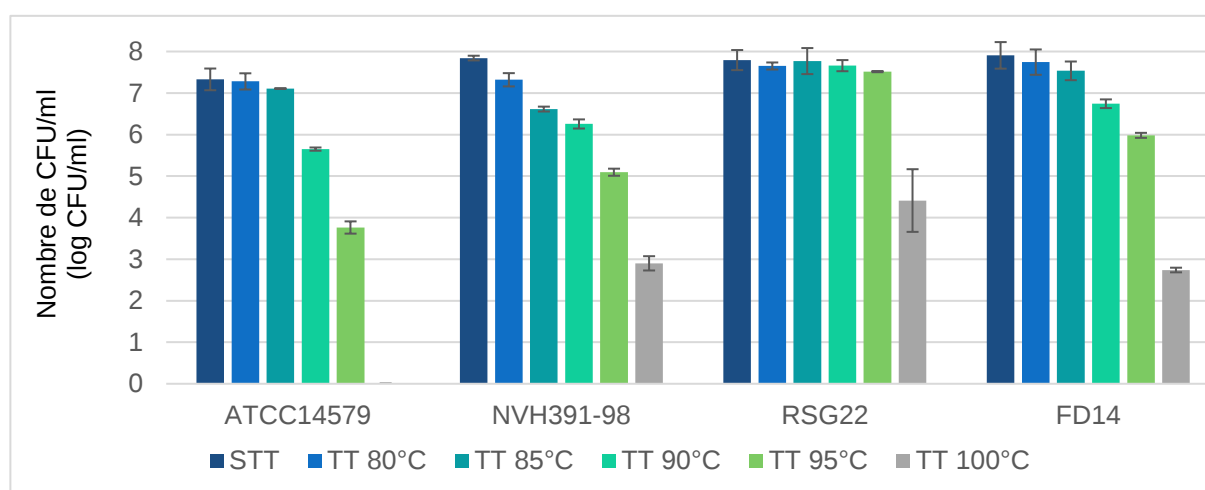


Figure IV.13 - Thermorésistance des spores. Les barres d'erreur représentent les déviations standard entre les deux répétitions.

Légende : STT : sans traitement thermique ; TT 80°C : traitement thermique de 10min à 80°C ; TT 85°C : traitement thermique de 10min à 85°C ; TT 90°C : traitement thermique de 10min à 90°C ; TT 95°C : traitement thermique de 10min à 95°C ; TT 100°C : traitement thermique de 10min à 100°C.

Une fois les paramètres des spores produites analysés, la purée et la soupe ont pu être préparées, respectivement à partir des flocons et de la poudre stérilisés et inoculés avec des spores. Pour chaque produit, il y a eu deux suivis différents : un lorsque le produit était inoculé avec 10^2 CFU/g de spores de la souche isolée à partir de ce produit (RSG22 pour la soupe et FD14 pour la purée) ; et un lorsque le produit était inoculé avec 10^2 CFU/g de spores de NVH391-98. Par suivi, cinq dénombrements ont été réalisés, le premier a lieu après l'inoculation de l'aliment mais avant sa préparation pour s'assurer que le niveau de contamination par *B. cytotoxicus* était bien de l'ordre de 10^2 CFU/g. Les autres dénombrements ont eu lieu en H0, H6, H24 et H48 après préparation. Chaque suivi a été répété trois fois, toujours dans les mêmes conditions. Les moyennes des résultats obtenus sont reprises dans la Fig. IV.14 pour la purée et dans la Fig. IV.15 pour la soupe.

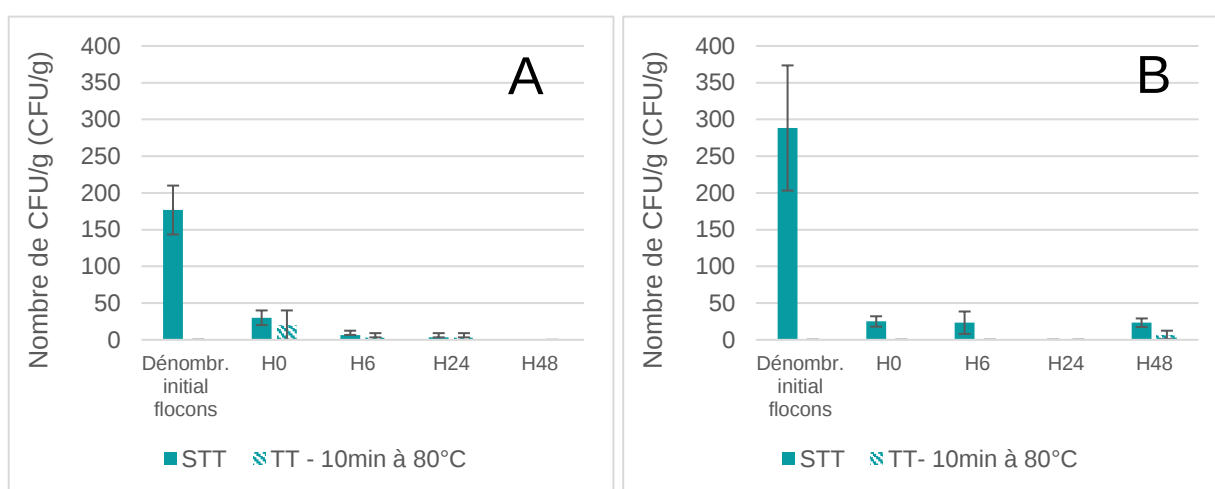


Figure IV. 14 - Évaluation de la charge en *B. cytotoxicus* dans la purée préparée à partir des flocons de pommes de terre stérilisés et inoculés : avec FD14 (A) ; avec NVH391-98 (B). Les barres d'erreur représentent les déviations standard entre les trois répétitions.

Légende : STT : sans traitement thermique ; TT - 10min à 80°C : traitement thermique pendant 10min à 80°C ; Dénombr. initial flocons : dénombrement initial des flocons.

Pour la purée, tant pour celle inoculée avec FD14 que celle inoculée avec NVH391-98, l'inoculation a bien été réalisée car le niveau de contamination est de l'ordre de 10^2 CFU/g, mais on constate que cette charge diminue d'un facteur 10 juste après la préparation de la purée (Fig. IV.14). Cette diminution peut être liée à l'ajout d'eau bouillante, hypothèse cohérente avec les résultats obtenus lors des tests de thermorésistance des spores de FD14 et de NVH391-98. Pendant les 48h de conservation suivante, la charge semble diminuer jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de bactéries ou tout du moins, que les bactéries survivent mais restent dans une phase de latence sans se développer. L'interprétation est compliquée par les valeurs faibles et proches de la limite de détection qui est de 10 CFU/g.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées quant à ces résultats qui diffèrent du schéma observé lors de la préparation de la purée dans des conditions domestiques, où la contamination augmentait au fil des heures. Tout d'abord, les spores ayant servi aux inoculations ont été produites au laboratoire MIAE dans un

milieu de culture spécifique, et il se peut que ces spores aient des propriétés de résistance différentes de celles produites lors du processus de fabrication du produit. En effet, Eijlander *et al.* (2011) rapportent que des changements mineurs dans les caractéristiques essentielles des spores de *Bacillus*, notamment leur composition en eau, peuvent provoquer des différences au niveau du comportement germinatif et de la croissance de ces spores. Ensuite, un autre élément qui pourrait influencer le développement des spores est la nature du produit qui, suite à la stérilisation par autoclavage, a été modifié. Il a été montré que la matrice alimentaire influence le développement des spores de *B. cereus* ayant été endommagées par la chaleur, comme ce fut sans doute le cas lors de l'ajout d'eau (Warda *et al.*, 2015).

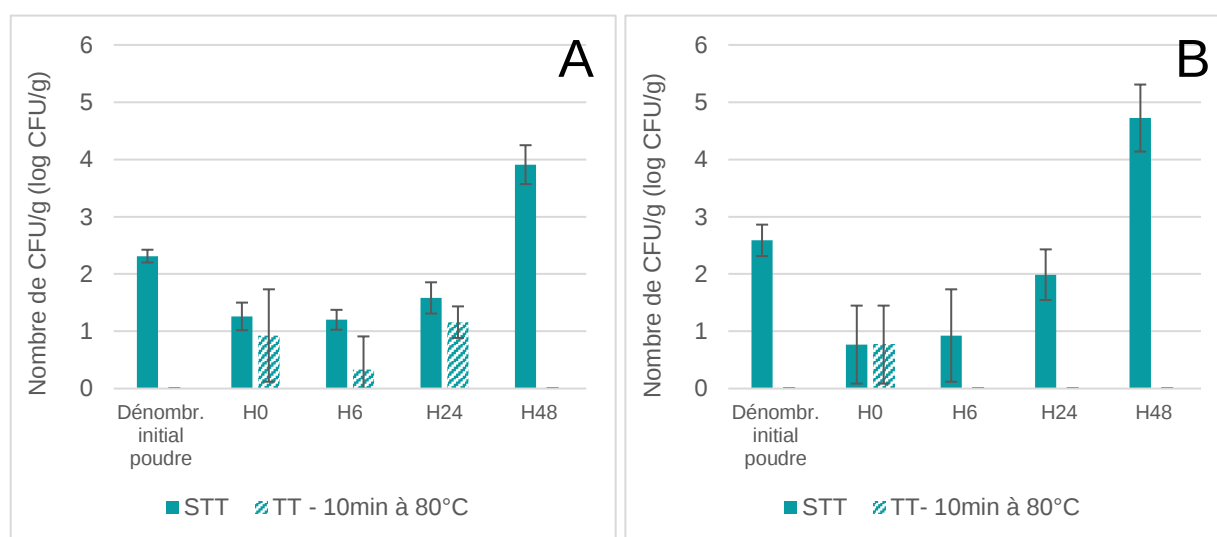


Figure IV.15 - Évaluation de la charge en *B. cytotoxicus* dans la soupe préparée à partir de la poudre stérilisée et inoculée : avec RSG22 (A) ; avec NVH391-98 (B). Les barres d'erreur représentent les déviations standard entre les trois répétitions.

Légende : STT : sans traitement thermique ; TT - 10min à 80°C : traitement thermique pendant 10min à 80°C ; Dénombr. initial poudre : dénombrement initial de la poudre.

Pour la soupe, des colonies d'une autre bactérie se développaient sur les boîtes de Pétri. Leur phénotype présentant un relief filamenteux, il était très facile de les différencier des colonies de *B. cytotoxicus* (Fig. IV.16) et leur présence n'a pas empêché le dénombrement de ces dernières. Un séquençage partiel d'ADNr 16S de cette autre bactérie a indiqué un pourcentage d'identité de 99% avec la souche NBRC 101234, appartenant à l'espèce *B. sonorensis*. Cette espèce du groupe *B. subtilis* est capable de sporuler et de croître à des températures allant de 15 à 55°C (Palmisano *et al.*, 2001). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la présence de cette bactérie qui n'a pas été éliminée par la stérilisation de 15min à 121°C. Premièrement, cela peut être dû à un problème lié à l'autoclavage. Ensuite, des espèces du groupe *B. subtilis* sont connues pour être résistantes aux traitements thermiques dans l'industrie agro-alimentaire et il pourrait en être de même pour *B. sonorensis*. Des aliments, tels que du lait en poudre, de la poudre de cacao, des condiments, et soumis à des températures pouvant dépasser les 100°C, ont déjà été recensés pour contenir *B. licheniformis* et *B. amyloliquefaciens* (Berendsen *et al.*, 2016; Ahn and

Balasubramaniam, 2014; Lima *et al.*, 2011; Pereira and Sant'Ana, 2018; Lima *et al.*, 2012; Sadiq *et al.*, 2016). En troisième lieu, il est également possible que la matrice constituée par la soupe forme une protection de ce micro-organisme contre les traitements thermiques. En effet, certains composés, tels que la graisse, ralentissent l'inactivation des spores de certaines espèces de *Bacillus* et la soupe contient de la graisse de palme qui a pu jouer ce rôle de protection lors de l'autoclavage (Ababouch *et al.*, 1995; Samapundo *et al.*, 2011c; Samapundo *et al.*, 2014).



Figure IV.16 - Phénotype de l'autre bactérie (gauche) se développant sur milieu LB lors du suivi du développement de *B. cytotoxicus* (droite) dans la soupe préparée avec de la poudre stérilisée et inoculée avec des spores.

Quant aux observations faites sur les charges en *B. cytotoxicus* présentes avant préparation de la soupe, en H0 et en H6 (Fig. IV.15), elles sont similaires à celles de la purée. Les spores se développent à partir de H24 et ensuite, germent toutes, pour que la soupe atteigne une charge en *B. cytotoxicus* de 10^4 CFU/g après 48h de conservation. Cette différence de développement de *B. cytotoxicus* entre la purée et la soupe préparées à partir d'aliments stérilisés peut être due à *B. sonorensis* qui influencerait positivement *B. cytotoxicus* dans la soupe. Une autre supposition est que la matrice constituée par la soupe permet aux spores de récupérer plus facilement des dommages causés par l'ajout d'eau chaude. Il a en effet été montré que la composition de la matrice dans laquelle se trouvent des spores de *B. cereus* traitées thermiquement influence la capacité des spores à croître par la suite (Warda *et al.*, 2016).

V CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les maladies d'origine alimentaire constituent un problème mondial de santé publique. Parmi les agents responsables de ces maladies, on peut citer les bactéries ainsi que les toxines produites par ces dernières. Ubiquitaire et capable de produire des spores en tant que forme de survie, le groupe *B. cereus* contamine de nombreuses denrées alimentaires, parfois avec des souches pathogènes causant des toxico-infections. C'est notamment le cas de la souche NHV391-98 appartenant à l'espèce ajoutée au groupe en 2013, *B. cytotoxicus*. Cette souche a été découverte en France lors d'une toxico-infection ayant causé la mort de trois personnes suite à l'ingestion d'une purée végétale. La ou les toxines impliquée(s) dans la toxicité ne sont pas connues à l'heure actuelle mais une entérotoxine potentielle est la cytotoxine K-1, propre à l'espèce *B. cytotoxicus*. À l'heure actuelle, la prévalence et le développement de cette bactérie dans les aliments sont encore peu documentés mais constituent un champ intéressant à explorer. En effet, une de ses propriétés supplémentaires est la thermotolérance, qui lui confère une plus grande probabilité de se trouver dans une niche alimentaire spécifique, constituée notamment d'aliments déshydratés.

Dans ce contexte, ce travail a été réalisé dans le but d'isoler des souches de *B. cytotoxicus* dans différentes matrices alimentaires et de les caractériser afin d'avoir un aperçu de leur diversité. Un autre objectif était le suivi du développement de ce bacille dans des aliments préparés et conservés de façon inappropriée afin de situer le risque potentiel de TIA qu'ils pourraient engendrer dans ces conditions.

En ce qui concerne l'isolation de souches, après analyse de 39 aliments, *B. cytotoxicus* a pu être détecté dans 4 types de produits différents, produits soit déshydratés, soit fabriqués à partir d'ingrédient(s) déshydraté(s), et étant : pour deux d'entre eux, des flocons de pommes de terre destinés à faire de la purée ; des chips crisp ; et de la poudre pour préparer de la soupe instantanée Saint-Germain. Outre la présence de curcuma dans trois des quatre produits analysés contenant *B. cytotoxicus*, l'ingrédient qui les unit tous est sans nul doute la pomme de terre. Ainsi, ce mémoire renforce la théorie liant la présence de *B. cytotoxicus* à des aliments déshydratés à base de pomme de terre ou fabriqués à partir de ceux-ci. La supposition qu'une ou plusieurs étape(s) de traitement thermique dans la chaîne de production sélectionne(nt) *B. cytotoxicus* est avancée. Afin de déterminer s'il y a bien un point critique engendrant la contamination du produit et où il se situe, il serait nécessaire de

mener des prélèvements à différents stades du procédé de fabrication dans une usine de déshydratation de pommes de terre et de les analyser.

Même si ce ne fut pas le cas lors de ce travail de fin d'études, au cours des dernières années, des souches de *B. cytotoxicus* ont déjà été isolées au laboratoire MIAE à partir d'aliments déshydratés dépourvus de pomme de terre tels que de la farine pour enfant et des soupes marocaines. Ainsi, il pourrait être intéressant de continuer à explorer cette voie.

Au total, 23 souches de *B. cytotoxicus* ont été isolées et divers tests de caractérisation ont été réalisés. Des études phénotypiques des souches sur la gélose MYP ont permis de constater que le phénotype exprimé sur ce milieu pouvait s'avérer atypique selon la température d'incubation utilisée. Il est dès lors nécessaire d'en être conscient lors de l'utilisation du MYP pour l'isolement et l'identification de souches de *B. cytotoxicus*. D'autre part, certaines souches isolées depuis les chips TUC crisp et la soupe instantanée Saint-Germain de Royco, ainsi que NVH391-98 et NVH884-00 servant de points de comparaison, ont été soumises à une étude de diversité avec la méthode RAPD, étude à partir de laquelle un classement en profils génétiques a été effectué. Ce dernier discrimine les isolats selon l'aliment à partir duquel ils ont été isolés et selon le moment de production de cet aliment. En effet, même si l'amorce OPA10 a uniquement permis une distinction des souches selon le type de produit, les amorces OPA2 et OPA9 se sont révélées capables de discriminer les souches venant de deux mêmes produits d'une même marque, avec un procédé de fabrication identique mais fabriqués à des moments différents. Cette caractérisation par RAPD a été réalisée dans la perspective d'également comparer les profils des isolats à ceux des souches de *B. cytotoxicus* caractérisées jusqu'à présent dans le laboratoire MIAE. De plus, pour approfondir l'exploration de la diversité génétique, une étape d'extraction et de visualisation des grands plasmides pourrait être réalisée par la suite.

L'autre volet de ce mémoire consistait à suivre le développement de *B. cytotoxicus* dans la purée et dans la soupe.

Malgré le fait que la contamination initiale des flocons de pommes de terre n'excède pas les 250 CFU/g, lorsque ceux-ci sont préparés en purée dans des conditions domestiques et conservés à 20°C, la charge en *B. cytotoxicus* monte à 10⁴ CFU/g après 24h de conservation et à 10⁵ CFU/g après 48h. Ces niveaux de contamination ont déjà été rapportés pour être à l'origine du syndrome diarrhéique. Afin d'éviter ce genre de situations à risques pour le consommateur, la meilleure prévention reste l'information du grand public quant aux bonnes pratiques d'hygiène et de conservation en matière de denrées alimentaires. Néanmoins, malgré la présence dans la purée de telles quantités de souches thermotolérantes et possédant le gène *cytK-1* ne signifie pas que les souches soient toxiques ou qu'elles produisent la ou les toxine(s). Ainsi, en plus du suivi du développement des souches, une étape

permettant d'aborder leur cytotoxicité, telle qu'un test sur des lignées cellulaires par exemple, devrait être effectuée.

Un autre aspect à considérer lors de l'étude du développement dans la purée est la présence d'une flore accompagnatrice présente sur le MYP incubé à 50°C rendant parfois impossible l'évaluation de la charge en *B. cytotoxicus*. Il serait utile de tester la stabilité de la polymyxine B présente dans ce milieu spécifique lorsque soumise à une telle température. D'autres milieux de culture, comme le « Brillance *Bacillus cereus* » se montrant utile pour dénombrement *B. cereus* dans des matrices alimentaires contenant une flore accompagnatrice importante (Chon *et al.*, 2014), pourraient être utilisés afin de limiter les interférences.

Les purées préparées à partir de flocons stérilisés et inoculés avec des spores de FD14, une souche de *B. cytotoxicus* issue de ces mêmes flocons, ou avec des spores de NVH391-98 ont également été suivies pendant 48h. Cette expérimentation a indiqué que ni la souche de référence ni la souche FD14 ne se développaient durant les 48h après préparation de la purée. Diverses hypothèses peuvent être posées par rapport à ces résultats qui diffèrent de ceux obtenus quand la purée est préparée dans des conditions domestiques. Pour en citer deux, il se peut que cela soit dû aux spores produites qui peuvent potentiellement posséder des propriétés de résistances plus faibles ou encore au changement de la nature de la matrice alimentaire qui ne favorise pas le développement de *B. cytotoxicus*.

Bien que le conditionnement de la soupe soit prévu pour que la quantité préparée corresponde à une consommation individuelle, les mêmes analyses que celles faites pour la purée ont aussi été réalisées. Pour la soupe préparée dans des conditions domestiques et conservée à 20°C, la flore accompagnatrice a rendu toute évaluation impossible. Ainsi, seules les soupes préparées avec la poudre stérilisée et inoculée, soit avec des spores de RSG22 (une souche de *B. cytotoxicus* issue de cette même poudre), soit avec des spores de NVH391-98, ont fourni des résultats analysables et similaires pour les deux souches. Les spores se développent à partir de 24h après conservation et après 48h, seules des cellules végétatives, atteignant 10⁴ CFU/g, sont présentes dans la soupe. Ce niveau de contamination peut s'avérer potentiellement dangereux mais comme déjà mentionné, la soupe n'est pas destinée à être consommée en plusieurs repas, ce qui réduit considérablement les risques. Une souche de *B. sonorensis* contaminait la soupe lors de ces expérimentations. L'impact de cette bactérie sur le développement de *B. cytotoxicus* devrait être exploré plus en détails afin de déterminer si un lien unit ces deux bacilles.

BIBLIOGRAPHIE

- ABABOUC, L. H., GRIMIT, L., EDDAFRY, R., and BUSTA, F. F. (1995). Thermal inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* spores suspended in buffer and in oils. *J. Appl. Microbiol.*, 78(6), 669-676.
- ABDELMASSIH, M., PLANCHON, V., ANCEAU, C., and MAHILLON, J. (2011). Development and validation of stable reference materials for food microbiology using *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* spores. *J. Appl. Microbiol.*, 110(6), 1524-1530.
- ABRIOUEL, H., BENOMAR, N., HUCH, M., FRANZ, C., and GÁLVEZ, A. (2014). The genera *Bacillus*, *Geobacillus* and *Halobacillus* In *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. HOLZAPFEL, W. H., and WOOD, B. J. John Wiley & Sons, Oxford, 632 pp.
- ADAMS, M. R., MOSS, M. O., and MCCLURE P. (2015). Food microbiology. Royal Society of Chemistry, 546pp.
- AGATA, N., MORI, M., OHTA, M., SUWAN, S., OHTANI, I., and ISOBE, M. (1994). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, 121(1), 31-34.
- AGATA, N., OHTA, M., MORI, M., and ISOBE, M. (1995). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 129(1), 17-19.
- AGATA, N., OHTA, M., and MORI, M. (1996). Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. *Curr. Microbiol.*, 33(1), 67-69.
- AGATA, N., OHTA, M., and YOKOYAMA, K. (2002). Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 73(1), 23-27.
- AHN, J., and BALASUBRAMANIAM, V. M. (2014). Screening foods for processing-resistant bacterial spores and characterization of a pressure-and heat-resistant *Bacillus licheniformis* isolate. *J. Food Prot.*, 77(6), 948-954.
- ALTEKRUSE, S. F., COHEN, M. L., and SWERDLOW, D. L. (1997). Emerging foodborne diseases. *Emerging Infect. Dis.*, 3(3), 285.
- ANDERSSON, A., RONNER, U., and GRANUM, P. E. (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *Int. J. Food Microbiol.*, 28(2), 145-155.
- ANDERSSON, M. A., MIKKOLA, R., HELIN, J., ANDERSSON, M. C., and SALKINOJA-SALONEN, M. (1998). A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(4), 1338-1343.
- ANDERSSON, M. A., JÄÄSKELÄINEN, E. L., SHAHEEN, R., PIRHONEN, T., WIJNANDS, L. M., and SALKINOJA-SALONEN, M. S. (2004). Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. *Int. J. Food Microbiol.*, 94(2), 175-183.
- APETROAIE-CONSTANTIN, C., SHAHEEN, R., ANDRUP, L., SMIDT, L., RITA, H., and SALKINOJA-SALONEN, M. (2008). Environment driven cereulide production by emetic strains of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 127(1-2), 60-67.
- AUGER, S., GALLERON, N., BIDNENKO, E., EHRLICH, S. D., LAPIDUS, A., and SOROKIN, A. (2008). The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is representative of a cluster of thermophilic strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(4), 1276-1280.
- BAILLIE, L., and READ, T. D. (2001). *Bacillus anthracis*, a bug with attitude! *Curr. Opin. Microbiol.*, 4(1), 78-81.
- BARON, F., COCHET, M. F., GROSSET, N., MADEC, M. N., BRIANDET, R., DESSAIGNE, S., CHEVALIER, S., GAUTIER, M., and JAN, S. (2007). Isolation and characterization of a psychrotolerant toxin producer, *Bacillus weihenstephanensis*, in liquid egg products. *J. Food Prot.*, 70(12), 2782-2791.
- BARTOSZEWICZ, M., BIDESHI, D. K., KRASZEWSKA, A., MODZELEWSKA, E., and SWIECICKA, I. (2009). Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* display genetic and psychrotrophic properties characteristic of *Bacillus weihenstephanensis*. *J. Appl. Microbiol.*, 106(6), 1967-1975.
- BAZINET, A. L. (2017). Pan-genome and phylogeny of *Bacillus cereus sensu lato*. *BMC Evol. Biol.*, 17(1), 176.

- BEECHER, D. J., SCHOENI, J. L., and WONG, A. C. (1995). Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.*, 63(11), 4423-4428.
- BEECHER, D. J., and WONG, A. C. (1997). Tripartite Hemolysin BL from *Bacillus cereus* - Hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *J. Biol. Chem.*, 272(1), 233-239.
- BEECHER, D. J., OLSEN, T. W., SOMERS, E. B., and WONG, A. C. (2000). Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C, and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis. *Infect. Immun.*, 68(9), 5269-5276.
- BENUSIC, M. A., PRESS, N. M., HOANG, L., and ROMNEY, M. G. (2015). A cluster of *Bacillus cereus* bacteremia cases among injection drug users. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, 26(2), 103-104.
- BERENDSEN, E. M., KONING, R. A., BOEKHORST, J., DE JONG, A., KUIPERS, O. P., and WELLS-BENNIK, M. H. (2016). High-level heat resistance of spores of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus licheniformis* results from the presence of a *spoVA* operon in a Tn1546 transposon. *Front. Microbiol.*, 7, 1912.
- BERNER, R., HEINEN, F., PELZ, K., VAN VELTHOVEN, V., SAUER, M., and KORINTHENBERG, R. (1997). Ventricular shunt infection and meningitis due to *Bacillus cereus*. *Neuropediatrics*, 28(06), 333-334.
- BERTHOLD-PLUTA, A., PLUTA, A., and GARBOWSKA, M. (2015). The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract. *Microb. Pathog.*, 82, 7-14.
- BEYER, W., and TURNBULL, P. C. B. (2009). Anthrax in animals. *Mol. Aspects Med.*, 30(6), 481-489.
- BHUNIA, A. (2007). Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis. Springer, New-York, 276 pp.
- BIOMÉRIEUX. (2016). Le Point sur *Bacillus cereus*. Available at:
http://www.biomerieux.fr/sites/subsidiary_fr/files/point_sur_bacillus_cereus_fevrier2016.pdf
- BLEVINS, S. M., and BRONZE, M. S. (2010). Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. *Int. J. Infect. Dis.*, 14(9), e744-e751.
- BÖHM, M. E., HUPTAS, C., KREY, V. M., and SCHERER, S. (2015). Draft genome sequence of *Bacillus cytotoxicus* CVUAS 2833, a very close relative to type strain NVH 391-98 isolated from a different location. *Genome Announc.*, 3(4).
- BOSERET, G., LINDEN, A., and MAINIL, J. (2002). *Bacillus anthracis*. Available at:
<http://www2.fmv.ulg.ac.be/BACILLUSANTHRACIS.pdf>
- BOTTONE, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, 23(2), 382-398.
- BRAVO, A., LIKITVIVATANAVONG, S., GILL, S. S., and SOBERÓN, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(7), 423-431.
- BRIONES ALONSO, E., COCKX, L., and SWINNEN, J. F. (2017). Culture and food security. Katholieke universiteit Leuven, Leuven, Belgium.
- BROWN, K. L. (2000). Control of bacterial spores. *Br. Med. Bull.*, 56(1), 158-171.
- BRÜCKER, G. (2003). Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. MDO infos n° 5 décembre. Available at:
http://invs.santepubliquefrance.fr/content/download/30506/155552/version/1/file/mdo_infos_05.pdf
- BRYAN, F. L. (1982) Diseases transmitted by foods: a classification and summary. Center for Disease Control, Atlanta, 101pp.
- CALLEGAN, M. C., COCHRAN, D. C., KANE, S. T., RAMADAN, R. T., CHODOSH, J., MCLEAN, C., and STROMAN, D. W. (2006). Virulence factor profiles and antimicrobial susceptibilities of ocular *Bacillus* isolates. *Curr. Eye Res.*, 31(9), 693-702.
- CARLIN, F., FRICKER, M., PIELAAT, A., HEISTERKAMP, S., SHAHEEN, R., SALONEN, M. S., SVENSSON, B., NGUYEN-THE, C., and EHLING-SCHULZ, M. (2006). Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Food Microbiol.*, 109(1-2), 132-138.
- CARLIN, F., BRILLARD, J., BROUSSOLLE, V., CLAVEL, T., DUPORT, C., JOBIN, M., GUINEBRETIERE, M. H., AUGER, S., SOROKINE, A., and NGUYEN-THÉ, C. (2010). Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Res. Int.*, 43(7), 1885-1894.
- CASTIAUX, V., LIU, X., DELBRASSINNE, L., and MAHILLON, J. (2015). Is Cytotoxin K from *Bacillus cereus* a bona fide enterotoxin? *Int. J. Food Microbiol.*, 211, 79-85.
- CEUPPENS, S., RAJKOVIC, A., HEYNDRIX, M., TSILIA, V., VAN DE WIELE, T., BOON, N., and UYTENDAELE, M. (2011). Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Crit. Rev. Microbiol.*, 37(3), 188-213.
- CEUPPENS, S., BOON, N., and UYTENDAELE, M. (2013). Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 84(3), 433-450.

- CHATTOPADHYAY, A., BHATNAGAR, N. B., and BHATNAGAR, R. (2004). Bacterial insecticidal toxins. *Crit. Rev. Microbiol.*, 30(1), 33-54.
- CHAUFAUX, J. (1995). Utilisation de biopesticides contre les ravageurs des cultures : le point sur *Bacillus thuringiensis*. *Insectes (OPIE)*, 97, 2-6.
- CHIN, J. (2000). Control of communicable diseases manual. American Public Health Association, Washington, 624pp.
- CHO, S. H., KANG, S. H., LEE, Y. E., KIM, S. J., YOO, Y. B., BAK, Y. S., and KIM, J. B. (2015). Distribution of toxin genes and enterotoxins in *Bacillus thuringiensis* isolated from microbial insecticide products. *J Microbiol Biotechnol*, 25, 2043-2048.
- CHON, J. W., SONG, K. Y., KIM, H., and SEO, K. H. (2014). Comparison of 3 selective media for enumeration of *Bacillus cereus* in several food matrixes. *J. Food Sci.*, 79(12), 2280-2284.
- CLIVER, D. O., and RIEMANN, H. (2002). *Foodborne diseases*. Academic Press, 424pp.
- COLLIER, R. J., and YOUNG, J. A. (2003). Anthrax toxin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 19(1), 45-70.
- CONTZEN, M., HAILER, M., and RAU, J. (2014). Isolation of *Bacillus cytotoxicus* from various commercial potato products. *Int. J. Food Microbiol.*, 174, 19-22.
- COUVREUR, A. (2000). L'achat-plaisir dope la consommation. *Consommation et modes de vie CRÉDOC*. Available at : <http://www.credoc.fr/pdf/4p/146.pdf>
- D'ARIANE, F. (2013). Évaluation préalable de la souche *Bacillus cereus* (ATCC 14579). *Environnement Canada Santé Canada*. Available at : http://ec.gc.ca/ese-ees/E92D59D6-CC18-4483-9086-AC80D7788118/DSAR_Bacillus%20Cereus_FR.pdf
- DE BELLIS, P., MINERVINI, F., DI BIASE, M., VALERIO, F., LAVERMICOCCA, P., and SISTO, A. (2015). Toxigenic potential and heat survival of spore-forming bacteria isolated from bread and ingredients. *Int. J. Food Microbiol.*, 197, 30-39.
- DELBRASSINNE, L., and MAHILLON, J. (2015). *Bacillus*: occurrence. In *Encyclopedia of food and health*. CABALLERO, B., FINGLAS, P., and TOLDRA, F. Academic Press. 4006 pp.
- DELMAS, G., GALLAY, A., LE QUERREC, F., HAEGHEBAERT, S., ESPIÉ, E., DELAROCQUE-ASTAGNEAU, E., WEILL, F. X., HUBERT, B., BOUVET, P., DE VALK, H., VAILLANT, V., and DESENCLOS, J. C. (2006). Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1987 et 2002. *Virus*, 77(1), 055.
- DE VALK, H., and SALVAT, G. (2015). Alimentation et risques infectieux : enjeux et stratégies pour limiter l'impact sur la santé. *Les Tribunes de la santé*, (4), 61-68.
- DE VRIES, Y. P., ATMADJA, R. D., HORNSTRA, L. M., DE VOS, W. M., and ABEE, T. (2005). Influence of glutamate on growth, sporulation, and spore properties of *Bacillus cereus* ATCC 14579 in defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(6), 3248-3254.
- DERZELLE, S., GIRAULT, G., KOKOTOVIC, B., and ANGEN, Ø. (2015). Whole genome-sequencing and phylogenetic analysis of a historical collection of *Bacillus anthracis* strains from Danish cattle. *PLoS ONE*, 10(8), e0134699.
- DIERICK, K., VAN COILLIE, E., SWIECICKA, I., MEYFROIDT, G., DEVLIEGER, H., MEULEMANS, A., HOEDEMAEKERS, G., FOURIE, L., HEYNDRIKX, M., and MAHILLON, J. (2005). Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J. Clin. Microbiol.*, 43(8), 4277-4279.
- DI FRANCO, C., BECCARI, E., SANTINI, T., PISANESCHI, G., and TECCE, G. (2002). Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*. *BMC Microbiol.*, 2(1), 33.
- DOAN, C. H., and DAVIDSON, P. M. (2000). Microbiology of potatoes and potato products: a review. *J. Food Prot.*, 63(5), 668-683.
- DOLL, V. M., EHLING-SCHULZ, M., and VOGELMANN, R. (2013). Concerted action of sphingomyelinase and non-hemolytic enterotoxin in pathogenic *Bacillus cereus*. *PLoS ONE*, 8(4), e61404.
- DOUAMBA, Z. (2016). Détection et caractérisation de souches thermotolérantes de *Bacillus cereus* et de *Bacillus cytotoxicus* dans les matrices alimentaires. DIAL@UCL.
- DROBNIEWSKI, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6(4), 324-338.
- DROMIGNY, E. (2009). *Bacillus cereus*. Lavoisier, Paris, 400 pp.
- DUPORT, C., JOBIN, M., and SCHMITT, P. (2016). Adaptation in *Bacillus cereus*: from stress to disease. *Front. Microbiol.*, 7, 1550.
- EFSA. (2005). Opinion of the scientific panel on biological hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. *EFSA Journal*. 175, 1-48.
- EFSA and ECDC. (2015). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 2015, 13(12):4329, 191 pp.
- EFSA and ECDC. (2016). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2015. *EFSA Journal* 2016, 14(12):4634, 231 pp.

- EFSA and ECDC. (2017). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 2017,15(12):5077, 228 pp.
- EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal*, 14, 4524-1.
- EHLING-SCHULZ, M., FRICKER, M., and SCHERER, S. (2004a). *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol. Nutr. Food Res.*, 48(7), 479-487.
- EHLING-SCHULZ, M., FRICKER, M., and SCHERER, S. (2004b). Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiol. Lett.*, 232(2), 189-195.
- EHLING-SCHULZ, M., VUKOV, N., SCHULZ, A., SHAHEEN, R., ANDERSSON, M., MÄRTLBAUER, E., and SCHERER, S. (2005). Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(1), 105-113.
- EHLING-SCHULZ, M., GUINEBRETIERE, M. H., MONTHÁN, A., BERGE, O., FRICKER, M., and SVENSSON, B. (2006a). Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 260(2), 232-240.
- EHLING-SCHULZ, M., FRICKER, M., GRALLERT, H., RIECK, P., WAGNER, M., and SCHERER, S. (2006b). Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin pXO1. *BMC Microbiol.*, 6(1), 20.
- EHLING-SCHULZ, M., FRENZEL, E., and GOHAR, M. (2015). Food–bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.*, 6, 704.
- EIJLANDER, R. T., ABEE, T., and KUIPERS, O. P. (2011). Bacterial spores in food: how phenotypic variability complicates prediction of spore properties and bacterial behavior. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 22(2), 180-186.
- ENGLAND PUBLIC HEALTH. (2015). Identification of *Bacillus* species. Available at: <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>
- ERRINGTON, J. (1993). *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.*, 57(1), 1-33.
- FAGERLUND, A., WEEN, O., LUND, T., HARDY, S. P., and GRANUM, P. E. (2004). Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 150(8), 2689-2697.
- FAGERLUND, A., LINDBÄCK, T., STORSET, A. K., GRANUM, P. E., and HARDY, S. P. (2008). *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 154(3), 693-704.
- FAILLE, C., BÉNÉZECH, T., BLEL, W., RONSE, A., RONSE, G., CLARISSE, M., and SLOMIANNY, C. (2013). Role of mechanical vs. chemical action in the removal of adherent *Bacillus* spores during CIP procedures. *Food Microbiol.*, 33(2), 149-157.
- FERNÁNDEZ, A., OCIO, M. J., FERNÁNDEZ, P. S., and MARTINEZ, A. (2001). Effect of heat activation and inactivation conditions on germination and thermal resistance parameters of *Bacillus cereus* spores. *Int. J. Food Microbiol.*, 63(3), 257-264.
- FIEDORUK, K., DREWNOWSKA, J. M., DANILUK, T., LESZCZYNSKA, K., IWANIUK, P., and SWIECICKA, I. (2017). Ribosomal background of the *Bacillus cereus* group thermotypes. *Sci. Rep.*, 7, 46430.
- FINLAY, W. J. J., LOGAN, N. A., and SUTHERLAND, A. D. (2000). *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. *Lett. Appl. Microbiol.*, 31(5), 385-389.
- FOGELE, B., GRANTA, R., VALCIŃA, O., and BĚRZIŇŠ, A. (2018). Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. *Food Control*, 83, 69-74.
- FORSYTHE, S.J. (2010). The microbiology of safe food. Wiley-Blackwell, United Kingdom, 424 pp.
- FOSTER, S. J., and JOHNSTONE, K. (1990). Pulling the trigger: the mechanism of bacterial spore germination. *Mol. Microbiol.*, 4(1), 137-141.
- FRANKLAND, G. C., and FRANKLAND, P. F. (1887). Studies on some new micro-organisms obtained from air. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 178, 257-287.
- FRENTZEL, H., THANH, M. D., KRAUSE, G., APPEL, B., and MADER, A. (2018). Quantification and differentiation of *Bacillus cereus* group species in spices and herbs by real-time PCR. *Food Control*, 83, 99-108.
- FRICKER, M., MESSELHÄUßER, U., BUSCH, U., SCHERER, S., and EHLING-SCHULZ, M. (2007). Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(6), 1892-1898.
- FRICKER, M., REISSBRODT, R., and EHLING-SCHULZ, M. (2008). Evaluation of standard and new chromogenic selective plating media for isolation and identification of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 121(1), 27-34.
- FRIEBE, S., VAN DER GOOT, F. G., and BÜRGI, J. (2016). The ins and outs of anthrax toxin. *Toxins*, 8(3), 69.

- GAVIRIA RIVERA, A. M., GRANUM, P. E., and PRIEST, F. G. (2000). Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 190(1), 151-155.
- GDOURA-BEN AMOR, M., SIALA, M., ZAYANI, M., GROSSET, N., SMAOUI, S., MESSADI-AKROUT, F., BARON, F., JAN, S., GAUTIER, M., and GDOURA, R. (2018). Isolation, identification, prevalence, and genetic diversity of *Bacillus cereus* group bacteria from different foodstuffs in Tunisia. *Front. Microbiol.*, 9(447).
- GLASSET, B., HERBIN, S., GUILLIER, L., CADEL-SIX, S., VIGNAUD, M. L., GROUT, J., PAIRAUD, S., MICHEL, V., HENNEKINNE, J. A., RAMARAO, N., and BRISABOIS, A. (2016). *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation. *Euro Surveill.*, 21(48).
- GOEPFERT, J. M., SPIRA, W. M., and KIM, H. U. (1972). *Bacillus cereus*: food poisoning organism. A review. *J. Milk Food Technol.*, 35(4), 213-227.
- GOULD, G. W. (2006). History of science - spores. *J. Appl. Microbiol.*, 101(3), 507-513.
- GRANUM, P. E., and LINDBÄCK T. (2012). *Bacillus cereus*. In *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. DOYLE, M. P., and BUCHANAN, R. L. ASM Press, Washington, 1138 pp.
- GRANUM, P. E., and LUND, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 157(2), 223-228.
- GUINEBRETIÈRE, M. H., FAGERLUND, A., GRANUM, P. E., and NGUYEN-THE, C. (2006). Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system. *FEMS Microbiol. Lett.*, 259(1), 74-80.
- GUINEBRETIÈRE, M. H., THOMPSON, F. L., SOROKIN, A., NORMAND, P., DAWYNDT, P., EHLING-SCHULZ, M., SVENSSON, B., SANCHIS, V., NGUYEN-THE, C., HEYNDRIKX, M., and DE VOS, P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environ. Microbiol.*, 10(4), 851-865.
- GUINEBRETIÈRE, M. H., VELGE, P., COUVERT, O., CARLIN, F., and DEBUYSER, M. L. (2010). Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *J. Clin. Microbiol.*, 48(9), 3388-3391.
- GUINEBRETIÈRE, M. H., AUGER, S., GALLERON, N., CONTZEN, M., DE SARRAU, B., DE BUYSER, M. L., LAMBERET, G., FAGERLUND, A., GRANUM, P. E., LERECLUS, D., DE VOS, P., NGUYEN-THE, C., and SOROKIN, A. (2013). *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63(1), 31-40.
- HÄGGBLUM, M. M., APETROAIE, C., ANDERSSON, M. A., and SALKINOJA-SALONEN, M. S. (2002). Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(5), 2479-2483.
- HAUG, T. M., SAND, S. L., SAND, O., PHUNG, D., GRANUM, P. E., and HARDY, S. P. (2010). Formation of very large conductance channels by *Bacillus cereus* Nhe in Vero and GH 4 cells identifies NheA+ B as the inherent pore-forming structure. *J. Membr. Biol.*, 237(1), 1-11.
- HANSON, M. L., WENDORFF, W. L., and HOUCK, K. B. (2005). Effect of heat treatment of milk on activation of *Bacillus* spores. *J. Food Prot.*, 68(7), 1484-1486.
- HARDY, S. P., LUND, T., and GRANUM, P. E. (2001). CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS Microbiol. Lett.*, 197(1), 47-51.
- HAUGE, S. (1955). Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli. *J. Appl. Microbiol.*, 18(3), 591-595.
- HAYRAPETYAN, H., ABEE, T., and GROOT, M. N. (2016). Sporulation dynamics and spore heat resistance in wet and dry biofilms of *Bacillus cereus*. *Food Control*, 60, 493-499.
- HELGASON, E., ØKSTAD, O.A., CAUGANT, D.A., JOHANSEN, H.A., FOUET, A., MOCK, M., HEGNA, I., and KOLSTØ, A. B. (2000a). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*-one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(6), 2627-2630.
- HELGASON, E., CAUGANT, D. A., OLSEN, I., and KOLSTØ, A. B. (2000b). Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. *J. Clin. Microbiol.*, 38(4), 1615-1622.
- HENDERSON, I., DUGGLEBY, C. J., and TURNBULL, P. C. B. (1994). Differentiation of *Bacillus anthracis* from other *Bacillus cereus* group bacteria with the PCR. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 44(1), 99-105.
- HERNANDEZ, E., RAMISSE, F., CRUEL, T., LE VAGUERESSE, R., and CAVALLO, J. D. (1999). *Bacillus thuringiensis* serotype H34 isolated from human and insecticidal strains serotypes 3a3b and H14 can lead to death of immunocompetent mice after pulmonary infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 24(1), 43-47.
- HILBERT, D. W., and PIGGOT, P. J. (2004). Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68(2), 234-262.
- HORWOOD, P. F., BURGESS, G. W., and JANE OAKLEY, H. (2004). Evidence for non-ribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 236(2), 319-324.

- HOTON, F. M., ANDRUP, L., SWIECICKA, I., and MAHILLON, J. (2005). The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 151(7), 2121-2124.
- HOTON, F. M., FORNELOS, N., N'GUESSAN, E., HU, X., SWIECICKA, I., DIERICK, K., JÄÄSKELÄINEN E, SALKINOJA-SALONEN M, and MAHILLON, J. (2009). Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* cereulide-producing strains. *Environ. Microbiol. Rep.*, 1(3), 177-183.
- HU, X., HANSEN, B. M., EILENBERG, J., HENDRIKSEN, N. B., SMIDT, L., YUAN, Z., and JENSEN, G. B. (2004). Conjugative transfer, stability and expression of a plasmid encoding a *cry1Ac* gene in *Bacillus cereus* group strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 231(1), 45-52.
- HUGH-JONES, M. (1999). 1996-97 global anthrax report. *J. Appl. Microbiol.*, 87(2), 189-191.
- HUGH-JONES, M. E., and DE VOS, V. (2002). Anthrax and wildlife. *Rev. - Off. Int. Epizoot.*, 21(1), 359-384.
- IMPERIALE, M. J., and CASADEVALL, A. (2011). Bioterrorism: lessons learned since the anthrax mailings. *mBio*, 2(6), e00232e11.
- INGLESBY, T. V., O'TOOLE, T., HENDERSON, D. A., BARTLETT, J. G., ASCHER, M. S., EITZEN, E., FRIEDLANDER, A. M., GERBERDING, J., HAUER, J., HUGHES, J., MCDADE, J., OSTERHOLM, M. T., PARKER, G., PERL, T. M., RUSSELL, P. K., and TONAT, K. (2002). Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *JAMA*, 287(17), 2236-2252.
- IRENGE, L. M., and GALA, J. L. (2012). Rapid detection methods for *Bacillus anthracis* in environmental samples: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93(4), 1411-1422.
- ISO. (2004). ISO 7932:2004, Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* - colony count technique at 30 °C. International Organization for Standardization.
- JÄÄSKELÄINEN, E. L., HÄGGBLUM, M. M., ANDERSSON, M. A., and SALKINOJA-SALONEN, M. S. (2004). Atmospheric oxygen and other conditions affecting the production of cereulide by *Bacillus cereus* in food. *Int. J. Food Microbiol.*, 96(1), 75-83.
- JAY, J. M., LOESSNER, M. J., and GOLDEN, D. A. (2005). Food poisoning caused by gram-positive sporeforming bacteria. In *Modern Food Microbiology*. Springer Science & Business Media, Boston, 790 pp.
- JENSEN, G. B., HANSEN, B. M., EILENBERG, J., and MAHILLON, J. (2003). The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ. Microbiol.*, 5(8), 631-640.
- JERNIGAN, D. B., RAGHUNATHAN, P. L., BELL, B. P., BRECHNER, R., BRESNITZ, E. A., BUTLER, J. C., CETRON, M., COHEN, M., DOYLE, T., FISCHER, M., GREENE, C., GRIFFITH, K. S., GUARNER, J., HADLER, J. L., HAYSLETT, J. A., MEYER, R., PETERSEN, L. R., PHILLIPS, M., PINNER, R., POPOVIC, T., QUINN, C. P., REEFHUIS, J., REISSMAN, D., ROSENSTEIN, N., SCHUCHAT, A., SHIEH, W. J., SIEGAL, L., SWERDLOW, D. L., TENOVER, F. C., TRAEGER, M., WARD J. W., WEISFUSE, I., WIERSMA, S., YESKEY, K., ZAKI, S., ASHFORD, D. A., PERKINS, B. A., OSTROFF, S., HUGHES, J., FLEMING, D., KOPLAN, J. P., and GERBERDING, J. L. (2002). Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerging Infect. Dis.*, 8(10), 1019.
- JIMÉNEZ, G., URDIAIN, M., CIFUENTES, A., LÓPEZ-LÓPEZ, A., BLANCH, A. R., TAMAMES, J., KÄMPFER, P., KOLSTØ, A. B., RAMÓN, D., MARTÍNEZ, J. F., CODONER, F. M., and ROSSELLÓ-MÓRA, R. (2013). Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst. Appl. Microbiol.*, 36(6), 383-391.
- JOHN, J., ROEDIGER, K., SCHROEDL, W., ALDAHER, N., and VERVUERT, I. (2015). Development of intestinal microflora and occurrence of diarrhoea in sucking foals: effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* supplementation. *BMC Vet. Res.*, 11(1), 34.
- JUNG, M. Y., PAEK, W. K., PARK, I. S., HAN, J. R., SIN, Y., PAEK, J., RHEE, M. S., KIM, H., SONG, H.S., and CHANG, Y.H. (2010). *Bacillus gaemokensis* sp. nov., isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea. *J. Microbiol.*, 48(6), 867-871.
- JUNG, M. Y., KIM, J. S., PAEK, W. K., LIM, J., LEE, H., KIM, P. I., MA, J.Y., KIM, W., and CHANG, Y.H. (2011). *Bacillus maniponensis* sp. nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment. *J. Microbiol.*, 49(6), 1027-1032.
- KAKADE, R. H., DAS, H., and ALI, S. (2011). Performance evaluation of a double drum dryer for potato flake production. *J. Food. Sci. Technol.*, 48(4), 432-439.
- KALYOUSSEF, S., and FEJA, K. N. (2014). Foodborne illnesses. *Adv. Pediatr.*, 61(1), 287-312.
- KLEE, S. R., BRZUSZKIEWICZ, E. B., NATTERMANN, H., BRÜGGEMANN, H., DUPKE, S., WOLLHERR, A., FRANZ T, PAULI, G., APPEL, B., LIEBL, W., COUACY-HYMAN, E., BOESCH, C., MEYER, F. D., LEENDERTZ, F. H., ELLERBROK, H., GOTTSCHALK, G., GRUNOW, R., and LIESEGANG, H. (2010). The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. *PLoS ONE*, 5(7), e10986.

- KOCH, R. (1962). The etiology of anthrax, based on the life history of *Bacillus anthracis*. In *Milestones in Microbiology*. BROCK, T. D. Prentice-Hall International, 275 pp.
- KOTIRANTA, A., LOUNATMAA, K., and HAAPASALO, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect.*, 2(2), 189-198.
- KRAMER, J. M., and GILBERT, R. J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In *Food-borne bacterial pathogens*. DOYLE, M.P. CRC Press, New York, 816 pp.
- KUTIMA, P. M., and FOEGEDING, P. M. (1987). Involvement of the spore coat in germination of *Bacillus cereus* T spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(1), 47-52.
- LAPIDUS, A., GOLTSMAN, E., AUGER, S., GALLERON, N., SÉGURENS, B., DOSSAT, C., LAND M. L., BROUSSOLLE, V., BRILLARD, J., GUINEBRETIERE, M. H., SANCHIS, V., NGUEN-THE, C., LERECLUS, D., RICHARDSON, P., WINCKER, P., WEISSENBAACH, J., EHRLICH, S. D., and SOROKIN, A. (2008). Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chem. Biol. Interact.*, 171(2), 236-249.
- LECHNER, S., MAYR, R., FRANCIS, K. P., PRÜß, B.M., KAPLAN, T., WIEßNER-GUNKEL, E., STEWART, G. S., and SCHERER, A. B. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 48(4), 1373-1382.
- LEGGETT, M. J., MCDONNELL, G., DENYER, S. P., SETLOW, P., and MAILLARD, J. Y. (2012). Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *J. Appl. Microbiol.*, 113(3), 485-498.
- LE LOIR, Y., BARON, F., and GAUTIER, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*, 2(1), 63-76.
- LEVY, H., GLINERT, I., WEISS, S., SITTNER, A., SCHLOMOVITZ, J., ALTBOUM, Z., and KOBILER, D. (2014). Toxin-independent virulence of *Bacillus anthracis* in rabbits. *PloS ONE*, 9(1), e84947.
- LIMA, L. J., KAMPHUIS, H. J., NOUT, M. R., and ZWIETERING, M. H. (2011). Microbiota of cocoa powder with particular reference to aerobic thermoresistant spore-formers. *Food Microbiol.*, 28(3), 573-582.
- LIMA, L. J., VAN DER VELPEN, V., WOLKERS-ROOIJACKERS, J., KAMPHUIS, H. J., ZWIETERING, M. H., and NOUT, M. R. (2012). Microbiota dynamics and diversity at different stages of industrial processing of cocoa beans into cocoa powder. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(8), 2904-2913.
- LINDBÄCK, T., and GRANUM, P. E. (2013). *Bacillus cereus*. In *Guide to Foodborne Pathogens*. LABBÉ, R.G., and GARCÍA, S. Wiley-Blackwell, 484 pp.
- LINDBÄCK, T., and GRANUM, P. E. (2015). 29 - *Bacillus cereus* phospholipases, enterotoxins, and other hemolysins. In *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. ALOUF, J., LADANT, D., and POPOFF, M. Elsevier, Boston, 1200 pp.
- LIU, B., LIU, G. H., HU, G. P., CETIN, S., LIN, N. Q., TANG, J. Y., TANG, W. Q., and LIN, Y.Z. (2014). *Bacillus bingmayongensis* sp. nov., isolated from the pit soil of Emperor Qin's Terra-cotta warriors in China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 105(3), 501-510.
- LIU, Y., LAI, Q., GÖKER, M., MEIER-KOLTHOFF, J. P., WANG, M., SUN, Y., WANG, L., and SHAO, Z. (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Sci. Rep.*, 5, 14082.
- LNR TIA (2014). Annual Report on foodborne outbreaks in Belgium 2013, Scientific Institute of Public Health. Available at: http://www.afsca.be/professionnels/publications/thematiques/intoxications-alimentaires-belgique/_documents/Toxi-infectionsalimentairesenBelgiqueen2013.pdf
- LNR TIA (2015). Annual Report on foodborne outbreaks in Belgium 2014, Scientific Institute of Public Health. Available at: http://www.favv-afsca.fgov.be/professionnels/publications/thematiques/intoxications-alimentaires-belgique/_documents/2015-09_jaarverslagboekje_VTI2015_vfinal_fr.pdf
- LNR TIA (2016). Annual Report on foodborne outbreaks in Belgium 2015, Scientific Institute of Public Health. Available at: http://www.afsca.be/professionnels/publications/thematiques/intoxications-alimentaires-belgique/_documents/jaarverslagboekjeVTI2015_vfinal_FR.pdf
- LNR TIA (2017). Annual Report on foodborne outbreaks in Belgium 2016, Scientific Institute of Public Health. Available at: https://www.sciensano.be/sites/www.wiv-isp.be/files/jaarverslagboekje_vti2016_vfinal_fr.pdf
- LOGAN, N. A. (2012). *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J. Appl. Microbiol.*, 112(3), 417-429.
- LOGAN, N. A., and DE VOS, P. (2015). *Bacillus*. In *Bergey's manual of systematic of Archaea and Bacteria*. Whitman, W. B. Wiley-Blackwell.
- LÜCKING, G., FRENZEL, E., RÜTSCHLE, A., MARXEN, S., STARK, T. D., HOFMANN, T. SCHERER, S., and EHLING-SCHULZ, M. (2015). Ces locus embedded proteins control the non-ribosomal synthesis of the cereulide toxin in emetic *Bacillus cereus* on multiple levels. *Front. Microbiol.*, 6, 1101.

- LUND, T., DE BUYSER, M. L., and GRANUM, P. E. (2000). A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.*, 38(2), 254-261.
- LUU-THI, H., KHADKA, D. B., and MICHIELS, C. W. (2014). Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 189, 183-188.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., and PARKER, J. (1997). *Brock biology of microorganisms*. Prentice Hall, 912 pp.
- MAHLER, H., PASI, A., KRAMER, J. M., SCHULTE, P., SCOGING, A. C., BÄR, W., and KRÄHENBÜHL, S. (1997). Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *N. Engl. J. Med.*, 336(16), 1142-1148.
- MANGEN, M. J. J., BOUWKNEGT, M., FRIESEMA, I. H., HAAGSMA, J. A., KORTBEEK, L. M., TARIQ, L., WILSON, M., VAN PELT, W., and HAVELAAR, A. H. (2015). Cost-of-illness and disease burden of food-related pathogens in the Netherlands, 2011. *Int. J. Food Microbiol.*, 196, 84-93.
- MARLEY, E. F., SAINI, N. K., VENKATRAMAN, C., and ORENSTEIN, J. M. (1995). Fatal *Bacillus cereus* meningoencephalitis in an adult with acute myelogenous leukemia. *South. Med. J.*, 88(9), 969-972.
- MAUGHAN, H., and VAN DER AUWERA, G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infect. Genet. Evol.*, 11(5), 789-797.
- MCINTYRE, L., BERNARD, K., BENIAC, D., ISAAC-RENTON, J. L., and NASEBY, D. C. (2008). Identification of *Bacillus cereus* group species associated with food poisoning outbreaks in British Columbia, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(23), 7451-7453.
- MCKILLIP, J. L. (2000). Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 77(4), 393-399.
- MEAD, P. S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCAIG, L. F., BRESEE, J. S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P. M., and TAUXE, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infect. Dis.*, 5(5), 607.
- MILLER, R. A., BENO, S. M., KENT, D. J., CARROLL, L. M., MARTIN, N. H., BOOR, K. J., and KOVAC, J. (2016). *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66(11), 4744-4753.
- MOCK, M., and FOUET, A. (2001). Anthrax. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55(1), 647-671.
- MOCK, M., and MIGNOT, T. (2003). Anthrax toxins and the host: a story of intimacy. *Cell. Microbiol.*, 5(1), 15-23.
- MOIR, A. (2006). How do spores germinate? *J. Appl. Microbiol.*, 101(3), 526-530.
- MOIR, A. and COOPER, G. (2015). Spore germination. *Microbiol. Spectr.*, 3(6).
- MORRIS, J. G. (1981). *Bacillus cereus* food poisoning. *Arch. Intern. Med.*, 141(6), 711.
- MORTIMER, P. R., and MCCANN, G. (1974). Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. *Lancet*, 303(7865), 1043-1045.
- MOSSEL, D. A. A., KOOPMAN, M. J., and JONGERIUS, E. (1967). Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Appl. Microbiol.*, 15(3), 650-653.
- NAKAMURA, L. K., and JACKSON, M. A. (1995). Clarification of the taxonomy of *Bacillus mycoides*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 45(1), 46-49.
- NAKAMURA, L. K. (1998). *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 48(3), 1031-1035.
- NARANJO, M., DENAYER, S., BOTTELDOORN, N., DELBRASSINNE, L., VEYS, J., WAEGENAERE, J., SIRTAINÉ, N., DRIESEN, R. B., SIPIDO, K. R., MAHILLON, J., and DIERICK, K. (2011). Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning. *J. Clin. Microbiol.*, 49(12), 4379-4381.
- NEWELL, D. G., KOOPMANS, M., VERHOEF, L., DUIZER, E., AIDARA-KANE, A., SPRONG, H., OPSTEEGH, M., LANGELAAR, M., THREFALL, J., SCHEUTZ, F., VAN DER GIESSEN, J., and KRUSE, H. (2010). Food-borne diseases—the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int. J. Food Microbiol.*, 139, S3-S15.
- NYACHUBA, D. G. (2010). Foodborne illness: is it on the rise? *Nutr. Rev.*, 68(5), 257-269.
- OH, M. H., HAM, J. S., and COX, J. M. (2012). Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Food Microbiol.*, 152(1-2), 1-8.
- OKINAKA, R. T., and KEIM, P. (2016). The phylogeny of *Bacillus cereus sensu lato*. In *The Bacterial Spore: from Molecules to Systems*. DRIKS, A., and EICHENBERGER, P. ASM Press, Washington, 397 pp.
- OLTUSZAK-WALCZAK, E., and WALCZAK, P. (2013). PCR detection of *cytK* gene in *Bacillus cereus* group strains isolated from food samples. *J. Microbiol. Methods*, 95(2), 295-301.
- OMS (2002). La stratégie mondiale de l'OMS pour la salubrité des aliments : une alimentation à moindre risque pour une meilleure santé. Available at : <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42706/9242545740.pdf?sequence=1>

- OMS (2015). Estimations par l'OMS de la charge mondiale des maladies d'origine alimentaire. Available at: http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/maladies-alimentaires-general.pdf?ua=1
- ORWA, J. A., GOVAERTS, C., GEVERS, K., ROETS, E., VAN SCHEPDAEL, A., and HOOGMARTENS, J. (2002). Study of the stability of polymyxins B1, E1 and E2 in aqueous solution using liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 29(1-2), 203-212.
- OSIMANI, A., AQUILANTI, L., and CLEMENTI, F. (2018). *Bacillus cereus* foodborne outbreaks in mass catering. *Int. J. Hosp. Manag.*, 72, 145-153.
- PAIDHUNGAT, M., and SETLOW, P. (2002). Spore germination and outgrowth. In *Bacillus subtilis and its Relatives: From Genes to Cells*. HOCH, J. A., LOSICK, R., and SONENSHEIN, A. L. ASM Press, Washington, 646 pp.
- PAINTER, J. A., HOEKSTRA, R. M., AYERS, T., TAUXE, R. V., BRADEN, C. R., ANGULO, F. J., and GRIFFIN, P. M. (2013). Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008. *Emerging Infect. Dis.*, 19(3), 407.
- PALMA, L., MUÑOZ, D., BERRY, C., MURILLO, J., and CABALLERO, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins (Basel)*, 6(12), 3296-3325.
- PALMISANO, M. M., NAKAMURA, L. K., DUNCAN, K. E., ISTOCK, C. A., and COHAN, F. M. (2001). *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51(5), 1671-1679.
- PATINO-NAVARRETE, R., and SANCHIS, V. (2017). Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. *Res. Microbiol.*, 168(4), 309-318.
- PEREIRA, A. P. M., and SANT'ANA, A. S. (2018). Diversity and fate of spore forming bacteria in cocoa powder, milk powder, starch and sugar during processing: A review. *Trends Food Sci. Technol.*, 76, 101-118.
- PIGNATELLI, M., MOYA, A., and TAMAMES, J. (2009). EnvDB, a database for describing the environmental distribution of prokaryotic taxa. *Environ. Microbiol. Rep.*, 1(3), 191-197.
- PIRTTIJÄRVI, T. S., ANDERSSON, M. A., SCOGING, A. C., and SALKINOJA-SALONEN, M. S. (1999). Evaluation of methods for recognising strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. *Syst. Appl. Microbiol.*, 22(1), 133-144.
- PITT, T. L., MCCLURE, J., PARKER, M. D., AMÉZQUITA, A., and MCCLURE, P. J. (2015). *Bacillus cereus* in personal care products: risk to consumers. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 37(2), 165-174.
- PLANCHON, S., DARGAIGNARATZ, C., LEVY, C., GINIES, C., BROUSSOLLE, V., and CARLIN, F. (2011). Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10°C and 30°C display variations in their properties. *Food Microbiol.*, 28(2), 291-297.
- POSTOLLEC, F., MATHOT, A. G., BERNARD, M., DIVANACH, M. L., PAVAN, S., and SOHIER, D. (2012). Tracking spore-forming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes. *Int. J. Food Microbiol.*, 158(1), 1-8.
- PRIEST, F. G., BARKER, M., BAILLIE, L. W., HOLMES, E. C., and MAIDEN, M. C. (2004). Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J. Bacteriol.*, 186(23), 7959-7970.
- RAHMAN, M. S., and LABUZA, T. P. (2007). Water activity and food preservation. In *Handbook of food preservation*. RAHMAN, M. S. CRC Press, 1088 pp.
- RAJKOVIC, A., UYTENDAELE, M., DIERICK, K., SAMAPUNDO, S., BOTTELDOORN, N., MAHILLON, J., and HEYNDRICKX, M. (2008a). Risk profile of the *Bacillus cereus* group implicated in food poisoning. *Report for the Superior Health Council Belgium*. CSS-HGR, 8316. Available at: https://www.health.belgium.be/sites/default/files/uploads/fields/fpshealth_theme_file/19060475/Risico-profiel%20voor%20Bacillus%20cereus%20Groep%20in%20voedsel%20toxi-infecties%3A%20situatie%20in%20Belgi%C3%AB%20en%20aanbevelingen%20%5BBijlage%5D%20%28januari%202010%29%20%28HGR%208316%29.pdf
- RAJKOVIC, A., UYTENDAELE, M., VERMEULEN, A., ANDJELKOVIC, M., FITZ-JAMES, I., IN 'T VELD, P., DENON, Q., VÉRHE, R., and DEBEVERE, J. (2008b). Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Lett. Appl. Microbiol.*, 46(5), 536-541.
- RAMARAO, N., and SANCHIS, V. (2013). The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review. *Toxins (Basel)*, 5(6), 1119-1139.
- RAMISSE, V., PATRA, G., GARRIGUE, H., GUESDON, J. L., and MOCK, M. (1996). Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 145(1), 9-16.
- RASKO, D. A., ALTHERR, M. R., HAN, C. S., and RAVEL, J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29(2), 303-329.

- ROBERTS, M., ROWLEY, G. KORMANEC, J. and ZALM, M. E. J. (2017). The role of alternative sigma factors in pathogen virulence. In *Foodborne pathogens: virulence factors and host susceptibility*. GURTNER, J. B., DOYLE, M. P., and KORNACKI, J. L. Springer, 652 pp.
- ROSENQUIST, H., SMIDT, L., ANDERSEN, S. R., JENSEN, G. B., and WILCKES, A. (2005). Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiol. Lett.*, 250(1), 129-136.
- RØSSLAND, E., BORGE, G. I. A., LANGSRUD, T., and SØRHAUG, T. (2003). Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 89(2-3), 205-212.
- ROZIN, P. (2005). The meaning of food in our lives: a cross-cultural perspective on eating and well-being. *J. Nutr. Educ. Behav.*, 37, 107-112.
- RYU, J. H., and BEUCHAT, L. R. (2005). Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless-steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *J. Food Prot.*, 68(12), 2614-2622.
- SADIQ, F. A., LI, Y., LIU, T., FLINT, S., ZHANG, G., YUAN, L., PEI, Z., and HE, G. (2016). The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *Int. J. Food Microbiol.*, 238, 193-201.
- SAMAPUNDO, S., EVERAERT, H., WANDUTU, J. N., RAJKOVIC, A., UYTENDAELE, M., and DEVLIEGHERE, F. (2011a). The influence of headspace and dissolved oxygen level on growth and haemolytic BL enterotoxin production of a psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* isolate on potato based ready-to-eat food products. *Food Microbiol.*, 28(2), 298-304.
- SAMAPUNDO, S., HEYNDRIKX, M., XHAFFERI, R., and DEVLIEGHERE, F. (2011b). Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *Int. J. Food Microbiol.*, 150(1), 34-41.
- SAMAPUNDO, S., HEYNDRIKX, M., XHAFFERI, R., and DEVLIEGHERE, F. (2011c). Validated empirical models describing the combined effect of water activity and pH on the heat resistance of spores of a psychrotolerant *Bacillus cereus* strain in broth and Béchamel sauce. *J. Food Prot.*, 74(10), 1662-1669.
- SAMAPUNDO, S., HEYNDRIKX, M., XHAFFERI, R., DE BAENST, I., and DEVLIEGHERE, F. (2014). The combined effect of pasteurization intensity, water activity, pH and incubation temperature on the survival and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus pumilus* in artificial media and food products. *Int. J. Food Microbiol.*, 181, 10-18.
- SANCHIS, V. (2010). From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 31, 217-231.
- SCHNEPF, E., CRICKMORE, N. V., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D. R., and DEAN, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3), 775-806.
- SCHOLTHOF, K. B. G. (2007). The disease triangle: pathogens, the environment and society. *Nat. Rev. Microbiol.*, 5(2), 152.
- SCHOENI, J. L., and LEE WONG, A. C. (2005). *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J. Food Prot.*, 68(3), 636-648.
- SCHRAFT, H., and GRIFFITHS, M. W. (2006). *Bacillus cereus* gastroenteritis. In *Foodborne Infections and Intoxications*. CLIVER, D. O., POTTER, M., and RIEMANN, H. P. Elsevier, 928 pp.
- SENESE, S., and GHELARDI, E. (2010). Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. *Toxins (Basel)*, 2(7), 1690-1703.
- SETLOW, P. (2003). Spore germination. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6(6), 550-556.
- SETLOW, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol.*, 101(3), 514-525.
- SETLOW, P., and JOHNSON, E. A. (2012). Spores and their significance. In *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. DOYLE, M. P., and BUCHANAN, R. L. ASM Press, Washington, 1138 pp.
- SETLOW, P. (2016). Spore resistance properties. In *The bacterial spore: from molecules to systems*. DRIKS, A., and EICHENBERGER, P. ASM Press, Washington, 397 pp.
- SHIMOYAMA, Y., UMEGAKI, O., OOI, Y., AGUI, T., KADONO, N., and MINAMI, T. (2017). *Bacillus cereus* pneumonia in an immunocompetent patient: a case report. *JA Clin. Rep.*, 3(1), 25.
- SIX, S. C., BUYSER, M., VIGNAUD, M., DAO, T. T., MESSIO, S., and PAYRAUD, S. (2012). Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus*: bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. *Bull. Épidémiol. Santé Anim. Aliment.*, 50, 57-61.
- SLIMAN, R., REHM, S., and SHLAES, D. M. (1987). Serious infections caused by *Bacillus* species. *Medicine (Baltimore)*, 66(3), 218-223.

- SONI, A., OEY, I., SILCOCK, P., and BREMER, P. (2016). *Bacillus* spores in the food industry: a review on resistance and response to novel inactivation technologies. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 15(6), 1139-1148.
- SONI, A., OEY, I., SILCOCK, P., and BREMER, P. J. (2018). Impact of temperature, nutrients, pH and cold storage on the germination, growth and resistance of *Bacillus cereus* spores in egg white. *Food Res. Int.*, 106, 394-403.
- STEEN, M. K., BRUNO-MURTHA, L. A., CHAUX, G., LAZAR, H., BERNARD, S., and SULIS, C. (1992). *Bacillus cereus* endocarditis: report of a case and review. *Clin. Infect. Dis.*, 14(4), 945-946.
- STENFORS, L. P., and GRANUM, P. E. (2001). Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 197(2), 223-228.
- STENFORS, L. P., MAYR, R., SCHERER, S., and GRANUM, P. E. (2002). Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 215(1), 47-51.
- STENFORS ARNESEN, L. P., FAGERLUND, A., and GRANUM, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32(4), 579-606.
- STEWART, G. C. (2015). The exosporium layer of bacterial spores: a connection to the environment and the infected host. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 79(4), 437-457.
- STRAGIER, P., and LOSICK, R. (1996). Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.*, 30(1), 297-341.
- SUNDE, E. P., SETLOW, P., HEDERSTEDT, L., and HALLE, B. (2009). The physical state of water in bacterial spores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106(46), 19334-19339.
- SWIECICKA, I., and MAHILLON, J. (2006). Diversity of commensal *Bacillus cereus sensu lato* isolated from the common sow bug (Porcellio scaber, Isopoda). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 56(1), 132-140.
- TAKABE, F., and OYA, M. (1976). An autopsy case of food poisoning associated with *Bacillus cereus*. *Forensic Sci.*, 7(2), 97-101.
- TEPLOVA, V. V., MIKKOLA, R., TONSHIN, A. A., SARIS, N. E. L., and SALKINOJA-SALONEN, M. S. (2006). The higher toxicity of cereulide relative to valinomycin is due to its higher affinity for potassium at physiological plasma concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 210(1-2), 39-46.
- TEWARI, A., and ABDULLAH, S. (2015). *Bacillus cereus* food poisoning: international and Indian perspective. *J. Food. Sci. Technol.*, 52(5), 2500-2511.
- TEYSSOU, R., HANCE, R., NICAND, E., NIZOU, J. Y., and BUISSON, Y. (1998). Les infections à *Bacillus cereus*: bactériologie, clinique et traitement. *La Lettre de l'infectiologue*, 13(3), 99-104.
- THORSEN, L., BUDDE, B. B., HENRICHSEN, L., MARTINUSSEN, T., and JAKOBSEN, M. (2009). Cereulide formation by *Bacillus weihenstephanensis* and mesophilic emetic *Bacillus cereus* at temperature abuse depends on pre-incubation conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 134(1-2), 133-139.
- THORSEN, L., KANDO, C. K., SAWADOGO, H., LARSEN, N., DIAWARA, B., OUÉDRAOGO, G. A., HENDRIKSEN, N. B., and JESPERSEN, L. (2015). Characteristics and phylogeny of *Bacillus cereus* strains isolated from Maari, a traditional West African food condiment. *Int. J. Food Microbiol.*, 196, 70-78.
- TODD, E. C. (2011). Procedures to investigate foodborne illness. Springer Science & Business Media, Boston, 167 pp.
- TOURASSE, N. J., HELGASON, E., ØKSTAD, O. A., HEGNA, I. K., and KOLSTØ, A. B. (2006). The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. *J. Appl. Microbiol.*, 101(3), 579-593.
- TURNBULL, P. C., KRAMER, J. M., JØRGENSEN, K., GILBERT, R. J., and MELLING, J. (1979). Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32(1), 219-228.
- TURNBULL, P. C., KRAMER, J. M., and MELLING, J. (1996). *Bacillus*. In *Medical microbiology*. BARON, S. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1262 pp.
- TURNER, N. J., WHYTE, R., HUDSON, J. A., and KALTOVEI, S. L. (2006). Presence and growth of *Bacillus cereus* in dehydrated potato flakes and hot-held, ready-to-eat potato products purchased in New Zealand. *J. Food Prot.*, 69(5), 1173-1177.
- US FDA/CFSAN (2006). Bad bug book: handbook of foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. Available at: <https://www.fda.gov/downloads/food/foodsafety/foodborneillness/foodborneillnessfoodbornepathogensnaturaltoxins/badbugbook/ucm297627.pdf>
- VACHON, V., LAPRADE, R., and SCHWARTZ, J. L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *J. Invertebr. Pathol.*, 111(1), 1-12.
- VACLAVIK, V., and CHRISTIAN, E.W. (2014). Essentials of food science. Springer, New-York, 495 pp.
- VAILLANT, V., DE VALK, H., and SAURA, C. (2012). Systèmes de surveillance des maladies d'origine alimentaire : sources, méthodes, apports, limites. *Santé animale-alimentation*, 3.

- VAN DER AUWERA, G. A., FELDGARDEN, M., KOLTER, R., and MAHILLON, J. (2013). Whole-genome sequences of 94 environmental isolates of *Bacillus cereus sensu lato*. *Genome Announc.*, 1(5), e00380-13.
- VAN DE VOORT, M., and ABEE, T. (2013). Sporulation environment of emetic toxin-producing *Bacillus cereus* strains determines spore size, heat resistance and germination capacity. *J. Appl. Microbiol.*, 114(4), 1201-1210.
- VANGOITSENHOVEN, R., MARIS, M., OVERBERGH, L., VAN LOCO, J., MATHIEU, C., and VAN DER SCHUEREN, B. (2015). Cereulide food toxin, beta cell function and diabetes: Facts and hypotheses. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 109(1), 1-5.
- VELUSAMY, V., ARSHAK, K., KOROSTYNSKA, O., OLIWA, K., and ADLEY, C. (2010). An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnol. Adv.*, 28(2), 232-254.
- VILAIN, S., LUO, Y., HILDRETH, M. B., and BRÖZEL, V. S. (2006). Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(7), 4970-4977.
- VILAS-BOAS, G., SANCHIS, V., LERECLUS, D., LEMOS, M. V. F., and BOURGUET, D. (2002). Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(3), 1414-1424.
- WAMBO, G. K., BURCKHARDT, F., FRANK, C., HILLER, P., WICHMANN-SCHAUER, H., ZUSCHNEID, I., HENTSCHKE, J., HITZBLECK, T., CONTZEN, M., SUCKAU, M., and STARK, K. (2011). The proof of the pudding is in the eating: an outbreak of emetic syndrome after a kindergarten excursion, Berlin, Germany, December 2007. *Euro Surveill.*, 16(15), 19839.
- WARDA, A. K., DEN BESTEN, H. M., SHA, N., ABEE, T., and GROOT, M. N. N. (2015). Influence of food matrix on outgrowth heterogeneity of heat damaged *Bacillus cereus* spores. *Int. J. Food Microbiol.*, 201, 27-34.
- WARDA, A. K., TEMPELAARS, M. H., ABEE, T., and NIEROP GROOT, M. N. (2016). Recovery of heat treated *Bacillus cereus* spores is affected by matrix composition and factors with putative functions in damage repair. *Front. Microbiol.*, 7, 1096.
- WELLS-BENNIK, M. H., EIJLANDER, R. T., DEN BESTEN, H. M., BERENDSEN, E. M., WARDA, A. K., KRAWCZYK, A. O., NIEROP GROOT, M. N., XIAO, Y., ZWIETERING, M. H., KUIPERS, O. P., and ABEE, T. (2016). Bacterial spores in food: survival, emergence, and outgrowth. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 7, 457-482.
- WHO (2008). Foodborne disease outbreaks: Guidelines for investigation and control. Geneva. Available at: http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/outbreak_guidelines.pdf
- WHO (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1
- WHO (2017). Stage 1: investigating foodborne disease outbreaks in *Strengthening surveillance of and response to foodborne diseases: a practical manual*. Geneva. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259475/9789241513234-eng.pdf;jsessionid=7C1298192700EB745CCB93203B827CE5?sequence=1>
- WOTEKI, C. E., and KINEMAN, B. D. (2003). Challenges and approaches to reducing foodborne illness. *Annu. Rev. Nutr.*, 23(1), 315-344.
- ZHENG, J., GAO, Q., LIU, L., LIU, H., WANG, Y., PENG, D., RUAN, L., RAYMOND, B., and SUN M. (2017). Comparative genomics of *Bacillus thuringiensis* reveals a path to specialized exploitation of multiple invertebrate hosts. *MBio*, 8(4), e00822-17.
- ZWICK, M. E., JOSEPH, S. J., DIDELOT, X., CHEN, P. E., BISHOP-LILLY, K. A., STEWART, A. C., WILLNER, K., NOLAN, N., LENTZ, S., THOMASON, M. K., SOZHAMANNAN, S., MATECZUN, A. J., DU, L., and READ, T. D. (2012). Genomic characterization of the *Bacillus cereus sensu lato* species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. *Genome Res.*, 22(8), 1512-1524.

Résumé

Les maladies d'origine alimentaire constituent un problème mondial de santé publique et peuvent entre autres être causées par des bactéries ou par les toxines de ces dernières. Sporulante et ubiquitaire, *Bacillus cereus* s.l. est présent dans de nombreux aliments qui peuvent s'en trouver altérés ou contaminés par des souches pathogènes capables de provoquer des toxi-infections alimentaires caractérisées par des symptômes émétiques ou diarrhéiques. C'est le cas de la souche thermotolérante NHV391-98, référence pour l'espèce *B. cytotoxicus*, et ayant causé la mort de trois personnes après ingestion d'une purée végétale. La ou les toxines impliquée(s) dans sa toxicité ne sont pas connue(s) à l'heure actuelle mais une entérotoxine potentielle est la cytotoxine K-1, caractéristique propre à cette espèce récemment définie et dont la diversité a peu été explorée jusqu'à présent, excepté lors d'une étude de produits à base de pommes de terre révélant une haute prévalence dans les produits déshydratés.

Dans ce contexte, les objectifs de ce mémoire étaient d'isoler et de caractériser des souches *B. cytotoxicus* venant de différents aliments ainsi que suivre le développement de celles-ci dans de la purée et dans de la soupe préparées et conservées de façon inappropriée.

Sur les 39 matrices alimentaires analysées, quatre, toutes déshydratées et à base de pommes de terre, contenaient des *B. cytotoxicus* : des flocons de pommes de terre de deux marques différentes ; des chips TUC crisp ; et de la soupe instantanée saveur Saint-Germain. Au total, 23 souches ont pu y être identifiées essentiellement grâce au pré-enrichissement à 50°C, à leurs phénotypes et à la détection du gène *cytK-1* par technique PCR. Ces isolats ont été groupés en profils génétiques grâce à la méthode RAPD. Les résultats classent les souches issues d'un même produit mais fabriqué à des moments différents, dans des groupes distincts. Les flocons de pommes de terre composés d'une charge initiale en *B. cytotoxicus* de 250 CFU/g peuvent exhiber des niveaux de contamination atteignant 10^5 CFU/g lorsqu'ils sont utilisés pour préparer de la purée et que celle-ci est conservée 48 heures à 20°C. Bien qu'il soit possible que les souches présentes ne soient pas cytotoxiques, une telle quantité de *B. cytotoxicus* est connue pour avoir déjà causé des cas de toxico-infections par le passé et constitue dès lors un risque potentiel pour le consommateur. En ce qui concerne la soupe, la préparation dans des conditions domestiques n'a pas permis de réaliser l'évaluation de la charge à cause d'une flore accompagnatrice dominante. L'évaluation a ainsi été réalisée pour de la soupe préparée avec de la poudre stérilisée et inoculée avec des spores. Dans de telles conditions, *B. cytotoxicus* se développe pour atteindre une concentration de 10^4 CFU/g après 48h mais au vu de la quantité de soupe obtenue à partir d'un sachet, il est peu probable qu'elle soit conservée aussi longtemps.

La diversité génétique des isolats doit être comparée à plus d'autres souches de *B. cytotoxicus*. Ce travail confirme la présence de *B. cytotoxicus* dans des produits déshydratés à base de pommes de terre et indique que celle-ci peut présenter un risque pour les aliments préparés et conservés inadéquatement.