



HAL
open science

Effet de l'absence d'oxygène sur la capacité de sporulation et les propriétés des spores de *Bacillus cereus*

Amina Aicha Abbas

► **To cite this version:**

Amina Aicha Abbas. Effet de l'absence d'oxygène sur la capacité de sporulation et les propriétés des spores de *Bacillus cereus*. Biologie végétale. Université d'Avignon, 2014. Français. NNT : 2014AVIG0330 . tel-01079542

HAL Id: tel-01079542

<https://theses.hal.science/tel-01079542>

Submitted on 3 Nov 2014

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

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

Ecole doctorale
« Agrosience et Science »

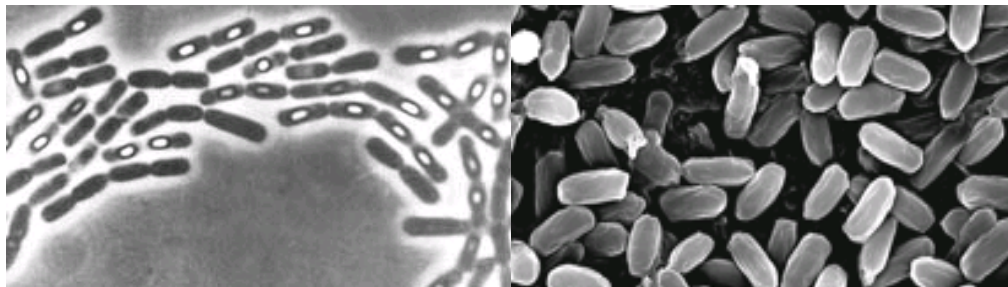
Thèse

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

Discipline : Biotechnologie et Microbiologie

Amina Aicha ABBAS



Effet de l'absence d'oxygène sur la capacité de sporulation et les propriétés des spores de *Bacillus cereus*

Soutenue publiquement le 11 juillet 2014 devant le jury composé de :

Rapporteurs	Mme Chantal Tardif-Rousset M. Ivan Leguerinel
Examineurs	Mme Stella Planchon M. Rémy Cachon M. Michel Jobin
Directeur de thèse	M. Philippe Schmitt

Thèse réalisée au sein de l'UMR A408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale,
UAPV, INRA Avignon

A mes parents de tout mon cœur...

Remerciements

Ce travail n'aurait jamais été ce qu'il est aujourd'hui sans l'aide, le soutien, les encouragements et la générosité d'un grand nombre de personnes. Je sors de cette thèse grande, forte, et avec beaucoup d'assurance. Merci...

En premier lieu, je tiens à exprimer ma reconnaissance au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Algérien qui a financé cette thèse par l'octroi d'une bourse d'études pour une durée de trois ans. Je remercie également l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse qui m'a permis de prolonger la durée de ma thèse en m'accordant un poste d'Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche.

Tous mes remerciements aussi à Monsieur Christophe Nguyen-The et Madame Catherine Renard, Directeurs successifs de l'UMR A408: Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire pendant ces quatre années.

J'adresse mes vifs remerciements à Madame Chantal Tardif ainsi qu'à Monsieur Ivan Leguerinel pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie chaleureusement Monsieur Rémy Cachon pour sa participation ainsi que ses conseils durant mes comités de thèse. Merci également pour sa participation, en tant qu'examinateur, au jury de thèse.

Un grand merci à mon Directeur de thèse, Monsieur Philippe Schmitt pour la confiance, la patience et l'encadrement qu'il m'a accordé. Monsieur Michel Jobin, merci de m'avoir encadrée et guidée dans l'enseignement à l'IUT d'Avignon. Tu m'as fait aimer l'enseignement, merci.

Un immense merci à Madame Stella Planchon, pour m'avoir encadrée lorsqu'elle faisait partie du laboratoire et qui a continué à s'intéresser de manière active à mon travail après son départ. Merci d'avoir été là pour moi dans les moments difficiles. Tu as été une grande sœur pour moi. Je te remercie pour ta douceur, ta gentillesse, ta disponibilité, tes encouragements et tes moments de réconfort. Tes mails ou texto avec ta phrase fétiche "don't worry, be happy, petite Amina" m'apportait beaucoup de bien. Tu as toujours cru en moi Stella, merci pour tout.

J'exprime ma gratitude à tous les chercheurs et tous les membres de l'équipe "Microbiologie" du laboratoire SQPOV qui m'ont vu grandir, changer et prendre de l'assurance. Un merci particulier à Madame Véronique Broussole. Véro, merci pour ta disponibilité et tes conseils. Merci d'avoir été présente à chaque fois que j'avais des doutes ou que je perdais espoir. Merci d'avoir répondu à mes questions et d'avoir été toujours souriante et accueillante à chaque fois que je franchissais le seuil de la porte de ton bureau. Nos discussions sur la spore vont me manquer. J'adresse mes respectueux remerciements à Monsieur Frédéric Carlin pour ses précieux conseils tout au long de ma thèse. Merci de m'avoir secouée quand il le fallait. Monsieur Thierry Clavel, un grand merci d'avoir été

Hélène, merci pour ta gentillesse, ton soutien et surtout pour ton aide durant cette thèse. Merci également pour les week-ends touristiques avec Titine...

Gérémy, merci pour ton aide, ta relecture et tes commentaires pertinents. Avec Angy et la petite Zoé, je vous souhaite de réussir dans votre rêve américain.

Merci aux thésards, CDD et stagiaires du laboratoire (Cécile, Alizée, Loic, Jean-Paul, Christelle, Katérina, Julia, Caro, Orlane, Kele, Jean-Luc, Djidji, Halimus, Houria, Hafsouati, Jordane, Nicolas, Adrien, Florent...) pour toute la joie, la bonne ambiance et toutes les sorties ou soirées qu'on a pu passer ensemble. Je ne vous oublierai jamais.

Sonia, Sabiha, Refka, Nassima, vous êtes des sœurs pour moi. Merci pour ces quatre années passées ensemble. Sabiha, tu as été la grande sœur, merci pour ton sourire et ta bonne humeur. Nassima, merci pour ta douceur et ta gentillesse. Sonia, merci pour tes conseils de psy et pour ta joie de vivre. Enfin, Refka, merci pour ta sagesse, ton calme et ton réconfort. Loin de ma famille, je savais que je pouvais compter sur vous toutes, ce qui m'a beaucoup aidée.

Chafika alias Chacha, on se connaît depuis la maternelle, on a été des amies inséparables tout au long de notre parcours scolaire (primaire, collège, lycée) et même à l'université. On a partagé beaucoup de moments ensemble, bons mais aussi difficiles, seulement on s'est toujours soutenues mutuellement. Mon départ pour la France nous a éloigné l'une de l'autre durant ces quatre dernières années, chacune a suivi son chemin, moi avec ma thèse et toi avec ton mariage et bientôt ton bébé. Malgré tout ça, on a continué à nous soutenir et à partager les moments les plus importants pour l'une et pour l'autre. Si ça ce n'est pas de l'amitié...

Maman, papa, voilà, j'y suis. J'espère que vous êtes fière de votre fille. Du plus profond de mon cœur, merci. Pour l'amour que vous m'avez donné, merci. De m'avoir accordé votre confiance, d'avoir cru en moi, de m'avoir soutenu dans les moments difficiles de la thèse, merci. Pour vos prières et vos encouragements, merci. Pour nos discussions, dont skype est témoin, merci. Papa, je me souviens toujours d'une phrase que tu m'avais dite le jour où je me suis inscrite à la fac, "ma fille, tu iras jusqu'au doctorat ". A l'époque, je me disais "comment il peut me demander cela, c'est impossible...", puis avec le temps, et grâce à maman et à toi j'ai réussi et voilà, ta fille sera bientôt Docteur ABBAS...

Nazim, j'espère que tu es fier de ta sœurlette tout comme maman et papa. Merci pour tes blagues qui me remontaient le moral quand il le fallait. Je te souhaite de réussir dans tes études, petit frère. Un deuxième docteur dans la famille, ça ne fera pas de mal.

Ces remerciements seraient incomplets si je ne mentionne pas celui qui m'a toujours motivé et encouragé dans ce projet. Billel, je te remercie de tout mon cœur, car malgré les 1000Km qui nous ont séparés ces quatre dernières années, tu as su être patient. Toujours à me soutenir, et à trouver les mots réconfortants quand je perdais espoir ou que j'avais le mal du pays. Je sais que mon absence a été longue et j'espère pouvoir rattraper le retard accumulé.
B.T.J.T.

INTRODUCTION	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1. Généralités sur <i>Bacillus cereus</i>	7
1.1. Le groupe <i>Bacillus cereus</i>	7
1.2. Phylogénie du groupe <i>Bacillus cereus</i>	8
1.3. Les toxi-infections alimentaires à <i>Bacillus cereus</i>	10
2. La spore bactérienne : historique, structure et propriétés	10
2.1. Historique des spores bactériennes.....	10
2.2. Structure des spores bactériennes.....	11
2.2.1. L'exosporium	12
2.2.2. Les tuniques.....	13
2.2.3. La membrane externe	14
2.2.4. Le cortex	14
2.2.5. La membrane interne	15
2.2.6. Le cœur	16
2.3. Propriétés physico-chimiques des spores bactériennes.....	17
2.3.1. Propriétés de dormance	17
2.3.2. Propriétés de résistance	17
2.3.2.1. Résistance à la chaleur humide	19
2.3.2.2. Résistance à la chaleur sèche.....	20
2.3.2.3. Résistance aux agents chimiques	20
2.3.2.4. Résistance aux rayonnements	22
2.3.2.4.1. Rayonnements UV.....	22
2.3.2.4.2. Rayonnements γ	23
2.3.2.4.3. Lumière pulsée	23
2.3.3. Propriétés d'adhérence	24
2.3.4. Propriété de germination	25
3. Etapes et mécanismes de la sporulation	25
3.1. Etapes morphologiques de la sporulation	25
3.2. Les gènes impliqués dans la sporulation.....	27

3.2.1.	Les facteurs sigma	27
3.2.2.	Les gènes <i>spo</i>	28
3.2.3.	Les autres gènes	29
3.3.	Initiation de la sporulation	29
3.4.	Régulation génétique de la sporulation	31
4.	Etapes et mécanismes de la germination	36
4.1.	Définition et étapes de la germination	36
4.2.	Les inducteurs de la germination	37
4.3.	Récepteurs et gènes de la germination	39
4.4.	Les canaux ioniques/DPA	41
4.5.	Les enzymes lytiques du cortex et leur activation	42
4.6.	Les protéines des tuniques et la germination.....	43
5.	Effet des conditions de sporulation sur les propriétés des spores.....	44
5.1.	Effet de la température	44
5.2.	Effet du milieu : nutriments et minéraux.....	46
5.3.	Effet du pH.....	48
5.4.	Effet de l'atmosphère.....	48
MATERIEL ET METHODES		53
1.	Les souches de <i>Bacillus cereus</i>	55
2.	Les milieux de croissance et de sporulation	55
2.1.	Le milieu MODS	55
2.2.	Le milieu LB.....	56
2.3.	Le milieu CCY	56
2.4.	Le milieu SMB	56
3.	Culture des souches	56
3.1.	Culture en conditions contrôlées	56
3.2.	Culture en conditions non contrôlées.....	57
3.3.	Culture biphasique	57
4.	Suivi de la croissance et de la sporulation	58
4.1.	Mesure du taux de croissance.....	58
4.2.	Dénombrement sur LB	58
5.	Récolte et purification des spores	58

6.	Résistance des spores	58
6.1.	Résistance à la chaleur humide.....	59
6.2.	Résistance aux agents chimiques.....	59
6.2.1.	Résistance au peroxyde d'hydrogène.....	59
6.2.2.	Résistance à l'hydroxyde de sodium	60
6.2.3.	Résistance à l'acide nitreux	60
6.2.4.	Résistance au formaldéhyde	60
6.3.	Résistance aux UV et à la lumière pulsée	61
7.	Etude de la germination des spores	62
8.	Teneur en acide dipicolinique (DPA).....	63
9.	Microscopie électronique à transmission.....	63
9.1.	Technique de la coloration négative.....	63
9.2.	Technique des coupes minces.....	64
10.	Analyses statistiques	64
11.	Techniques de biologie moléculaire	64
11.1.	Extraction d'ADN génomique	64
11.2.	Amplification par PCR.....	65
11.3.	Electrophorèse.....	65
11.4.	Quantification relative des ARNm par RT-PCR en temps réel.....	66
11.4.1.	Les amorces utilisées	66
11.4.2.	Prélèvement et extraction des ARN.....	66
11.4.3.	Amplification par RT-PCR quantitative	67
	RESULTATS.....	69
	ARTICLE 1	72
1.	Problématique	72
2.	Objectif.....	73
3.	Stratégie et principaux résultats.....	73
3.1.	Croissance et sporulation dans le milieu MOD	73
3.2.	Mise au point d'un milieu chimiquement défini.....	73
3.3.	Etude de la sporulation en milieu MODS en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose 74	
4.	Résultats supplémentaires.....	75

Article 1: A new chemically defined medium for growth and sporulation of <i>Bacillus cereus</i> strains in anaerobiosis condition	78
1. Abstract	78
2. Introduction.....	79
3. Materials and Methods	80
3.1. Micro-organisms, growth and sporulation media	80
3.2. Culture conditions and spore production	81
3.3. Measure of growth and sporulation	82
4. Results	83
4.1. Growth kinetics in MOD, MODS and CCY media.....	83
4.2. Ability of <i>B. cereus</i> sporulation in MOD, MODS and CCY media.....	84
5. Discussion.....	85
ARTICLE 2	92
Effet de l'absence d'oxygène sur la capacité de sporulation de <i>Bacillus cereus</i> et les propriétés des spores.....	92
1. Problématique	92
2. Objectif.....	92
3. Stratégie et principaux résultats.....	93
Article 2: Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of <i>Bacillus cereus</i>	94
1. Abstract.....	94
2. Introduction	95
3. Materials and methods.....	97
3.1. Strains and media.....	97
3.2. Uncontrolled batch cultures.....	98
3.3. Controlled batch cultures.....	98
3.4. Spore production.....	98
3.5. Cell and spore counts	99
3.6. Resistance of <i>B. cereus</i> spores produced in controlled batch cultures	99
3.7. Spore germination.....	101
3.8. Transmission electron microscopy.....	101
3.9. Dipicolinic acid DPA content	102
3.10. Statistical analysis.....	102

4. Results.....	102
4.1. Growth and sporulation capacity of <i>B. cereus</i> strains in uncontrolled batch culture	102
4.2. Growth and sporulation of <i>B. cereus</i> strain AH187 in controlled batch culture	103
4.3. Spore resistance	104
4.4. Spore germination.....	107
4.5. Spore size, morphology and structure	109
4.6. DPA contents.....	110
5. Discussion.....	110
ARTICLE 3	122
Expression des gènes de l'initiation de la sporulation en anaérobiose par rapport à l'aérobiose	122
1. Problématique	122
2. Objectif.....	122
3. Stratégie et principaux résultats.....	123
Article 3: Temporal expression of genes for initiation of the sporulation in anaerobiosis condition for a <i>Bacillus cereus</i> AH187 strain responsible for diarrheic syndrome.....	124
1. Abstract.....	124
2. Introduction	124
3. Material and Methods	126
3.1. Bacterial strain and media	126
3.2. Controlled batch cultures.....	126
3.3. Growth parameters.....	126
3.4. Cell and spore counts	127
3.5. RNA isolation and real-time RT-PCR.....	127
4. Results and discussion	128
4.1. Kinetics of the growth of <i>B. cereus</i> strain AH187 in MODS medium.....	128
4.2. Sporulation gene expression.....	129
4.2.1. Kinetics of gene expression in aerobiosis and anaerobiosis	130
4.2.2. Difference of gene expression between aerobic and anaerobic conditions.....	132
Acknowledgements.....	135
References.....	135
1. Optimisation du milieu MODS et étude de la capacité de sporulation de <i>B. cereus</i> en absence d'oxygène	141

2. Effet de l'anaérobiose sur les propriétés des spores de <i>B. cereus</i>	142
2.1. Effet sur la thermorésistance	143
2.2. Effet sur la résistance aux agents chimiques	143
2.3. Effet sur les UV et la lumière pulsée	144
2.4. Effet sur la germination.....	144
2.5. Effet sur la taille et la structure des spores.....	145
3. Effet de l'anaérobiose sur l'expression des gènes de la sporulation	146
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	151
VALORISATION DES TRAVAUX.....	169

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Observations au microscope à contraste de phase de : cellules végétatives (A), d'endospores (B) et de spores (C) de la souche KBAB4 de <i>B. cereus</i> (INRA, Avignon).	7
Figure 2. Gamme de température de croissance de <i>Bacillus cereus sensu lato</i>	8
Figure 3. Diversité génétique du groupe <i>Bacillus cereus</i> (Guinebretiere <i>et al.</i> , 2008).	9
Figure 4. Ultrastructure d'une spore.	12
Figure 5 : Représentation schématique de la structure du peptidoglycane des spores.	15
Figure 6 : Structure de photoproduits de spores (a), de dimère cyclobutane (b) et de 6-4-photoproduit (c) entre deux thymines adjacentes (Setlow, 2006).	22
Figure 7 : Principales étapes morphologiques du cycle de vie de <i>B. subtilis</i> d'après de Hoon <i>et al.</i> (de hoon <i>et al.</i> , 2010).	26
Figure 8 : Schéma représentatif de l'initiation de la sporulation.	30
Figure 9 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la régulation des 33	33
Figure 10 : Réseau d'interactions des protéines des tuniques chez <i>Bacillus subtilis</i>	34
Figure 11 : Etapes d'assemblage de l'exosporium chez le groupe <i>B. cereus</i>	36
Figure 12 : Les étapes de la germination chez <i>B. subtilis</i> (Setlow, 2003).	37
Figure 13 : Représentation schématique du récepteur de germinants GerA situés au niveau de la membrane interne des spores de <i>B. subtilis</i> (Moir <i>et al.</i> , 2002).	40
Figure 14 : Localisation des éléments constitutifs de l'appareil de germination des spores, d'après Setlow (Setlow, 2003).	42

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Facteurs impliqués dans la résistance des spores à la chaleur et aux agents chimiques.	18
Tableau 2 : Effet des différentes conditions de sporulation sur la capacité de sporulation et les propriétés des spores de <i>Bacillus</i>	49
Tableau 3 : Liste des souches de <i>B. cereus</i> utilisées	55
Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour la mesure de l'expression des gènes de l'initiation de la sporulation par qRT-PCR.	66

A_{600} : Absorbance à 600 nm
ADN/DNA : Acide désoxyribonucléique
AFLP : Amplified fragment length polymorphisme
AGFK : Asparagine, glucose, fructose, ions potassium
Arg : Arginine
ARN/RNA : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNt : ARN de transport
Asn : Asparagine
Asp : Acide aspartique
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : Adénosine tri phosphate
Ba : *Bacillus anthracis*
Bc ss : *Bacillus cereus sensu stricto*
B cyt : *Bacillus cytotoxicus*
Bm : *Bacillus mycoides*
Bp : *Bacillus pseudomycoides*
Bt : *Bacillus thuringiensis*
CPDs : Dimères cyclobutane
Ct : Cycle seuil
 D_T : Temps de réduction décimale à la température T
DPA/ADP : Acide dipicolinique
GFP : Green fluorescent protein
Glu : Acide glutamique
His : Histidine
Kb: Kilobase
kDa : KiloDalton
Kin : Kinase
LB: Luria-Bertani
LP : Lumière pulsée
Lys : Lysine
MEB/MET : Microscope électronique à Balayage ou à transmission
NAG : N-acétylglucosamine
NAM : N-acétylmuramique
NEP : Procédure de nettoyage en place
OPA : Orthophtalaldéhyde
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
pH : Potentiel hydrogène
 pO_2 : pression partielle en oxygène
64PPs : 6-4-photoproduits
Pro : Proline
q-RT-PCR : PCR quantitative à transcription inverse
SASP: Small acid-soluble spore protein
SMB : Sporulation mineral buffer
SP : Spore photoproduct
TIAC : Toxi-infection alimentaire collective
Trp : Tryptophane
Tyr : Tyrosine
UFC/CFU : Unité formant colonie
UV : Ultraviolet

INTRODUCTION

Les bactéries appartenant aux genres *Bacillus* et *Clostridium* sont capables de former des spores qui sont une forme de résistance et de dormance. Selon l'Institut de Veille Sanitaire (INVS 2012), *Bacillus cereus* est la 3^{ème} cause de Toxi Infection Alimentaire Collectives. Les cellules végétatives de *B. cereus* forment des spores lorsqu'elles se trouvent en conditions environnementales défavorables. Ces spores peuvent rester à l'état latent pendant de nombreuses années voire des milliers d'années, attendant ainsi le retour des conditions favorables. La raison principale de cet état latent est la forte déshydratation du cœur de la spore, prévenant ainsi toute réaction enzymatique. Des milieux riches en nutriments déclenchent la germination des spores de *B. cereus* ; celles-ci redeviennent des cellules végétatives actives, capables de produire des toxines qui sont à l'origine du syndrome émétique ou diarrhéique. Dans le cas de la toxine émétique (céréulide), celle-ci est thermostable et est produite dans l'aliment.

La sporulation peut avoir lieu dans des milieux naturels variés en termes de température, de pH, d'activité de l'eau et d'oxygène. Ces conditions affectent fortement les propriétés de résistance et de germination des spores. Parmi ces paramètres, la température ainsi que la composition du milieu en nutriments sur les propriétés de résistance des spores, ont été largement étudiées. Par exemple, il a été admis qu'il y avait toujours une corrélation positive entre la température de sporulation et la thermorésistance des spores. Concernant l'anaérobiose, il est connu que ce paramètre influence le rendement de sporulation des spores de *B. cereus*. Cependant, son effet sur les propriétés des spores n'est pas encore établi. Toutefois, les cellules végétatives de *B. cereus* pourraient sporuler lorsqu'elles se retrouvent dans un environnement où la concentration en oxygène est faible, voire absente. Ces spores produites dans cet environnement anaérobie peuvent présenter des propriétés de résistance et de germination différentes des conditions aérobies. Par leur dissémination dans l'environnement, elles peuvent contaminer les aliments en cours de transformation. Ces aliments subissent un traitement thermique modéré, auquel les spores sont résistantes. Ce traitement thermique pourrait activer la germination de ces spores qui donnent naissance à des cellules végétatives et provoquent ainsi la synthèse de toxines dans l'aliment au cours de sa conservation à basse température. De plus, la toxine émétique est thermostable donc à l'origine des empoisonnements alimentaires dans le cas de plats réfrigérés prêts à consommer et les plats cuisinés à réchauffer.

Il est donc primordial d'étudier la capacité de sporulation des souches de *B. cereus* ainsi que les propriétés de résistance et de germination en absence d'oxygène afin de connaître son impact sur les spores de *B. cereus*.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur *Bacillus cereus*

1.1. Le groupe *Bacillus cereus*

Le groupe *Bacillus cereus*, encore connu sous le nom de *Bacillus cereus sensu lato*, est composé de bactéries à Gram-positif, anaérobies facultatives et capables de former des endospores. Ce sont des bâtonnets, d'environ 4 μm de long et 1 μm de large, possédant une ciliature pérित्रиче (Figure 1) (Guinebretiere *et al.*, 2008).

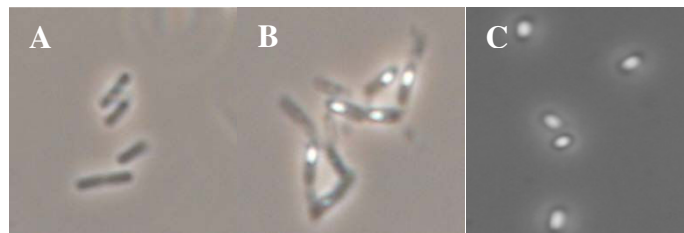


Figure 1. Observations au microscope à contraste de phase de : cellules végétaives (A), d'endospores (B) et de spores (C) de la souche KBAB4 de *B. cereus* (INRA, Avignon).

Les espèces de ce groupe sont fréquemment retrouvées dans le sol, l'eau, les poussières et sur les végétaux. Certaines espèces se retrouvent dans le tube digestif des animaux où elles établissent une relation d'endosymbiose avec leur hôte (Hong *et al.*, 2005). Ces espèces sont capables de croître dans une gamme de température très large allant de 4 °C à 50 °C (Figure 2).

Sept espèces génétiquement proches ont été identifiées comme appartenant à ce groupe taxonomique :

- *Bacillus anthracis*, est une espèce pathogène de l'homme et de l'animal. Elle est responsable de la maladie du charbon (Mock and Fouet, 2001)
- *Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycoides*, sont des espèces connues surtout pour leur capacité de formation de rhizoïdes. La distinction entre ces deux espèces se fait par rapport à leur composition en acides gras (Nakamura, 1998; Prüß *et al.*, 1999).
- *Bacillus thuringiensis*, est une espèce entomopathogène. Elle est capable de synthétiser un cristal parasporal contenant des toxines pathogènes pour les insectes. De part ces caractéristiques, *B. thuringiensis* est utilisée en agriculture comme biopesticide (Schnepf *et al.*, 1998).

- *Bacillus weihenstephanensis*, est constitué d'espèces psychrotolérantes capables de se développer à de basses températures allant de 4 °C à 7 °C (Lechner *et al.*, 1998)
- *Bacillus cereus sensu stricto* (*ss*), est responsable de toxi-infections alimentaires (TIA) grâce à la productions de toxines émétiques (à l'origine du syndrome émétique) et/ou diarrhéiques (à l'origine du syndrome diarrhéique) (Bottone, 2010; Logan, 2012)
- *Bacillus cytotoxicus*, est une espèce thermophile possédant une gamme de température de croissance comprise entre 20 °C et 50 °C (Guinebretiere *et al.*, 2013).

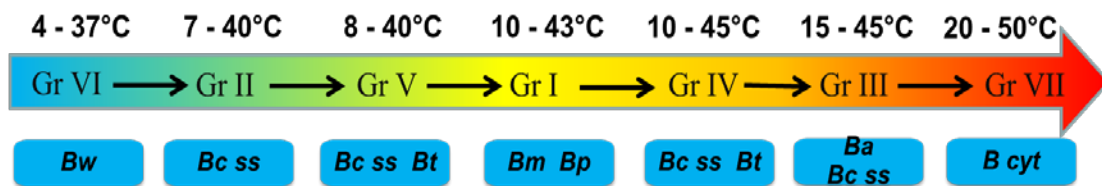


Figure 2. Gamme de température de croissance de *Bacillus cereus sensu lato*.

Bw : *Bacillus weihenstephanensis*, *Bc ss* : *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bt* : *Bacillus thuringiensis*, *Bm* : *Bacillus mycoides*, *Bp* : *Bacillus pseudomycoides*, *Ba* : *Bacillus anthracis*, *B cyt* : *B. cytotoxicus*, d'après Guinebretiere *et al.* (Guinebretiere *et al.*, 2013; Guinebretiere *et al.*, 2008).

1.2. Phylogénie du groupe *Bacillus cereus*

La classification des espèces du groupe *B. cereus* était auparavant basée sur la comparaison de différences de morphologie, de virulence et de physiologie (Pirttijarvi *et al.*, 2000). En 2008, des études menées par Guinebretière et ses collaborateurs (Guinebretiere *et al.*, 2008) ont permis d'identifier sept groupes phylogénétiques majeurs (Figure 2). Son étude s'est basée sur: (i) des données moléculaires en particulier les profils AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), les séquences des gènes ribosomiaux et la séquence du gène *panC* et (ii) des données descriptives et phénotypiques comme la gamme de températures de croissance et les niches thermiques.

Chaque groupe possède une gamme de températures (Figure 2) qui lui est propre avec des différences écologiques fournissant la preuve d'une multi-émergence de psychrotolérance dans le groupe *B. cereus* (Figure 2, Figure 3). Il y a un groupe thermophile (VII), deux groupes mésophiles (III, IV), deux groupes intermédiaires (I, V) et deux groupes psychrotrophes (II, VI).

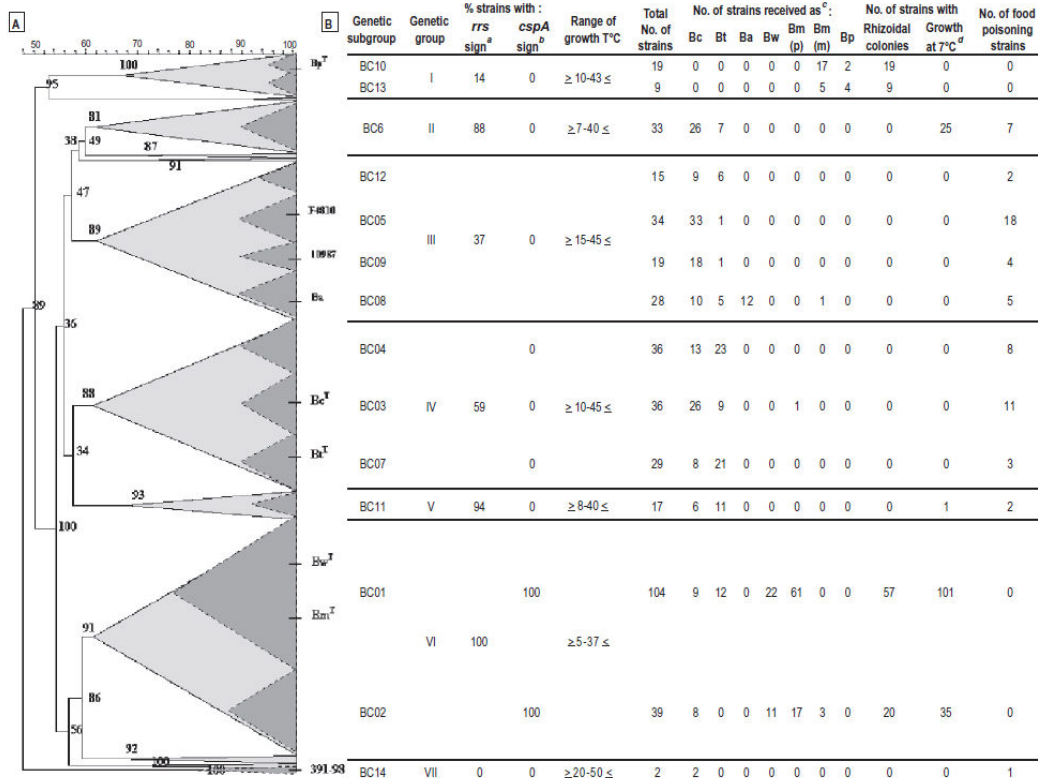


Figure 3. Diversité génétique du groupe *Bacillus cereus* (Guinebretiere et al., 2008).

Le groupe I est constitué par l'espèce *B. pseudomycolides*. Les espèces *B. cereus sensu stricto* et *B. thuringiensis* sont classées dans les groupes II, III, IV et V. Les souches de *B. anthracis* sont présentes uniquement dans le groupe III. Le groupe VI comprend les espèces *B. weihenstephanensis* et *B. mycolides*. Enfin, le groupe VII contient l'espèce thermophile nouvellement décrite : *B. cytotoxicus*. Ce groupe serait le plus proche d'un ancêtre commun. En effet, selon Guinebretiere et al., *B. cereus sensu lato* serait issu d'un ancêtre thermophile qui aurait évolué vers la psychrophilie (Guinebretiere et al., 2013; Guinebretiere et al., 2008).

Dans cette étude, les souches du groupe *B. cereus* impliquées dans des cas d'intoxications alimentaires seraient placées majoritairement dans les groupes II, III, IV, V et VII. Les souches diarrhéiques sont regroupées dans les cinq groupes près-cités alors que les souches émétiques sont présentes uniquement dans le groupe mésophile III. Les souches psychrophiles du groupe VI n'ont jamais été associées à des cas de TIAC. Des études menées par Stenfors et al. ont montré que la plupart des souches de *B. weihenstephanensis* n'étaient pas cytotoxiques sur les cellules « Vero » (Stenfors and Granum, 2001).

1.3. Les toxi-infections alimentaires à *Bacillus cereus*

Selon l'Institut de Veille Sanitaire (INVS 2012), *B. cereus* a été la 3^{ème} cause de Toxi Infection Alimentaire Collective (TIAC) en France, avec 1156 cas répartis sur 62 foyers entre 2006 et 2010 (BEH, 2012). Ceci est dû à sa capacité de produire des toxines qui sont à l'origine du syndrome émétique ou du syndrome diarrhéique.

Le syndrome émétique est causé par l'ingestion de la toxine émétique (appelée céréulide) préformée dans l'aliment. Cette toxine n'est pas inactivée au cours du traitement thermique des denrées alimentaires ni lors de son passage à travers le tube digestif en raison de sa grande résistance à la température, aux pH extrêmes et aux activités des protéases (Agata *et al.*, 2002; Rajkovic *et al.*, 2008; Shinagawa *et al.*, 1996). Ce syndrome est caractérisé par une courte période d'incubation (1 à 5 heures après ingestion des aliments) et se manifeste par des vomissements. Les aliments associés à ce syndrome sont principalement le lait pour les nourrissons, le riz et les pâtes (Ehling-Schulz *et al.*, 2004).

Le syndrome diarrhéique quant à lui, résulte des entérotoxines produites par les cellules végétatives de *B. cereus*. Ces dernières se trouvent au niveau de la couche de mucus et /ou attachées à l'épithélium dans l'intestin grêle (Ceuppens *et al.*, 2013). Le temps d'incubation est donc plus long que pour le syndrome émétique et varie entre 12 h et 24 h. Il se manifeste par des crampes abdominales et une diarrhée. Les aliments incriminés pour ce syndrome sont généralement les produits à base de viande, les légumes et les produits déshydratés (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

2. La spore bactérienne : historique, structure et propriétés

2.1. Historique des spores bactériennes

Certaines bactéries à Gram positif telles que *Bacillus* et *Clostridium* ont la capacité de sporuler lorsqu'elles se trouvent dans des environnements de stress comme le manque de nutriments dans le milieu (Leggett *et al.*, 2012). Les spores bactériennes sont un type de cellules différenciées, métaboliquement inactives et très résistantes aux traitements par la chaleur, la pression, les UV et les produits chimiques (Clavel *et al.*, 2004; Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011; Setlow, 2006; Tam *et al.*, 2006).

Les infections par des spores bactériennes peuvent être tracées depuis des milliers d'années ; cependant, la découverte des spores en tant qu'agents infectieux n'a eu lieu qu'à la fin du 19^{ème} siècle (Torred *et al.*, 2012).

La première personne à avoir observé et décrit les spores bactériennes est probablement Perty (Perty, 1852). Toutefois, les premiers à avoir détaillé la description d'une spore sont Ferdinand Cohn et Robert Koch en 1876, durant leurs travaux respectifs sur la stérilisation des matériaux organiques et l'anthrax.

A partir des années 1950 jusqu'aux années 1980, la formation des spores a servi de modèle pour la différenciation cellulaire. D'énormes efforts de recherche ont alors été entrepris afin d'élucider la structure des spores ainsi que leur processus de formation (Keynan and Sandler, 1983 ; Nicholson, 2004).

Entre 1960 et 1980, les biologistes de la spore formaient une large communauté internationale bien organisée, et plusieurs conférences scientifiques étaient tenues en Europe et aux Etats Unis. Des scientifiques tels que Halvorson (père et fils) ou que Graham Gould ont dédié leur vie à la recherche des spores, et sont devenus des icônes dans ce domaine.

Avec l'introduction massive de la génétique dans les études, dans les années 1970 et 1980, *Bacillus subtilis* est devenue l'organisme de référence pour l'étude des spores bactériennes (Nicholson, 2004). *B. subtilis* devient le premier organisme sporulé avec un génome entièrement séquencé (Kunst *et al.*, 1997). Cette bactérie à Gram-positif devient alors l'organisme le mieux compris, servant de modèle pour l'étude de la différenciation de la spore jusqu'à nos jours (Eichenberger *et al.*, 2004 ; Errigton, 2003).

2.2. Structure des spores bactériennes

La structure et la composition chimique des spores bactériennes diffèrent considérablement de celles des cellules végétatives. Ces différences sont à l'origine des propriétés de résistances uniques des spores. Comme présentée sur la Figure 4, la spore se compose de l'extérieur vers l'intérieur d'un exosporium, des tuniques internes, externes et crust (chez certaines espèces), d'une membrane externe, d'un cortex, d'une membrane interne et d'un cœur.

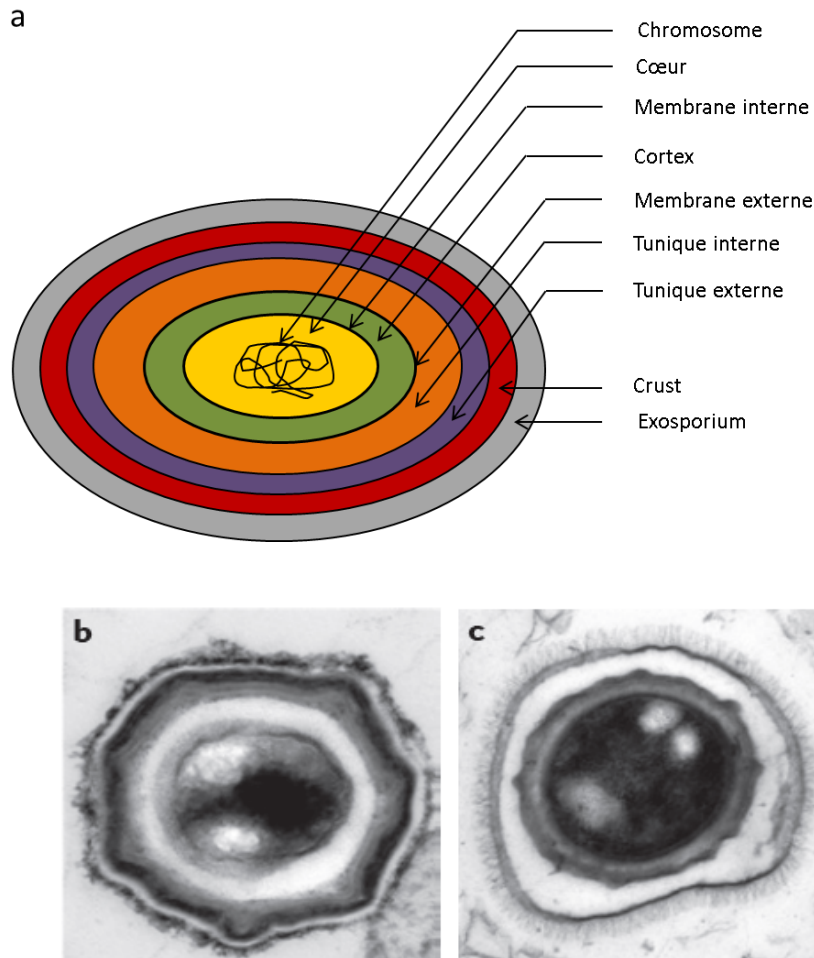


Figure 4. Ultrastructure d'une spore.

Légende : (a) Représentation schématique d'une spore dormant, (b) Observation en microscopie électronique à transmission d'une spore de *B. subtilis*. (c) Observation en microscopie électronique à transmission d'une spore de *B. anthracis* (McKenney *et al.*, 2013 ; Setlow, 1997).

2.2.1. L'exosporium

L'exosporium consiste en une couche basale para-cristalline, entourée par une bordure en brosse formée de filaments externes (Henriques and Moran, 2007). On le trouve chez de nombreuses bactéries, en particulier celles du groupe *B. cereus*, qui comprend également *B. anthracis* et *B. thuringiensis* (Leggett *et al.*, 2012). On le trouve également chez d'autres Bacilli et Clostridia (Escobar-Cortes *et al.*, 2013). Chez *B. subtilis*, cette structure est absente (Waller *et al.*, 2004). La structure de l'exosporium et sa largeur sont spécifiques aux espèces et aux souches. Chez *B. cereus* et *B. thuringiensis*, la couche de l'exosporium possède une épaisseur de 25-40 nm (Henriques and Moran, 2007).

L'exosporium est composé d'environ 20 protéines et glycoprotéines (43-52 % du poids sec) mais il contient aussi 15-18 % de lipides, 20-22 % d'hydrates de carbone et 4 % de cendres contenant à la fois du calcium, du magnésium et quelques composés indéterminés (Leggett *et al.*, 2012). Quelques glycoprotéines ont été identifiées ou caractérisées comme BclA qui est la principale glycoprotéine de la bordure en brosse chez *B. cereus* (Severson *et al.*, 2009; Lequette *et al.*, 2011). Elle joue un rôle important dans l'hydrophobicité et les propriétés d'adhésion des spores (Lequette *et al.*, 2012). D'autres protéines de l'exosporium ont été identifiées comme ExsM, connue pour son rôle dans la formation de l'exosporium (Fazzini *et al.*, 2010); les protéines ExsK et YwdL, impliquées dans la structure et la maturation de l'exosporium ainsi que dans la germination (Severson *et al.*, 2009; Terry *et al.*, 2011) et enfin ExsA, impliquée dans l'ancrage de l'exosporium (Henriques and Moran, 2007).

Les rôles de l'exosporium sont multiples; il peut fournir une résistance à des traitements chimiques et enzymatiques. De plus, il améliore les propriétés d'adhésion des spores aux différentes surfaces. Il joue également un rôle dans la germination (Faille *et al.*, 2007).

2.2.2. Les tuniques

Les spores formées par *Bacillus*, *Clostridium* sont enfermés dans un réseau de protéines appelé « tuniques ». Chez *B. subtilis*, les tuniques sont entourées par une structure appelée crust; chez d'autres espèces, telles que *B. anthracis* et *B. cereus*, la spore possède une couche supplémentaire appelée exosporium (Henriques and Moran, 2007). Les tuniques comprennent en général une série de couches minces dont le nombre varie selon l'organisme (Driks, 1999). Chez *B. subtilis*, l'observation des coupes minces au microscope électronique à transmission (MET) révèle que cette structure est composée de deux principales couches : la tunique interne et la tunique externe. La première est formée par la juxtaposition de trois à six couches lamellaires alignées le long de la périphérie du cœur de la spore et ayant une largeur de 20-30 nm. La seconde est plus externe et plus large (40-90 nm), constituée de quatre à cinq couches, striées, denses aux électrons, alignées parallèlement à la surface des spores (Henriques and Moran, 2007; McKenney *et al.*, 2013).

Les analyses biochimiques des tuniques révèlent qu'elles sont largement composées de protéines avec des quantités mineures de glucides et de lipides (Leggett *et al.*, 2012). Les protéines des tuniques sont particulièrement riches en tyrosine et cystéine (Driks, 1999). Le

nombre total des protéines des tuniques est estimé à plus de 70, ayant un poids moléculaire compris entre 6 et 70 kDa (Henriques and Moran, 2007). Les études transcriptomiques et protéomiques révèlent qu'au moins 50 protéines des tuniques de *B subtilis* sont codées par le génome de *B. cereus* et *B. anthracis*. Ceci suggère que la composition de ces tuniques pourrait être conservée chez les trois espèces précitées. Cependant, les tuniques de *B. cereus* et *B. anthracis* apparaissent plus compactes (Henriques and Moran, 2007).

Les tuniques jouent un rôle majeur dans la protection des spores (Driks, 1999). Elles confèrent à la spore une résistance contre les enzymes qui peuvent dégrader le cortex telles que le lysozyme et autres substances sporocides comme le peroxyde d'hydrogène (Nicholson and Law, 1999). Les tuniques sont également impliquées dans la germination des spores (Driks, 1999; Mc Kenney *et al.*, 2013). Ce rôle sera détaillé dans la partie 4.6.

2.2.3. La membrane externe

Sous le manteau de la spore se trouve la membrane externe. Sa fonction exacte demeure incertaine, cependant cette membrane est une structure essentielle dans la formation de la spore (Leggett *et al.*, 2012; Setlow, 2006). Son identification en microscopie électronique est très difficile, mais les tests biochimiques ont prouvé sa présence dans la spore mature (Leggett *et al.*, 2012). La suppression de cette membrane chez des spores n'affecterait pas leurs résistances à la chaleur, aux radiations et à certains agents chimiques (Setlow, 2006).

2.2.4. Le cortex

Le cortex des spores est composé de peptidoglycane qui, bien que, largement similaire à celui des cellules végétatives, possède quelques modifications spécifiques, comme l'absence totale d'acide teichoïque dans les résidus N-acétylmuramique (NAM) (Leggett *et al.*, 2012). Il est composé d'une alternance de N-acétylglucosamine (NAG) lié au N-acétylmuramique (NAM). Environ 50 % des résidus NAM ne possèdent pas de chaînes peptidiques latérales mais ils sont cyclisés pour former le résidu spécifique de la spore, l'acide muramique γ -lactame, tandis que seulement 25 % des NAM possèdent une chaîne latérale de L-alanine (Figure 5).

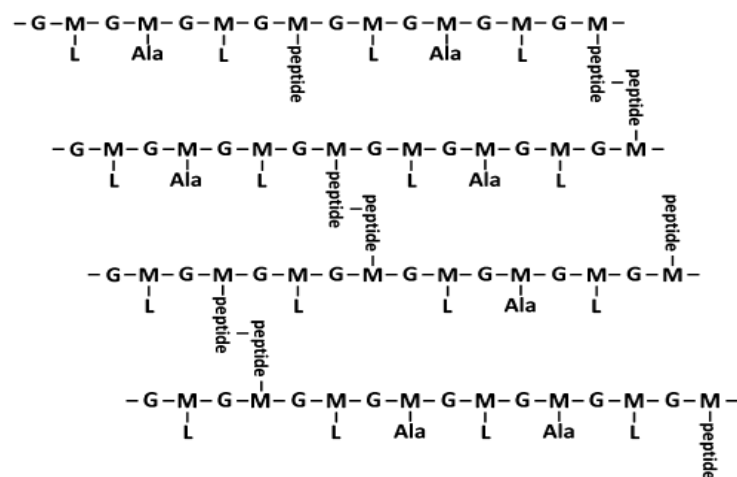


Figure 5 : Représentation schématique de la structure du peptidoglycane des spores. G: N-acetylglucosamine, M: N-acetylmuramique, M-L: muramique γ -lactame, peptide: des chaînes latérales tri-ou térapeptides (Leggett *et al.*, 2012).

La structure spécifique du cortex est bien conservée chez de nombreuses souches, telles que *B. cereus*, *B. subtilis*, *C. botulinum* et *C. megaterium* (Atrih and Foster, 2001). Durant la germination, le peptidoglycane du cortex est rapidement dégradé par les enzymes lytiques, présentes dans la spore en dormance (Setlow, 2006).

Le cortex a une importance cruciale dans la maintenance et la déshydratation du cœur de la spore mais il a également un rôle dans la résistance et la dormance (Meador-Parton and Popham, 2000). Ce rôle sera détaillé ultérieurement.

2.2.5. La membrane interne

La membrane interne des spores est une membrane phospholipidique qui deviendra la membrane plasmique de la cellule végétative après sa germination. Elle apparaît très compressée dans la spore en dormance. Sa composition en lipides est très similaire à celle de la membrane plasmique des cellules végétatives (Leggett *et al.*, 2012). Les lipides de la membrane interne sont en grande partie immobiles et deviennent mobiles lors de la germination des spores (Cowan *et al.*, 2004). Sa composition en protéines est, quant à elle, différente de celle des cellules végétatives (Leggett *et al.*, 2012).

La membrane interne est connue comme étant le site où sont localisés les récepteurs de la germination. Elle constitue donc une structure importante pour le processus de germination (Setlow, 2003). Elle constitue aussi une importante barrière de perméabilité jouant un rôle majeur dans la résistance des spores à de nombreux produits chimiques, en particulier ceux qui peuvent la traverser pour aller agir sur l'ADN contenu dans le cœur de la spore (Setlow, 2006).

2.2.6. Le cœur

Au centre de la spore se trouve le cœur, l'analogue du protoplaste chez les cellules végétatives. Il contient les enzymes de la spore ainsi que l'ADN, les ribosomes et les ARN_t. Dans la plupart des cas, les enzymes et les acides nucléiques de la spore sont identiques à ceux de la cellule végétative, bien qu'il existe quelques macromolécules propres au cœur de la spore (Setlow, 2006) :

- L'acide pyridine-2,6-dicarboxilique connu sous le nom d'acide dipicolinique (DPA) est un constituant spécifique de la spore où il se trouve le plus souvent lié à des cations divalents, en particulier le calcium (Ca^{2+}) (Setlow, 2006). Le DPA est synthétisé dans le compartiment de la cellule mère, puis stocké dans la pré-spore. Il est ensuite excrété à l'extérieur de la spore dans les premières minutes du processus de germination par un mécanisme encore mal connu.
- Les protéines SASP (*Small Acid-soluble Spore Proteins*) de type α/β sont des protéines spécifiques retrouvées uniquement dans le cœur de la spore. Elles sont synthétisées tardivement durant le processus de sporulation et sont ensuite dégradées pendant les premières étapes de la germination, donnant ainsi une source d'acides aminés pour la cellule en croissance (Setlow, 1988, Setlow, 1995). Les SASP de type α/β ont un poids moléculaire de 6 à 9 kDa; elles se lient directement à l'ADN de la spore afin de le saturer (Leggett *et al.*, 2012).

Le cœur de la spore contient seulement 27 à 55 % d'eau, comparé à 75 voire 80 % dans la cellule végétative (Gerhardt and marquis, 1989). Cependant, le mécanisme par lequel la spore réduit sa teneur en eau dans le cœur est encore mal connu (Setlow, 2006). Le pH du cœur de la spore (6.3-6.5) est également inférieur à celui de la cellule végétative (Setlow and setlow, 1980).

2.3. Propriétés physico-chimiques des spores bactériennes

Comme cité ci-dessus, la spore est une cellule métaboliquement inactive qui se forme dans des conditions hostiles. Elle est caractérisée par des propriétés de haute résistance à la chaleur, aux agents chimiques et aux rayonnements, des propriétés de germination et d'adhérence. Ces propriétés remarquables sont dues à la structure unique des spores.

2.3.1. Propriétés de dormance

Les spores sont capables de rester dans un état de dormance pendant de nombreuses, voire des milliers d'années (Kennedy *et al.*, 1994; Piggot and Hilbert, 2004; Setlow, 2006; Setlow and Johnson, 2007; Wei *et al.*, 2010). La raison majeure de cet état de dormance est la faible teneur en eau du cœur de la spore qui prévient toute réaction enzymatique (Setlow, 1993).

De plus, le peptidoglycane du cortex jouerait également un rôle (Ellar, 1978). Deux hypothèses sur le rôle du cortex dans ce maintien de cet état de dormance ont été proposées :

- La première est que dès sa formation, le cortex subirait un clivage enzymatique ce qui lui permet de s'accroître, engendrant ainsi une augmentation de la pression à l'intérieur du cœur de la spore interdisant toute entrée d'eau.
- La seconde hypothèse est que la complexité de la structure du cortex pourrait jouer un rôle dans la déshydratation du cœur de la spore (Foster, 1994).

2.3.2. Propriétés de résistance

La spécificité des spores comparées aux cellules végétatives est leur remarquable résistance à la chaleur. Les spores de *B. subtilis* par exemple, peuvent survivre à une chaleur humide de 100 °C, avec une valeur de D (temps de réduction décimale, le temps nécessaire pour abaisser la population par un facteur 10) comprise entre 20 et 30 min selon les souches. De plus, les spores sont approximativement 1000 fois plus résistantes à la chaleur sèche qu'à la chaleur humide (Nicholson *et al.*, 2000). Les dommages causés aux spores par la chaleur et les agents chimiques ainsi que les facteurs impliqués dans la résistance à ces agents sont résumés dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Facteurs impliqués dans la résistance des spores à la chaleur et aux agents chimiques.

Type de résistance	Domages causés	Structure/facteur impliqués dans la résistance
-Chaleur humide	- Mécanisme non établi	<u>Teneur du cœur en eau :</u> - L'augmentation de la température ainsi que de la teneur du cœur en minéraux et en DPA augmente la résistance en diminuant la teneur du cœur en eau (Coleman <i>et al.</i> , 2007 ; Nicholson <i>et al.</i> , 2000 ; Setlow <i>et al.</i> , 2000) - Les protéines SASP protègent les spores en protégeant l'ADN (Setlow and Setlow, 1994)
-Chaleur sèche	- Lésions au niveau de l'ADN : mutations, dégradation	<u>Cœur :</u> -Les protéines SASP (α/β) protègent l'ADN contre la chaleur sèche (Nicholson <i>et al.</i> , 2000)
-Agents chimiques :		
A) Formaldéhyde, Acide nitreux	-Lésions au niveau de l'ADN : mutation du gène <i>recA</i> ce qui les rend sensibles à ces agents	<u>Cœur :</u> -Les protéines SASP protègent l'ADN afin d'éviter les mutations (Setlow, 2006)
B) Agents oxydants	-Lésions au niveau de la membrane interne	<u>Tuniques protéiques :</u> -Barrière réactive, détoxifiant les agents oxydants avant la pénétration à l'intérieur de la spore (Setlow, 2006)
C) Solvants organiques	-Lésions au niveau de l'ADN : agents génotoxiques	<u>Membrane interne :</u> -La diminution de la perméabilité de la membrane interne augmente la résistance des spores à ces agents chimiques (Cortezzo and Setlow, 2005)
-Rayonnements UV	-Lésions au niveau de l'ADN : formation de « Spores Photoproduct : SP »	<u>Système de réparation de l'ADN :</u> -SP-lyase (Nicholson <i>et al.</i> , 2000)

2.3.2.1. Résistance à la chaleur humide

Les spores sont une préoccupation majeure en industrie agro-alimentaire à cause de leur extrême résistance et persistance dans l'environnement (Marquis *et al.*, 1994; Nicholson *et al.*, 2000). Beaucoup d'efforts ont été entrepris afin de les éliminer. La chaleur humide est utilisée couramment pour l'inactivation des spores (Coleman *et al.*, 2007). C'est l'une des propriétés les plus marquantes des spores de *Bacillus* et de *Clostridium*. Généralement, les spores résistent à des températures d'environ 40 °C plus élevées que ne le sont leurs cellules végétatives (Setlow, 2006).

Le principal facteur qui détermine la résistance des spores à la chaleur humide est la teneur en eau du cœur. Chez les *Bacillus*, plus la teneur en eau est faible, plus les spores sont résistantes à la chaleur humide (Setlow, 2006). De nombreuses études ont montré que les spores préparées à des températures plus élevées sont généralement plus thermorésistantes que celles préparées à des températures inférieures (Setlow, 2006). Une des principales raisons de cet effet est que, le contenu en eau du cœur des spores diminue à mesure que la température de sporulation augmente (Nicholson *et al.*, 2000).

D'autres facteurs jouent également un rôle dans la résistance des spores à la chaleur humide comme la présence des protéines SASP et la minéralisation du cœur de la spore (Coleman *et al.*, 2007; Nicholson *et al.*, 2000; Setlow *et al.*, 2000).

Des études sur un mutant de *B. subtilis* dépourvu de protéines SASP de type α/β ont montré que les spores de ce mutant étaient nettement plus sensibles à la chaleur humide que celles de la souche sauvage et que ces spores étaient détruites en grande partie par des lésions au niveau de l'ADN (Setlow and Setlow, 1994). Il semble donc que les protéines SASP protègent les spores contre la chaleur humide, en protégeant leur ADN.

Un autre facteur semble être important dans la résistance des spores à la chaleur humide ; il s'agit de l'acide dipicolinique (DPA), constituant important du cœur de la spore. Il a été montré que les spores avec un faible taux de DPA étaient plus sensibles à la chaleur humide que celles avec un taux élevé (Setlow, 2006). Le cœur de la spore contient également un taux extrêmement élevé de minéraux sous la forme de cations divalents, principalement Ca^{+2} et Mg^{+2} ; il contient aussi (dans une moindre mesure) des ions Mn^{+2} (Murrell, 1967). Plus de 75 % de ces cations divalents sont associés au DPA de la spore. En général, plus la concentration de ces cations est élevée, plus les spores sont résistantes à la chaleur humide (Nicholson *et al.*, 2000).

Si de nombreux facteurs sont impliqués dans la résistance des spores à la chaleur humide, la teneur du cœur en eau reste le facteur déterminant. Cependant, le mécanisme par lequel la chaleur humide détruit les spores reste encore à établir.

2.3.2.2. Résistance à la chaleur sèche

En plus de la chaleur humide, les spores sont plus résistantes à la chaleur sèche que ne le sont les cellules végétatives (Nicholson *et al.*, 2000; Setlow, 2006). La destruction des spores par la chaleur sèche semble se faire en grande partie par des dommages de l'ADN (dégradations et/ou mutations) (Setlow and Setlow, 1995).

Chez *B. subtilis*, des mutants de systèmes de réparation de l'ADN (mutants *recA*) sont plus sensibles à la chaleur sèche que les souches sauvages. Il semblerait donc que la capacité de réparation de l'ADN soit un facteur important dans la détermination de la résistance des spores à la chaleur sèche (Setlow and Setlow, 1996).

Un autre facteur a été identifié comme ayant un rôle majeur dans la résistance des spores de *B. subtilis* à la chaleur sèche ; il s'agit des protéines SASP de type α/β (Nicholson *et al.*, 2000). Il a été montré que les spores de *B. subtilis* dépourvues de protéines SASP de type α/β étaient beaucoup moins résistantes à la chaleur sèche que les souches sauvages, et que cette destruction par la chaleur sèche était aussi accompagnée par des lésions au niveau de l'ADN (Setlow and Setlow, 1995). De plus, les protéines SASP protègent l'ADN *in vitro* contre les dépurinations causées par la chaleur sèche ; ceci suggère que ces protéines liées à l'ADN seraient un facteur majeur dans la résistance des spores à la chaleur sèche (Nicholson *et al.*, 2000).

2.3.2.3. Résistance aux agents chimiques

Les spores sont généralement plus résistantes que les cellules végétatives à une variété de produits chimiques tels que les acides, les bases, les phénols, les aldéhydes, les agents alkylants et les agents d'oxydation (Clavel *et al.*, 2004; Setlow, 2006; Tennen *et al.*, 2000).

- Le traitement des spores à l'acide tue probablement les spores par la rupture de la barrière de perméabilité de la membrane interne, alors que les bases fortes dénaturent les spores en inactivant les enzymes lytiques présentes au niveau du cortex (Setlow *et al.*, 2002).

- Dans le cas du formaldéhyde, de l'acide nitreux, et des agents alkylants, l'inactivation des spores se fait par des lésions de l'ADN, et les spores survivantes possèdent des mutations au niveau du gène *recA*, ce qui les rend plus sensibles à ces agents (Setlow, 2006).
- En ce qui concerne les aldéhydes tels que le glutaraldéhyde et l'ortho-phthalaldéhyde (OPA), le mécanisme de dénaturation des spores par ces deux agents reste incertain, même si ces deux derniers agents chimiques ne dénaturent pas les spores en endommageant leurs ADNs (Cabrera-Martinez *et al.*, 2002; Tennen *et al.*, 2000).
- Les agents oxydants quant à eux, semblent dénaturer les spores en provoquant des dommages au niveau de leurs couches extérieures, principalement au niveau des membranes internes, une membrane dont l'intégrité est essentielle pour la viabilité des spores (Cortezzo *et al.*, 2004). Si l'oxydation des acides gras insaturés ne semble pas être en cause dans ce mécanisme, la nature exacte des dommages causés au niveau de la membrane interne par ces agents oxydants n'est pas connue (Setlow, 2006).

Ainsi, de nombreux mécanismes sont impliqués dans la protection des spores contre ces différents agents chimiques : les tuniques protéiques, la faible perméabilité de la membrane interne et les protéines SASP de type α/β (Nicholson *et al.*, 2000).

- Concernant les tuniques protéiques, elles protégeraient les spores contre certains agents chimiques, en particulier les agents oxydants comme le dioxyde de chlore, l'hypochlorite, l'ozone et le peroxyde d'hydrogène (Genest *et al.*, 2002; Melly, Cowan, *et al.*, 2002; Riesenman and Nicholson, 2000; Setlow *et al.*, 2000; Young and Setlow, 2003). Cette couche de tuniques serait impliquée dans la résistance des spores aux agents chimiques comme une barrière réactive, détoxifiant ces agents chimiques avant leur pénétration à l'intérieur de la spore (Setlow, 2006).
- Le second facteur ayant un rôle dans la résistance des spores aux agents chimiques est la perméabilité de la membrane interne. Celle-ci présente une faible perméabilité aux petites molécules hydrophiles et hydrophobes. Il a été montré qu'une augmentation de la perméabilité de cette membrane induite par diminution de la température de sporulation conduit à une sensibilité accrue des spores aux agents chimiques (Cortezzo and Setlow, 2005).
- Le troisième facteur important dans la résistance des spores à certains produits chimiques est la saturation de l'ADN des spores avec les protéines SASP de type α/β (Nicholson *et al.*, 2000; Setlow, 2006). Ainsi, les spores de la souche mutante α^-/β^- sont beaucoup plus

sensibles au peroxyde d'hydrogène et sont inactivées par lésion de l'ADN tandis que les spores de la souche sauvage α^+/β^+ y sont résistantes. Cependant, les protéines SASP de type α/β ne protègent pas l'ADN des spores contre tous les produits chimiques, tels que les agents d'alkylation (comme l'éthylméthanesulfonate) (Setlow *et al.*, 1998).

2.3.2.4. Résistance aux rayonnements

2.3.2.4.1. Rayonnements UV

Les spores de diverses espèces de *Bacillus* sont parmi les plus résistantes aux rayonnements UV. Cette résistance aux UV varie significativement entre les spores suivant les espèces et les souches; cependant, les raisons de cette différence de résistance aux UV des spores ne sont pas encore connues. (Nicholson *et al.*, 2005). De plus, les spores sont 10 à 100 fois plus résistantes aux rayonnements UV à 254 nm que ne le sont leurs cellules végétatives. Cependant, l'amplitude de la différence dans la résistance aux UV entre les spores et les cellules en croissance peuvent être différentes selon les longueurs d'onde appliquées (Nicholson *et al.*, 2000; Nicholson *et al.*, 2005).

L'absorption des UV par les acides nucléiques cause des ruptures au niveau de l'ADN, ainsi que des dimères de thymine. Ces lésions bloquent la progression de la synthèse d'ADN, ce qui peut entraîner la mort de la cellule (Coohill and Sagripanti, 2009). Dans le cas des spores, les radiations UV génèrent principalement des « dimères cyclobutane : CPDs » ainsi que des « 6-4-photoproduits : 64PPs », formés entre deux pyrimidines adjacentes sur le même brin d'ADN (Figure 6).

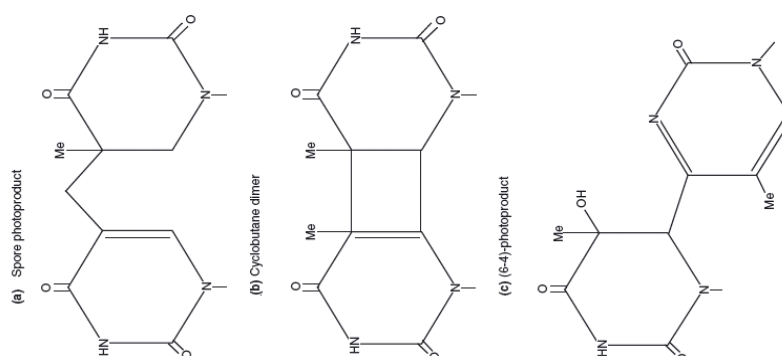


Figure 6 : Structure de photoproduits de spores (a), de dimère cyclobutane (b) et de 6-4-photoproduit (c) entre deux thymines adjacentes (Setlow, 2006).

Le produit prédominant est appelé « spore photoproduct : SP » et correspond à des dimères de 5-thyminyl-5,6-dihydrothymine, formés entre deux thymines adjacentes sur un même brin d'ADN (Nicholson *et al.*, 2000; Setlow, 2006). La cause principale de la formation de ces SP de l'ADN dans des spores est la saturation de l'ADN sporal par les protéines SASP de type α/β . Ainsi, la liaison de l'ADN avec les SASP de type α/β *in vitro* favorise la formation de SP (Nicholson *et al.*, 2000).

Pour se protéger des rayonnements UV, les spores possèdent des systèmes de réparation de l'ADN. Les SP sont des lésions beaucoup moins profondes que ne le sont les CPDs et les 64PPs. Les SP sont réparés dans les premières minutes qui suivent la germination des spores par un mécanisme de réparation spécifique faisant intervenir une enzyme appelée la SP-lyase qui monomérisé le SP en deux thymines, sans clivage du brin d'ADN (Nicholson *et al.*, 2000).

2.3.2.4.2. Rayonnements γ

Les spores sont nettement plus résistantes aux rayonnements ionisants (γ) que le sont les cellules végétatives (Nicholson *et al.*, 2000). La raison de cette résistance élevée n'est pas vraiment claire. Bien que le DPA soit impliqué dans la résistance des spores aux UV, il n'existe pas d'informations sur son rôle possible dans la résistance des spores aux rayonnements γ . Quant aux protéines SASP de type α/β , elles ne semblent pas être impliquées dans la résistance des spores aux rayonnements γ (Nicholson *et al.*, 2000; Setlow, 2006).

2.3.2.4.3. Lumière pulsée

La lumière pulsée est définie par des impulsions de lumière blanche de courte durée (25 secondes), délivrée par une lampe à xénon, ayant un large spectre (200-1100 nm) riche en UV (200-400 nm). Cette technique est utilisée en industrie afin de décontaminer les aliments (œufs, lait), les liquides, les surfaces, les emballages ainsi que les microorganismes (Farrell *et al.*, 2010; Hierro *et al.*, 2009; Rajkovic *et al.*, 2010). Les premiers traitements de désinfection par la lumière pulsée ont été réalisés dans les années 1970, au Japon (Wekhof, 2000).

Les mécanismes d'inactivation par la lumière pulsée sont l'action photothermique du spectre entier et également l'action photochimique des longueurs d'onde UV.

Le premier mécanisme semble causer des dommages au niveau des membranes. En effet, des études de Microscopie Electronique à Balayage (MEB) menées par Wekhof *et al.* (wekhof *et al.*, 2001) sur des spores d'*Aspergillus niger* traitées par la lumière pulsée ont montré d'importantes déformations des spores. Dans le cas des spores de *B. subtilis*, l'exposition à la lumière pulsée n'a pas conduit aux mêmes observations que pour *A. niger*.

Le second mécanisme d'inactivation est le même que celui des UV continus. Il aurait donc un effet direct sur les molécules d'ADN en provoquant des dimères de pyrimidine (thymine en particulier), bloquant la synthèse de l'ADN, provoquant ainsi la mort de la cellule (Gomez-Lopez *et al.*, 2007). Chez les spores bactériennes, la destruction par les UV présents dans la lumière pulsée se fait par formation de « spore photoproduct » comme indiqué précédemment (Nicholson *et al.*, 2000).

2.3.3. Propriétés d'adhérence

Comme indiqué dans la partie 2.2.1, les spores du groupe *B. cereus* (telles que *B. cereus*, *B. anthracis* ou *B. thuringiensis*) sont caractérisées par la présence d'une couche externe dite exosporium, qui les entoure. Cette couche est suspectée de jouer un rôle majeur dans l'adhésion des spores aux différentes surfaces (Lequette *et al.*, 2011).

En effet, des études menées par Faille *et al.* (Faille *et al.*, 2007) ont montré que des spores de *B. cereus* avec un exosporium endommagé avaient une capacité à adhérer à des surfaces inertes et à résister aux traitements de nettoyage significativement diminuée par rapport à des spores intactes. De plus, une autre étude menée par Faille et ses collaborateurs (Faille *et al.*, 2002) a révélé que l'adhésion ainsi que la résistance des spores de *B. cereus* aux procédures de lavage était 10 fois plus importantes que celles des spores de *B. subtilis* qui elles, ne possèdent pas d'exosporium. Une autre étude menée sur les propriétés de surface des spores de plusieurs souches de *B. cereus* ainsi que leurs capacités à adhérer à l'acier inoxydable et à résister aux procédures de nettoyage en place (NEP) a révélé des différences significatives dans leur morphologie (taille de l'exosporium, longueur et le nombre d'appendices) ainsi que dans la composition et le caractère hydrophobe de leurs protéines de surface. Les propriétés d'adhérence de ces spores variaient également d'une souche à une autre et l'aptitude à adhérer augmentait lorsque les spores étaient entourées par de longs appendices ou par un exosporium de petite taille (Tauveron *et al.*, 2006).

2.3.4. Propriété de germination

En dépit de leur dormance et de leur résistance, les spores conservent un mécanisme sensible, capable de détecter et de réagir rapidement à la présence de substances spécifiques afin de lancer le processus de la germination puis de la reprise de croissance (Barlass *et al.*, 2002). La germination est donc un processus par lequel une spore dormante se transforme en une cellule végétative métaboliquement active (Cheung *et al.*, 1999). Le détail sur les germinants, les récepteurs de la germination ainsi que les mécanismes de la germination sera abordé dans la partie 4 de l'étude bibliographique.

3. Etapes et mécanismes de la sporulation

3.1. Etapes morphologiques de la sporulation

Le processus de formation des spores thermorésistantes a été largement étudié pour la bactérie modèle *B. subtilis*. Ce processus est initié en réponse à un nombre de signaux externes et internes tels que l'augmentation de la densité cellulaire ainsi que l'appauvrissement du milieu en nutriments et dure généralement entre 8 et 10 h (de Hoon *et al.*, 2010).

Les étapes morphologiques de la sporulation sont similaires chez toutes les espèces des genres *Bacillus* et *Clostridium* (Hilbert and Piggot, 2004). Elles ont été mis en évidence par microscopie électronique et sont au nombre de 7 étapes (Errington, 1993) (Figure 7).

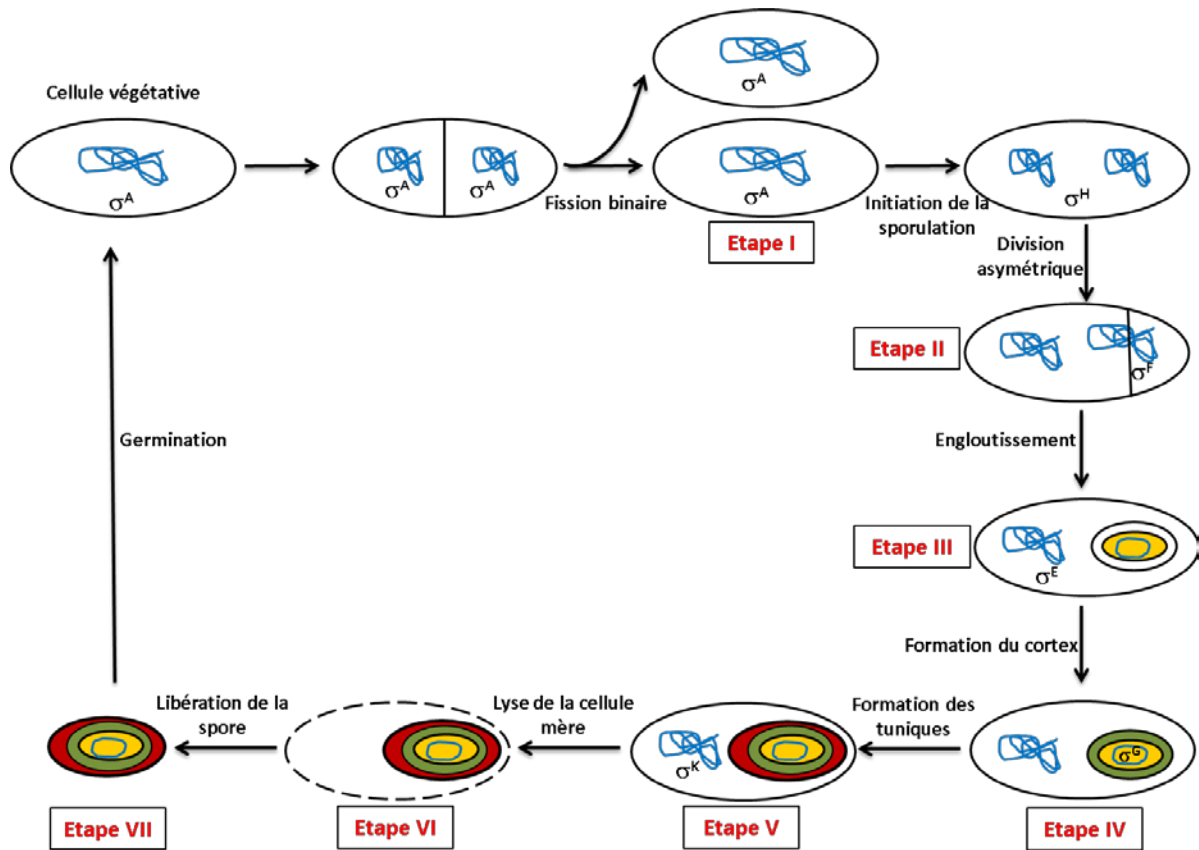


Figure 7 : Principales étapes morphologiques du cycle de vie de *B. subtilis* d'après de Hoon *et al.* (de hoon *et al.*, 2010).

- L'étape 0 correspond à la phase où les cellules végétatives se préparent à la sporulation. Elle correspond généralement à la fin de la phase exponentielle de croissance (Errington, 1993).
- L'étape I désigne la formation d'un filament de chromatine axial, où deux copies de chromosomes se condensent et s'allongent pour former un filament axial qui s'étend le long de la cellule (Hilbert and Piggot, 2004).
- L'étape II commence par la formation d'un septum qui correspond à une division asymétrique donnant naissance à deux cellules de tailles différentes, une petite appelée pré-spore qui deviendra la spore dormante et une autre, de plus grande taille appelée cellule mère. Cette dernière est nécessaire à la formation de la pré-spore et se lyse à la fin du processus pour libérer la spore mature (Hilbert and Piggot, 2004). Au moment de la division asymétrique, seul un tiers du chromosome est présent dans le compartiment de la pré-spore, mais peu de temps après, les deux tiers restant sont rapidement acquis donnant ainsi deux cellules de tailles différentes mais de génomes identiques (Hilbert and Piggot, 2004).

- Juste après la division asymétrique, vient l'engloutissement de la pré-spore par la cellule mère. Cette étape III est semblable au processus de phagocytose et est entraînée par des protéines de la cellule mère facilitant la migration de la membrane autour de la pré-spore par élimination enzymatique du peptidoglycane (de Hoon *et al.*, 2010). Après l'achèvement de l'engloutissement, la pré-spore est entièrement entourée de ses deux membranes interne et externe (Setlow and Johnson, 1997).
- L'étape IV de la sporulation désigne la formation d'une structure de peptidoglycane, déposée entre les deux membranes interne et externe, appelée cortex (Driks, 2002). En parallèle à la formation du cortex, la paroi cellulaire formée également de peptidoglycane est synthétisée entre la membrane interne et le cortex (Setlow and Johnson, 1997).
- A la suite de l'étape IV, une structure complexe composée de protéines de la surface externe de la pré-spore appelée tunique de la spore est construite; ceci correspond à l'étape V de la sporulation (Hilbert and Piggot, 2004).
- L'étape VI du développement de la spore appelée maturation se produit avec peu de changements morphologiques, car au cours de cette étape, les propriétés de résistance, de dormance et de germination se développent (Errington, 1993).
- L'étape VII est l'étape de libération de la spore mature après lyse de la cellule mère.

3.2. Les gènes impliqués dans la sporulation

Les mécanismes et la régulation génétique de la sporulation ont été principalement étudiés chez l'espèce modèle *B. subtilis*. Environ 170 gènes sont impliqués dans la sporulation dont certains, tels que les facteurs σ et les gènes *spo* jouent des rôles majeurs durant la sporulation.

3.2.1. Les facteurs sigma

Les facteurs sigma sont des facteurs protéiques qui en se liant de manière transitoire à l'enzyme ARN polymérase, sont impliqués dans l'interaction entre cette enzyme et ses sites de reconnaissance sur l'ADN. De plus, ces facteurs sigma reconnaissent des promoteurs contenant des séquences conservées centrées à environ -10 et -35 du site de l'initiation de la transcription (Errington, 1993).

Le réseau de régulation de la sporulation chez *B. subtilis* est organisé de façon temporelle, avec une cascade de quatre facteurs sigma spécifiques à la sporulation activant ainsi une collection de gènes de la sporulation précédemment inactifs (Errington, 1993). Les facteurs σ^F dans la préspore et σ^E dans la cellule mère dirigent l'expression des gènes au début de la sporulation puis, ils sont remplacés par σ^G et σ^K respectivement qui dirigent l'expression des gènes à la fin de la sporulation (Steil *et al.*, 2005 ; de Hoon *et al.*, 2010). Un autre facteur sigma est actif dans la cellule en division, il s'agit de σ^H . Il est essentiel pour l'initiation de la sporulation car il régule la transcription de deux opérons clés de la sporulation: *spo0A* et *spoIIA*. Le facteur σ^H dirige également des gènes non spécifiques à la sporulation (Siranosian and Grossman, 1994).

3.2.2. Les gènes *spo*

Des études génétiques antérieures ont désigné environ 50 loci *spo* impliqués dans le contrôle de la sporulation. La désignation *spo* a été utilisée par rapport aux mutations qui affectaient la formation des spores sans pour autant affecter la croissance végétative. Par la suite, ces *spo* ont été nommés d'après l'étape à laquelle une mutation dans le locus bloquait la sporulation; ainsi, les désignations *spo0*, *spoII*, *spoIII* indiquent que les mutations de ces loci permettraient de progresser aux stades 0, II et III mais pas au-delà (Errington, 1993).

spo0A appartient à cette grande famille de gènes *spo*. Il est transcrit à partir de σ^A durant la phase de croissance végétative (Stragier and Losick, 1996). Le gène *spo0A* codant pour la protéine Spo0A appartient à une large famille de protéines bactériennes appelées régulateurs de réponse. Ces régulateurs possèdent généralement un domaine N-terminal bien conservé et un résidu d'acide aspartique qui est la cible de la phosphorylation par une ou plusieurs protéines de type histidine kinase (Errington, 1993). La phosphorylation contrôle l'activité du domaine C-terminal de la protéine Spo0A dans sa liaison à l'ADN. Bien que Spo0A sous forme non phosphorylée peut se lier à l'ADN, sa liaison est renforcée par la phosphorylation. Sa fonction est donc dépendante de celle-ci (Errington, 1993; Fujita and Losick, 2005). La phosphorylation de la protéine Spo0A est donc la clé de l'entrée en sporulation (Errington, 2009). Cette partie sera abordée ultérieurement.

3.2.3. Les autres gènes

Plusieurs gènes impliqués dans la sporulation ont été identifiés sur la base des produits qu'ils codent (Errington, 1993). Parmi ces gènes, *abrB* transcrit durant la phase de croissance végétative où son expression est maximale pendant la phase de latence ainsi qu'au début de la phase exponentielle. Au cours de la phase stationnaire, son expression est inhibée par le régulateur majeur de l'initiation de la sporulation Spo0A. Le facteur AbrB est important dans l'initiation de la sporulation car c'est un régulateur de réponse négatif de divers gènes de la sporulation tels que *spo0E*, *spo0H* et *spoVA* (Errington, 1993 ; stragier and losick, 2004 ; Lucking *et al.*, 2009).

Un autre gène codant pour une protéine impliquée dans le contrôle du niveau de phosphorylation de Spo0F (impliquée dans l'initiation de la sporulation). Il s'agit du gène *rap* (Diaz *et al.*, 2012).

Une autre catégorie de gènes nécessaire à la sporulation est exprimée au cours de la croissance. Il s'agit des gènes codant pour les protéines de division cellulaire FtsZ qui jouent un rôle important dans la formation du septum asymétrique en formant un complexe stable avec la protéine SpoIIE (Errington, 1993 ; Lucet *et al.*, 2000).

D'autres gènes sont impliqués dans la sporulation, à savoir, ceux qui codent pour les protéines des tuniques des spores ainsi que les SASP (*Small Acid-soluble Spore Proteins*).

3.3. Initiation de la sporulation

Deux régulateurs transcriptionnels jouent un rôle clé dans l'initiation de la sporulation, à savoir σ^H et Spo0A (Errington, 1993). Spo0A est activé par un phosphorelais impliquant des histidines kinases et autres facteurs de la sporulation comme Spo0B et Spo0F (Hilbert and Piggot, 2004 ; fujita, 2005 ; Paredes *et al.*, 2005).

La sporulation est initiée en réponse à un nombre de signaux externes et internes tels que l'augmentation de la densité cellulaire et l'appauvrissement du milieu en nutriments (Errington, 1993). En effet, l'augmentation de la densité cellulaire aboutit à la sécrétion de peptides qui s'accumulent dans le milieu extracellulaire. Lorsque ces peptides atteignent un niveau critique, ils sont détectés par des récepteurs de la surface des cellules, capables de transférer un phosphate à partir d'une molécule d'ATP vers des histidines kinases (KinA, KinB) (Sonenshein, 2000).

Par la suite, les kinases phosphorylent Spo0F et Spo0F~P résultant, à son tour, transfère le phosphate à Spo0B. Enfin, Spo0B~P transfère le phosphate à Spo0A entraînant son activation (Sonenshein, 2000 ; Piggot and Hilbert, 2004 ; Fujita and Losick, 2005). Au début, Spo0A phosphorylé (dont la synthèse est inhibée par les gènes *abrB*, *codY* et *rap*) est produit à faible niveau, ce qui permet la répression du gène *abrB* qui code pour des répresseurs instables des gènes de la phase stationnaire, dont les gènes de la sporulation (Kobayashi *et al.*, 2008). De plus, l'appauvrissement du milieu déclenche une chute du GTP intracellulaire entraînant ainsi l'inactivation de la protéine CodY. Ainsi, l'inhibition de la transcription des gènes *abrB* et *codY* entraînent une activation de la synthèse de Spo0A phosphorylé (Figure 8).

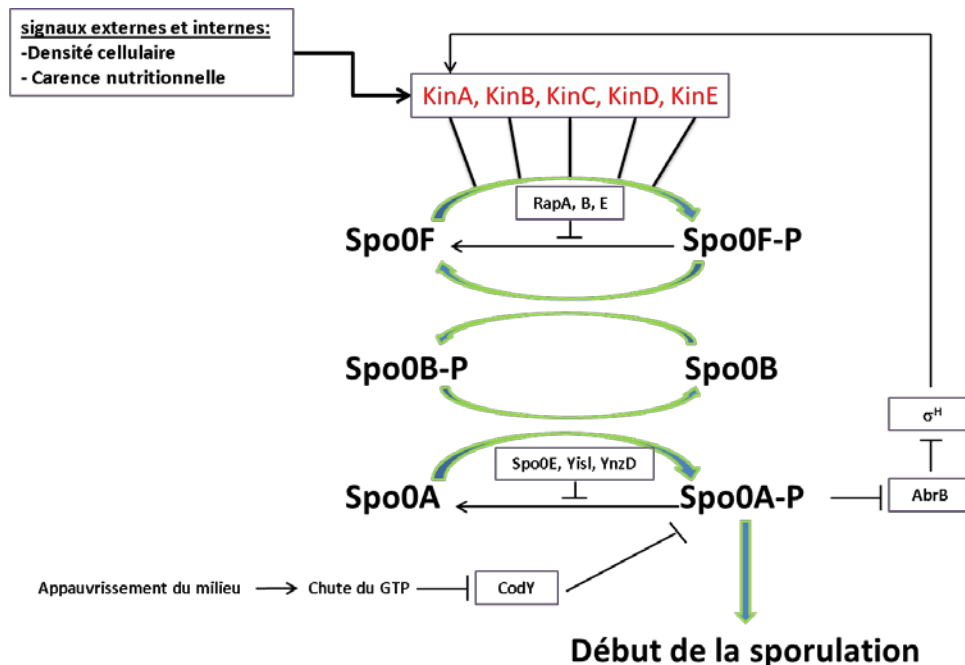


Figure 8 : Schéma représentatif de l'initiation de la sporulation.

La cascade de phosphorylation est représentée en vert, les voies de régulation sont indiquées en noir, d'après Piggot et Tojo (Piggot and Hilbert, 2004 ; Tojo *et al.*, 2013).

Une fois activé par phosphorylation, ce régulateur majeur se lie à une séquence d'ADN connue sous le nom de la « boîte-0A », où il agit à la fois comme un répresseur de certains gènes exprimés dans la cellule végétative et comme un activateur d'autres gènes impliqués dans la sporulation (Piggot and Losick, 2002). Des analyses génomiques ont indiqué que Spo0A régule la transcription de plus de 500 gènes, incluant au moins 121 gènes avec une transcription directe (Piggot and Hilbert, 2004 ; de Hoon *et al.*, 2010). Parmi ces gènes, ceux

impliqués dans le remodelage des chromosomes de la cellule en sporulation dans un « filament axial » ainsi que dans la formation du septum asymétrique (Ben yehuda and Losick, 2002).

Les orthologues de *spo0A* ont été identifiés chez toutes les bactéries sporulantes. Cependant, les voies conduisant à l'activation de Spo0A par phosphorylation diffèrent entre les *Bacillus* et les *Clostridium*. Cette différence réside dans l'absence ou la présence d'autres composants clés du phosphorelais : Spo0B et Spo0F. Ces deux derniers sont absents chez les *Clostridium*. Contrairement aux espèces du genre *Bacillus*, Spo0A serait phosphorylé directement par une histidine kinase et ne passerait pas par un phosphorelais chez les *Clostridium* (Stephenson and Hoch, 2002 ; Stragier, 2002 ; Molle *et al.*, 2003).

3.4. Régulation génétique de la sporulation

L'accumulation de Spo0A~P active la transcription d'au moins sept gènes dont *spoIIAC* ou *sigF* et *spoIIGB* ou *sigE*, codant pour les facteurs σ^F et σ^E , respectivement. Ces facteurs régissent l'entrée en sporulation et le passage d'un à deux compartiments cellulaires (préspore et cellule mère) dans lesquels la transcription des gènes est régulée de manière différentielle (Piggot and Losick, 2002 ; Stagier and Losick, 2004). Ce processus est appelé cloisonnement et correspond à la formation d'un septum asymétrique (étape II). Sa formation nécessite une protéine appelée SpoIIE qui interagit avec la protéine de la division cellulaire à savoir, FtsZ et forme un complexe stable (Errington, 1993 ; Hilbert and Piggot., 2004). La protéine SpoIIE intervient également dans l'activation de la transcription de σ^F et est activée par Spo0A.

Juste après le cloisonnement de la spore, de nombreux gènes sont spécifiquement activés dans le compartiment de la cellule mère mais aussi dans le compartiment de la préspore. Les transcriptions dans les 2 compartiments sont sous le contrôle des deux facteurs sigma, σ^E (compartiment de la cellule mère) et σ^F (compartiment de la préspore) (Higgins and Dworkin, 2012). Cependant, les gènes codant ces deux facteurs clés, *spoIIGB* et *spoIIAC* ne sont exprimés que dans la cellule en division avant la fin de la formation du septum (Errington, 1993). σ^E et σ^F sont synthétisés sous forme de précurseurs inactifs (Pro σ) à partir des opérons *spoIIG* et *spoIIA*, respectivement et deviendront actifs une fois le cloisonnement terminé :

- Pro- σ^F est codé par le 3^{ème} gène de l'opéron *spoIIA*. Les autres produits de cet opéron (*spoIIAB* et *spoIIAA*) contrôlent son activité. Il est donc maintenu inactif grâce à sa

liaison à SpoIIAB : l'anti- σ (Stargier and Losick, 2004). Après le cloisonnement et dans la préspore, SpoIIAA déplace le complexe formé par SpoIIAB et σ^F ce qui le rend actif et permet donc la transcription de *spoIIR* et *spoIIIG*.

- Pro- σ^E est codé à partir du second gène de l'opéron *spoIIG* (*spoIIGB*). Le premier gène de cet opéron (*spoIIGA*) code pour une protéase localisée au niveau du septum et activée par *spoIIR*. Cette protéase est nécessaire pour activer σ^E (Errington, 1993 ; stragier and losick, 2004 ; Higgins and Dworkin, 2012).

Après l'achèvement de la cloison, les chromosomes de la préspore et de la cellule mère se lancent dans des programmes différents d'expression des gènes, comme résultats de la séparation des activités des deux facteurs sigma clés. Environ deux heures après l'initiation de la sporulation, l'engloutissement (étape III) de la préspore par la cellule mère est achevé. En conséquence de cet engloutissement, la synthèse du facteur σ^G ainsi que l'assemblage du cortex, des tuniques et de l'exosporium (dans le cas de *B. cereus* et de *B. anthracis*) débutent (Henriques and Moran, 2007).

σ^G est le produit du gène *spoIIIG*. Il en résulte l'activation d'environ 100 gènes tels que les gènes *ssp* (SASP) et les gènes de la germination *ger* (dont le rôle sera abordé dans la partie 4) dont les produits apportent des changements physiologiques et biochimiques dans les propriétés des spores (de Hoon *et al.*, 2010).

Tout comme σ^E et σ^F , le facteur σ^K est synthétisé sous forme de précurseur inactif dans la cellule mère (Piggot and hilbert, 2004). Sa synthèse est régulée à trois niveaux

- i) le premier implique σ^E qui permettra la maturation du gène qui code pour σ^K
- ii) le second niveau implique un remarquable réarrangement de l'ADN. En effet, chez *B. subtilis*, le cadre de lecture de *sigK* est interrompu par un fragment de 48 Kpb appelé « *skin* » et codé par le gène *spoIVCA* (Kunkel *et al.*, 1990). Une partie de ce gène code pour la protéine SpoIVCA qui va exciser *skin*, permettant ainsi d'avoir un gène *sigK* continu (Errington, 1993).
- iii) Enfin, le 3^{ème} niveau de régulation implique le traitement de pro- σ^K donnant ainsi un facteur σ^K actif ; cette étape nécessite une protéolyse catalysée par la protéine SpoIVFB, elle-même sous le contrôle de σ^G (Errington, 1993 ; piggot and hilbert, 2004) (Figure 9).

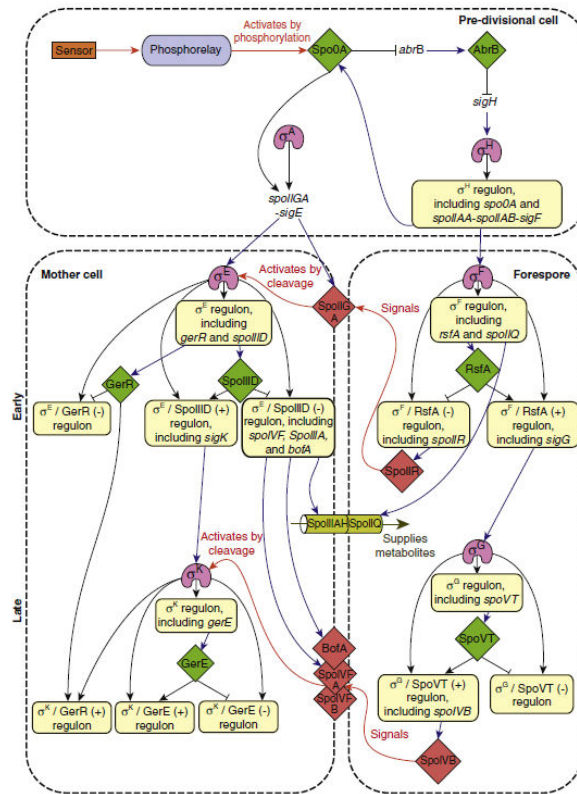


Figure 9 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la régulation des facteurs sigma de la sporulation.

La progression temporelle de la sporulation est représentée du haut vers le bas. Chaque compartiment cellulaire (cellules pré-divisionnaire, préspore et cellule mère) est entouré par des lignes en pointillés. Les facteurs sigma sont présentés en rose, les facteurs de transcription en vert, et les régulons en jaune. Les protéines de signalisation sont indiquées en rouge. La régulation de la transcription est indiquée par des flèches noires, l'expression des gènes par des flèches bleues, et les voies de signalisation par des flèches rouges (de Hoon et al., 2010).

Juste avant la formation du cortex, deux membranes distinctes, séparées par la paroi de la cellule (une fine couche de peptidoglycane) entourent la préspore. L'assemblage du peptidoglycane du cortex de la spore se produit alors dans l'espace compris entre ces deux membranes. Ce processus est sous l'action de gènes exprimés dans le compartiment de la cellule mère dont celui qui code pour la protéine SpoVE ainsi que SpoVD (Higgins and Dworkin, 2012 ; Fay *et al.*, 2010).

Les protéines des tuniques sont produites dans la cellule mère après la formation du cortex et continuent jusqu'à la fin de la sporulation (McKenney *et al.*, 2013). Chez *B. subtilis*, l'expression des gènes dans la cellule mère est initiée par σ^E qui reste le principal régulateur spécifique de la cellule mère jusqu'à la fin de l'étape d'engloutissement de la préspore. Il

induit la transcription d'un grand nombre de régulateurs qui incluent des gènes ayant des rôles clés dans les étapes initiales de l'assemblage des tuniques (*spoVM*, *spoIVA*, *spoVID*, *safA*, *cotE* et *cotH*) (Henriques and Moran, 2007). Les protéines codées par ces gènes clés sont nommées protéines morphogéniques; elles jouent un rôle important dans la morphogénèse des tuniques (McKenney *et al.*, 2013).

L'assemblage des tuniques est un procédé complexe mais grâce à des méthodes telles que, l'immuno-gold et la GFP (Green Fluorescent Protein) largement utilisées pour la visualisation et la localisation des protéines subcellulaires, ces étapes ont pu être étudiées (Webb *et al.*, 1995). L'assemblage des tuniques dépend de la protéine de sporulation SpoIVA qui se situe à proximité ou à la surface de la membrane externe qui entoure la pré-spore. Elle marque donc l'extérieur de la pré-spore et est le site d'ancrage des autres protéines des tuniques (Figure 10).

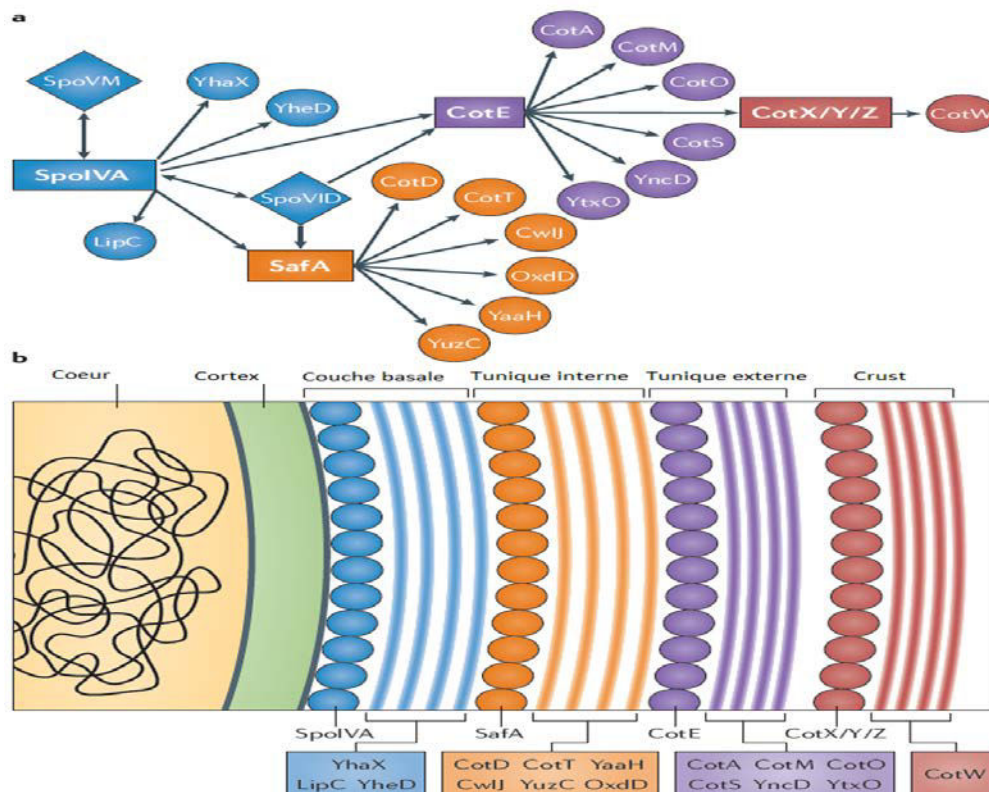


Figure 10 : Réseau d'interactions des protéines des tuniques chez *Bacillus subtilis*.

Ce réseau indique l'existence de 4 couches (couche basale en bleu, tunique interne en orange, tunique externe en violet et crust en rouge), chacune avec sa protéine morphogénique (*SpoIVA*, *SafA*, *CotE* et *CotX/Y/Z*, respectivement). Les protéines morphogéniques *SpoVM* et *SpoVID* nécessaires à l'ancrage des tuniques sont représentées en losanges bleus. Les directions des flèches indiquent les dépendances d'assemblage (Mc Kenney *et al.*, 2013).

Cette protéine, codée par le gène *spoIVA* sous le contrôle de σ^E est exprimée pendant les premières étapes de l'assemblage des tuniques (Driks *et al.*, 1994). La microscopie électronique des mutants *spoIVA* a montré que les protéines des tuniques étaient présentes, mais au lieu d'encercler la spore, elles restaient dans le cytoplasme de la cellule mère. Ces données montrent le rôle que prend la protéine SpoIVA dans la localisation des autres protéines des tuniques par la création d'une couche autour de la pré-spore sur laquelle l'ancrage des protéines des tuniques a lieu (Driks *et al.*, 1994; McKenney *et al.*, 2013).

Une deuxième protéine jouant un important rôle dans l'assemblage des tuniques est la protéine CotE. Cette dernière est à la fois une composante structurelle des tuniques mais aussi une protéine morphogénique nécessaire à la formation de la couche externe des tuniques ainsi qu'à l'attachement correct de l'exosporium à la spore (Driks *et al.*, 1994; Fazzini *et al.*, 2010). Elle est synthétisée avant toutes les autres protéines et forme un anneau autour de la pré-spore à un stade de la sporulation relativement précoce (Figure 10). D'autres protéines sont également importantes dans l'assemblage des tuniques comme la protéine SafA nécessaire à l'assemblage de la membrane interne ainsi que SpoVM et SpoIVD qui sont cruciales pour la formation d'une coquille complète englobant la spore (McKenney *et al.*, 2013) (Figure 10).

Chez *B. cereus*, après l'activation de σ^K , l'assemblage de l'exosporium est initié (Figure 11). La protéine ExsA sous le contrôle de σ^E (l'orthologue de SafA chez *B. subtilis*) favorise l'attachement des tuniques à l'exosporium de la spore en formation (Bailey-Smith *et al.*, 2005). Comme SafA, cette protéine contient un domaine LysM qui est en contact avec le peptidoglycane du cortex de la spore (Henriques and Morane, 2007). De plus, ExsA et SafA sont riches en résidus proline, donnant une conformation étendue. En aval de cette région, ces deux protéines possèdent un domaine C-terminal hautement chargé, dont la fonction n'a pas encore été déterminée. La conformation étendue de la région riche en résidus proline pourrait permettre à la région C-terminale d'atteindre l'exosporium (Bailey-Smith *et al.*, 2005). La microscopie électronique de spores d'un mutant *exsA* a montré la présence d'un exosporium partiellement attaché à la spore (Henriques and Moran, 2007) (Figure 11).

Une autre protéine intervient dans la formation de l'exosporium chez *B. cereus* et qui est sous le contrôle de σ^K . Il s'agit de la protéine ExsY (Boydston *et al.*, 2006). Un mutant *exsY* présentait un exosporium partiellement attaché. De plus, il manquait quelques protéines présentes habituellement au niveau de l'exosporium, telles que la protéine BclA qui était synthétisée mais qui n'a pas réussi à s'assembler (Todd *et al.*, 2003).

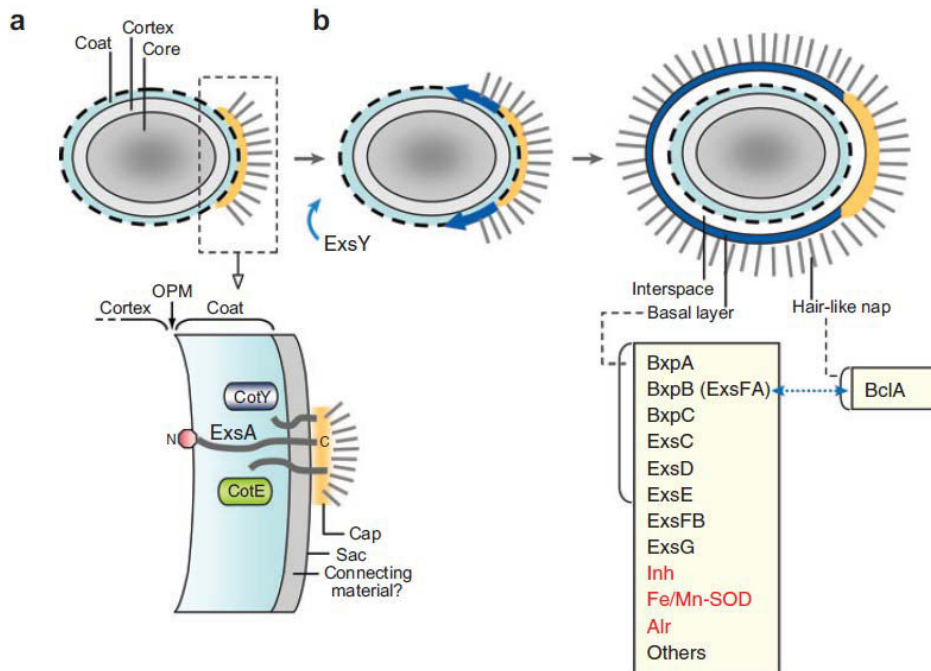


Figure 11 : Etapes d'assemblage de l'exosporium chez le groupe *B. cereus*.

Les enzymes sont indiqués en rouge (INH : inosine nucléoside hydrolase; SOD : superoxyde dismutase; Alr : alanine racémase). La double flèche représente la co-dépendance de la protéine BclA et de la protéine de la couche basale BxpB (ExsFA) pour un assemblage approprié (Henriques and Moran, 2007).

4. Etapes et mécanismes de la germination

4.1. Définition et étapes de la germination

Les spores peuvent rester des années dans un état de dormance attendant ainsi le retour des conditions environnementales favorables. Lorsque cela arrive, elles se reconvertissent en cellules végétatives capables de croître (Setlow, 2003). La germination est un processus essentiellement biophysique aboutissant à la perte des propriétés spécifiques des spores telles que leur structure unique, leur extrême résistance et leur dormance. Elle se produit sans nécessité de synthèse de nouvelles macromolécules car l'appareil de germination est déjà présent dans la spore mature en dormance (Moir, 2006).

La germination peut être divisée en deux grandes étapes :

- la première est appelée le déclenchement, elle est détectée dès les premières minutes après l'addition du germinant et consiste en la perte des résistances de la spore, la libération du DPA, la perte des cations ainsi que l'hydratation partielle du cœur de la spore.
- la seconde étape correspond à l'hydrolyse du cortex, à l'hydratation complète du cœur de la spore, à la chute de la densité optique (A_{600}) et à la perte des propriétés de dormance. L'étape qui suit la germination est la reprise de la croissance cellulaire qui se traduit par la reprise du métabolisme cellulaire, la dégradation des protéines de type SASP et la synthèse de macromolécules (Foster and Johnstone, 1990; Setlow, 2003) (Figure 12).

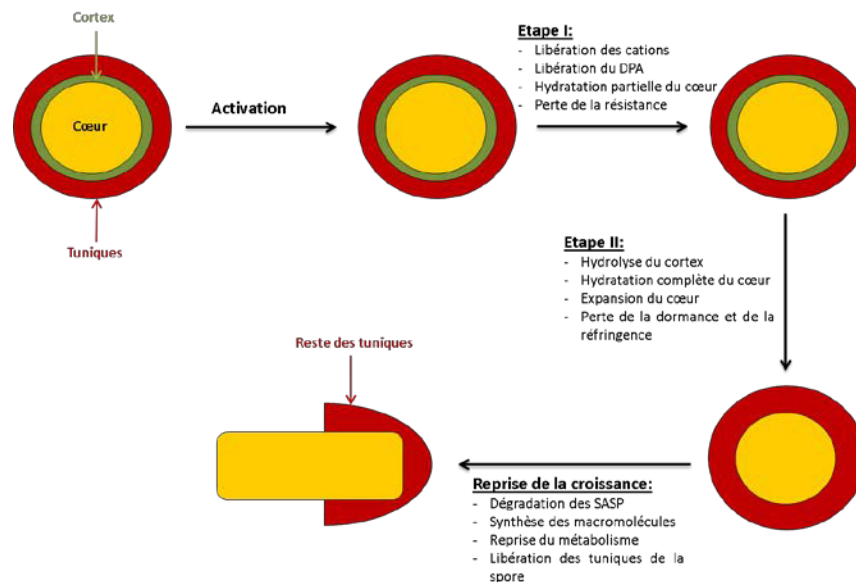


Figure 12 : Les étapes de la germination chez *B. subtilis*, d'après Setlow et al. (Setlow, 2003).

4.2. Les inducteurs de la germination

Les spores germent en présence d'inducteurs environnementaux qui peuvent être classés selon deux catégories : les inducteurs biologiques (nutritifs) et les inducteurs non biologiques (non-nutritifs).

Les inducteurs biologiques comprennent des molécules spécifiques appelées germinants. Les plus courants sont les acides aminés, les sucres et les ribosides mais il existe des combinaisons de substances nutritives qui provoquent également la germination telles que le

mélange asparagine, glucose, fructose et ions potassium : AGFK chez *B. subtilis* (Moir *et al.*, 1994; Moir, 2003; Setlow, 2003). La réponse des spores aux molécules germinantes diffère selon les espèces. Chez *Bacillus subtilis* par exemple, la germination se produit en réponse à un grand nombre d'acides aminés, cependant, la L-alanine reste tout de même l'acide aminé qui induit une meilleure réponse. Contrairement à *B. subtilis*, le mélange AGFK ne permet pas la germination des spores de *B. cereus* et des *Clostridium* (Alberto *et al.*, 2003; van der Voort *et al.*, 2010). La germination des spores de *Bacillus anthracis* est déclenchée par la L-alanine seule mais à forte concentration, tandis que l'inosine est seulement efficace en tant que co-germinant avec d'autres acides aminés (Ireland and Hanna, 2002). Pour *B. cereus* et *B. thuringiensis*, les germinants majeurs sont l'inosine et la L-alanine (Broussolle *et al.*, 2008). Pour les spores de *B. megaterium*, un des germinants majeurs est la L-proline (Foster and Johnstone, 1990). La réponse des spores aux molécules germinantes diffère également selon les souches d'une même espèce. Dans une étude menée sur quatre souches de *B. cereus*, il a été montré que chacune avait ses propres caractéristiques quant à sa réponse vis-à-vis des 20 acides aminés utilisés comme germinants. L'étude a montré une grande diversité dans l'activation de la germination par onze acides aminés, tandis que les neuf autres (Arg, Asn, Asp, Glu, His, Lys, Pro, Trp et Tyr) n'ont pas déclenché la germination (van der Voort *et al.*, 2010). L'induction de la germination par ces germinants fait appel à des récepteurs ; ce mécanisme sera détaillé ultérieurement.

La deuxième catégorie d'inducteurs est les inducteurs non biologiques. Ils incluent les agents chimiques, surfactant cationiques dodecylamine, les frottements, le mélange équimolaire de DPA et de CaCl_2 , le lysozyme et les hautes pressions. Le rôle de ces inducteurs dans la germination des spores dans l'environnement n'est pas clair car les spores sont normalement bien protégées contre le lysozyme par exemple, grâce à leur enveloppe protéique. Ceci bien que des spores avec des tuniques endommagées puissent être mises à germer par le lysozyme. Le procédé de hautes pressions est actuellement très étudié comme un procédé pour faire germer les spores dans les denrées alimentaires et faciliter ainsi leur inactivation tout en conservant les caractéristiques souhaitées de l'aliment (Paredes-Sabja *et al.*, 2011). Une autre méthode basée sur l'activation thermique où les spores subissent un choc thermique sublétal peut également déclencher la germination. Cette méthode permet une synchronisation de la germination après une diminution du temps de latence entre le moment de l'ajout du germinant et celui du début de la germination. Cette synchronisation pourrait impliquer que l'activation thermique facilite l'accès du germinant en provoquant un

changement de conformation du récepteur de germination, le rendant ainsi plus sensible (Leuschner and Lillford, 1999).

4.3. Récepteurs et gènes de la germination

La germination est initiée en réponse à l'interaction entre les germinants et leurs récepteurs situés au niveau de la membrane interne de la spore (Abee *et al.*, 2011). Le mécanisme exact de leur activation est mal connu mais des hypothèses ont été émises et admettent que ces récepteurs sont activés par leur interaction allostérique avec leurs germinants (Foster and Johnstone, 1990).

De récents travaux concernant les récepteurs de la germination et leurs germinants ont révélé des différences significatives entre les souches du groupe *B. cereus*. Par exemple, il a été conclu que le récepteur de germinants codé par l'opéron *gerR* était dominant chez la souche ATCC 14579 de *B. cereus*, alors qu'aucun rôle de dominance ne pourrait être identifié pour ce récepteur chez la souche 569 de *B. cereus* ou chez *B. anthracis* (Abee *et al.*, 2011).

Le génome de *B. subtilis* contient cinq opérons impliqués dans la germination (*gerA*, *gerB*, *gerK*, *yndDEF*, *yfkQRT*). Jusqu'à présent, seuls trois d'entre eux ont été montrés comme étant fonctionnels, à savoir *gerA* codant pour un récepteur activé par la L-alanine, *gerB* et *gerk* qui eux codent pour des récepteurs activables en présence du mélange AGFK (Abee *et al.*, 2011; Moir, 2006; Setlow, 2003). En revanche, chez *B. cereus*, sept opérons *ger* (*gerL*, *gerI*, *gerK*, *gerQ*, *gerG*, *gerS*, *gerR*) ont été identifiés et sont tous exprimés (de Vries *et al.*, 2004; Hornstra *et al.*, 2006). Les séquences des protéines correspondantes de *B. subtilis* ont été comparées à celles du groupe *B. cereus*. Les alignements ont montré une grande différence entre les séquences protéiques de ces récepteurs chez *B. subtilis* et le groupe *B. cereus* (Abee *et al.*, 2011).

Chez *B. subtilis*, le premier gène de la germination à avoir été décrit est le gène *gerA*. C'est un opéron tricistronique constitué de trois gènes à savoir : *gerAA*, *gerAB* et *gerAC* qui codent pour les trois sous-unités du récepteur de la L-alanine (Moir *et al.*, 2002; Setlow, 2003). La mutation du locus *gerA* donne des spores avec une déficience de germination vis-à-vis de la L-alanine mais pas vis-à-vis de la combinaison AGFK. De plus, les spores de bactéries mutées dans le gène *gerA* sont bloquées avant la perte de la résistance à la chaleur ou de la réfringence (Moir *et al.*, 1979). Comme les autres opérons *ger*, sa transcription se produit pendant les étapes de la sporulation, au niveau du compartiment de la préspore et sous le control de σ^G (Wang *et al.*, 2006). Les trois protéines (GerAA, GerAB, GerAC) codées par les

trois gènes de l'opéron *gerA* comportent des régions transmembranaires et sont toutes les trois nécessaires pour former un récepteur fonctionnel (van der Voort *et al.*, 2010) (Figure 13). La protéine GerAA prédite possède un domaine de cinq ou six régions transmembranaires ainsi qu'un large domaine N-terminal hydrophile ; la protéine GerAB ressemble à une protéine membranaire avec dix hélices transmembranaires ; la protéine GerAC est hydrophile et est supposée avoir une séquence signal de pré-lipoprotéine suggérant ainsi qu'elle est transportée à travers la membrane puis ancrée à la surface externe par l'intermédiaire d'un domaine N-terminal d'un fragment lipidique (Igarashi *et al.*, 2004; Moir *et al.*, 2002; Zuberi *et al.*, 1987). Des protéines similaires de type GerA sont également présentes chez d'autres espèces de *Bacillus* et de *Clostridium* (Moir *et al.*, 2002).

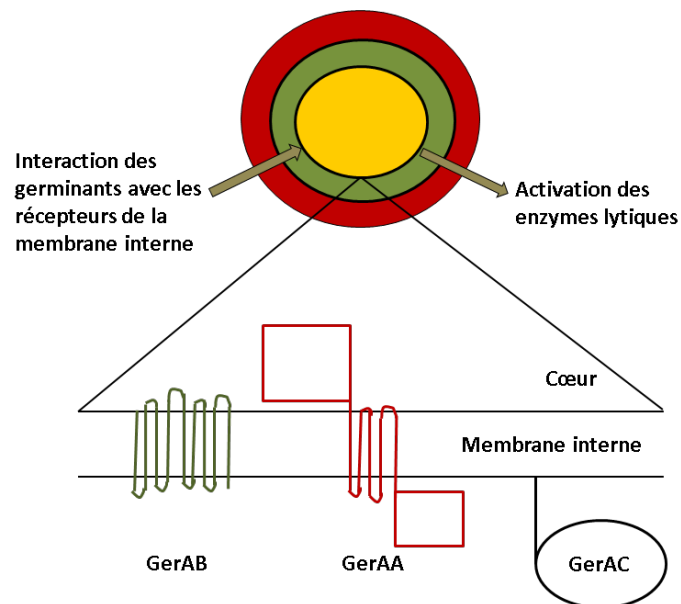


Figure 13 : Représentation schématique du récepteur de germinants GerA situés au niveau de la membrane interne des spores de *B. subtilis*, d'après Moir *et al.* (Moir *et al.*, 2002).

Comme cité précédemment, les opérons *gerB* et *gerK* de *B. subtilis* sont impliqués dans la réponse des spores de cette bactérie au mélange AGFK. Les mutants *gerB* et *gerK* présentent une réponse altérée au niveau de la voie AGFK mais pas au niveau de la voie de la L-alanine. Les opérons *gerB* et *gerK* codent chacun pour trois protéines homologues aux protéines de l'opéron *gerA*. elles sont nommées GerBA, GerBB et GerBC ainsi que GerKA, GerKB et GerKC, respectivement (Moir *et al.*, 1979).

Un opéron dont les produits (GerIA, GerIB, GerIC) sont homologues aux produits de l'opéron *gerA* existe chez *B. cereus*. Il s'agit de l'opéron *gerI* impliqué dans la germination

en réponse à l'inosine (Abee *et al.*, 2011). Une étude a montré que les mutants *gerI* de la souche 569 de *B. cereus* étaient incapables de germer en présence d'inosine et plus lentes à germer en présence de L-alanine (Barlass *et al.*, 2002).

Deux nouveaux opérons ont été décrits chez *B. cereus*, l'opéron *gerL* et l'opéron *gerQ* qui codent pour des sous-unités des récepteurs de la L-alanine et l'inosine, respectivement. L'étude menée par Barlass *et al.* (Barlass *et al.*, 2002) a montré que la germination à l'inosine chez *B. cereus* semblait utiliser les deux récepteurs *gerI* et *gerQ* mais que le rôle respectif de chacun était mal connu. Un autre appelé *gerN*, a été isolé puis décrit comme gène important pour la germination chez la souche 569 de *B. cereus*. Il s'agit d'un gène monocistronique homologue aux gènes *grmA* de *B. megaterium* et *napA* d'*Enterococcus hirae* dont le pourcentage d'identité de la séquence protéique est de 58 et 43 %, respectivement. L'inactivation de ce gène n'affecte pas la croissance végétative ni la sporulation. Le mutant *gerN* germe trente fois plus lentement à 5 mM en inosine par rapport à la spore sauvage, cependant, aucune différence n'est observée entre ces deux types de cellules pour la germination en présence de 10 mM d'alanine. Donc le gène *gerN* serait important pour la germination à l'inosine mais ne serait pas nécessaire pour la germination à la L-alanine (Thackray *et al.*, 2001).

4.4. Les canaux ioniques/DPA

Juste au début de la germination, la fluidité membranaire des spores augmente (Cowan *et al.*, 2004). Les cations, tel que H^+ , K^+ et Na^+ sont libérés du cœur de la spore. Ceci est suivi par la libération d'ion Ca^{2+} avec l'acide dipicolinique eux aussi présent dans le cœur de la spore. Il existe peu d'informations sur les canaux transporteurs d'ions mais certains peuvent être des protéines fonctionnelles dans la membrane des cellules végétatives et des spores alors que d'autres sont spécifiques des spores (Moir, 2006). Par exemple, la protéine SpoVA décrite comme impliquée dans l'absorption du DPA durant la sporulation (Vepachedu and Setlow, 2004) est également impliquée dans la libération du DPA pendant la germination (Vepachedu and Setlow, 2007). La protéine antiport Na^+/H^+K^+ , GerN est impliquée dans la germination en réponse à l'inosine chez *B. cereus* (Southworth *et al.*, 2001; Thackray *et al.*, 2001).

4.5. Les enzymes lytiques du cortex et leur activation

Le cœur de la spore est entouré d'une mince couche de peptidoglycane similaire à celui des cellules végétatives et appelée paroi. Cette dernière est à son tour entourée par une couche de peptidoglycane beaucoup plus épaisse et chimiquement distincte qu'on appelle cortex (Atrih and Foster, 1999). Durant les étapes de la germination, le cortex est dégradé. Il s'agit d'un processus complexe et important, se produisant pendant la phase tardive de la germination. Chez *B. subtilis*, deux enzymes, CwlJ et SleB, jouent un rôle très important dans la dégradation du peptidoglycane du cortex pendant la germination (Boland *et al.*, 2000; Makino and Moriyama, 2002; Setlow *et al.*, 2001). CwlJ est synthétisée dans le compartiment de la cellule-mère au cours de la sporulation, et est située au niveau des couches extérieures de la spore, alors que SleB est synthétisée dans le compartiment de la préspore, sous le contrôle du facteur σ^G et est ciblée à la fois au niveau du cortex ou la limite des tuniques et le cortex. Cependant, une quantité importante de SleB est également retrouvée au niveau de la membrane interne de la spore mais également au niveau des tuniques (Moir, 2006) (Figure 14).

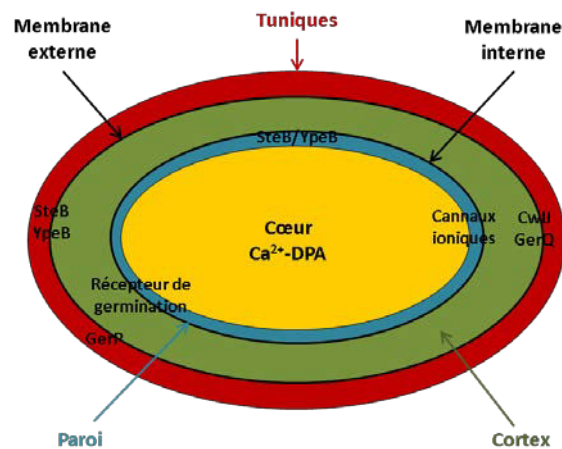


Figure 14 : Localisation des éléments constitutifs de l'appareil de germination des spores, d'après Setlow (Setlow, 2003).

Les deux enzymes ont besoin chacune d'une seconde protéine pour leur localisation dans la spore dormante. YpeB est nécessaire pour l'insertion de SleB dans la spore (Boland *et al.*, 2000). La protéine des tuniques YwdL (GerQ), dont l'assemblage est sous la dépendance des protéines morphogéniques des tuniques CotE et SpoIVA, est nécessaire pour la localisation de CwlJ (Ragkousi *et al.*, 2003). L'enzyme SleB de *B. subtilis* est une muramidase de type

transglycosylase (Atrih and Foster, 2001). Même si la fonction enzymatique exacte de CwlJ n'est pas connue, elle serait nécessaire pour la germination induite par Ca-DPA exogène (Paidhungat *et al.*, 2001). Le gène *sleB* de *B. subtilis* est conservé chez d'autres espèces telles que : *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. halodurans* et *B. megaterium* (Makino and Moriyama, 2002).

Les deux enzymes SleB et CwlJ sont présentes sous forme mature dans les spores, cependant, elles ne sont actives qu'une fois la germination est initiée. Il doit donc exister un mécanisme pour tenir ces enzymes inactives dans la spore dormante. Pour la protéine SleB, ce mécanisme n'est pas clair, mais il se peut que cette enzyme ne fonctionne que sur un cortex où le peptidoglycane a un niveau de stress bien plus élevé que celui dans les spores dormantes (Foster and Johnstone, 1987; Makino *et al.*, 1994). L'inactivité de CwlJ dans les spores dormantes puis son activation après la phase I de la germination est probablement dû à la présence de DPA-Ca²⁺ car l'activation de CwlJ nécessite du DPA-Ca²⁺ libéré par la spore ou utilisé comme germinant (Paidhungat *et al.*, 2001).

Comme cité précédemment, les deux enzymes CwlJ et SleB sont essentielles pour la dégradation du cortex au cours de la germination. D'autres enzymes peuvent également être impliquées dans ce processus, mais elles ne sont pas essentielles comme SleL de *B. cereus* et SleC de *C. perfringens* (Chen *et al.*, 2000; Chirakkal *et al.*, 2002). La première est localisée à l'extérieur du cortex et est codée par le gène *yaaH* (Chen *et al.*, 2000) quant à la seconde, son activation se fait par protéolyse durant les premières minutes de la germination (Paredes-Sabja *et al.*, 2009).

4.6. Les protéines des tuniques et la germination

Les mutations des gènes des tuniques peuvent conduire à des spores ayant des défauts dans leur germination. Le premier reconnu était le mutant *gerE36* qui avait un défaut dans la régulation de l'expression d'un certain nombre de gènes exprimés dans le compartiment de la cellule mère, y compris les protéines des tuniques (Driks, 1999; Moir, 1981). Certains mutants avec des tuniques altérées n'étaient en mesure de compléter les dernières étapes de leur germination, tels que le mutant *cotE* (Behravan *et al.*, 2000).

Un nouveau locus du gène *gerP* impliqué dans la germination qui met l'accent sur la perméabilité des tuniques a été décrit chez *B. cereus* et *B. subtilis* (Behravan *et al.*, 2000). L'opéron *gerP* comprend six gènes, exprimés pendant la sporulation dans le compartiment de la cellule mère en même temps que la synthèse du manteau de la spore. L'expression de *gerP* est sous le contrôle de σ^K et est négativement régulé par *gerE*. Les protéines GerP pourraient

être des composants structurels de la spore et contribueraient à faciliter le transfert des molécules germinantes à travers les tuniques (Behravan *et al.*, 2000; Moir *et al.*, 2002).

5. Effet des conditions de sporulation sur les propriétés des spores

La sporulation peut avoir lieu dans des environnements variés présentant différentes températures et différentes conditions de nutriments. Ces différentes conditions affectent les diverses propriétés des spores telles que la résistances aux nombreux facteurs de stress ainsi que la structure et la composition des spores (Cazemier *et al.*, 2001; Margulis *et al.*, 1998; Melly, Genest, *et al.*, 2002; Nguyen Thi Minh *et al.*, 2008; Nicholson, 2002; Rose *et al.*, 2007; van der Voort and Abee, 2013; van der Voort *et al.*, 2010). Chez *B. subtilis* et *B. cereus*, l'effet de la température et des conditions de nutriments sur la résistance des spores à la chaleur, aux UV et aux produits chimiques ainsi que sur la germination a été largement étudié (Faille *et al.*, 2007; Gounina-Allouane *et al.*, 2008; Melly, Genest, *et al.*, 2002; Planchon *et al.*, 2011). Cependant, peu d'études sur l'effet de l'anaérobiose sur la sporulation du groupe *B. cereus* ont été publiées à l'exception de l'effet de l'oxygène sur la capacité de sporulation de *B. thuringiensis*, mais les propriétés des spores n'ont pas été abordées (Avignonerossa *et al.*, 1992; Boniolo *et al.*, 2012; Finlay *et al.*, 2002). L'effet des différentes conditions de sporulation sur la capacité de sporulation et les propriétés des spores de *Bacillus* est présenté dans le Tableau 2.

5.1. Effet de la température

De nombreuses études ont montré que la température de croissance avait un effet sur le rendement de sporulation. Chez *B. sphaericus* (Depieri and Ludlow, 1992) et *B. anthracis* (Baweja *et al.*, 2008), le rendement de sporulation était plus fort lorsque les bactéries étaient cultivées à des températures proches des températures optimales de croissance.

La température de sporulation peut également avoir un effet sur les constituants de la spore tels que l'exosporium, le cortex et la membrane interne. Des travaux menés sur des spores de *B. cereus* ont montré que la fréquence d'exosporiums endommagés augmentait avec la hausse de la température de sporulation (Faille *et al.*, 2007). De nettes différences dans la composition des protéines des tuniques ont été mises en évidence pour des spores de *B. subtilis* produites à différentes températures (de 22 °C à 48 °C). En effet, la quantité de la protéine CotA diminue de manière significative avec l'augmentation de la température (Melly

et al., 2002). Dans cette même étude, le peptidoglycane du cortex des spores préparées à différentes températures a montré une différence de structure avec une augmentation de l'acide muramique avec réticulation dans le cortex des spores produites à des températures plus élevées (Melly *et al.*, 2002).

La perméabilité des spores de *B. subtilis* à la méthylamine augmente avec la diminution de la température de sporulation. De plus, la composition en acides gras de la membrane interne des spores produites à différentes températures diffère de manière significative. La quantité d'acides gras insaturés ainsi que le rapport d'acides gras antéiso/iso diminue avec l'augmentation de la température (Cortezzo and Setlow, 2005). Chez *B. cereus*, la composition de certains acides gras varie de manière significative entre les spores produites à 10 °C et celles produites à 30 °C. Les quantités d'acides gras antéiso ont augmenté avec la diminution de la température. Cependant, la quantité de la plupart des acides gras iso varie indépendamment de la température de la sporulation excepté pour l'acide gras i15 qui a sa quantité fortement augmentée avec l'augmentation de la température (Planchon *et al.*, 2011).

La composition en eau et en DPA peut également être affectée par la température de sporulation. Dans une étude menée par Melly *et al.* (Melly *et al.*, 2002), il a été montré que chez *B. subtilis*, l'augmentation de la température conduisait à une diminution de la teneur en eau du cœur de la spore. La teneur du DPA dans les spores de *B. cereus* et de *B. anthracis* augmente avec la hausse de la température (Baweja *et al.*, 2008; Planchon *et al.*, 2011). Chez *B. subtilis*, en revanche, les spores préparées à des températures allant de 22 à 48 °C ont des quantités d'acide dipicolinique identiques (Melly *et al.*, 2002).

L'effet de la température sur la résistance des spores de plusieurs souches de *Bacillus* à la chaleur a fait l'objet de nombreux travaux (Baweja *et al.*, 2008; Carlin, 2011; Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011; Planchon *et al.*, 2011). Ces travaux ont montré que les spores produites à hautes températures étaient plus résistantes aux traitements par la chaleur humide que celles produites à basses températures. Chez *B. subtilis*, les études montrent que l'augmentation de la température de sporulation dans une gamme comprenant trois températures différentes (30 °C, 37 °C et 44 °C) augmente la résistance des spores à la chaleur humide (Igura *et al.*, 2003). Les mêmes observations ont été faites chez *B. anthracis* et *B. weihenstephanensis* où l'augmentation de la température de sporulation entraînait une augmentation de la résistance des spores à la chaleur humide (Baril *et al.*, 2011; Baweja *et al.*, 2008; Planchon *et al.*, 2011). Chez *B. cereus*, des études ont également montré que les spores étaient plus sensibles à la chaleur humide lorsqu'elles étaient produites à basses températures (Gonzalez *et al.*, 1999;

Gounina-Allouane *et al.*, 2008). Au final, de nombreux auteurs ont conclu que la résistance à la chaleur humide des spores bactériennes était corrélée avec la température de sporulation.

L'effet de la température de sporulation sur la résistance des spores aux agents chimiques a été étudié, d'abord chez la bactérie modèle *B. subtilis* mais aussi chez d'autres espèces du genre *Bacillus*. Que ce soit chez *B. subtilis*, *B. anthracis* ou *B. cereus*, les spores produites à des températures élevées sont plus résistantes aux agents chimiques, tels que le peroxyde d'hydrogène, le glutaraldehyde, l'hydroxyde de sodium et l'acide chlorhydrique que celles produites à des températures plus basses (Baweja *et al.*, 2008; Melly *et al.*, 2002; Planchon *et al.*, 2011). Chez *B. cereus*, Planchon *et al.* (Planchon *et al.*, 2011) ont montré que les spores produites à 30 °C et à 10 °C présentaient des résistances identiques au formaldéhyde, à l'acide nitreux et au calcium hypochlorite.

De nombreuses études ont montré que la température de sporulation affectait la capacité de germination des spores. Chez *B. subtilis*, une étude a montré que les spores produites à basses températures avaient une meilleure efficacité de germination que celles produites à hautes températures (Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011). Une autre étude faite sur *B. anthracis* a montré que les spores produites à hautes températures germaient plus rapidement et plus efficacement que celles produites à basses températures (Baweja *et al.*, 2008). Chez *B. cereus*, des études ont montré que les spores présentaient une forte capacité de germination lorsqu'elles étaient produites à basses températures (Gounina-Allouane *et al.*, 2008 ; Planchon *et al.*, 2011).

5.2. Effet du milieu : nutriments et minéraux

La composition du milieu en nutriments et en sels minéraux affecte la capacité de sporulation, la composition ainsi que les propriétés des spores.

Une combinaison de peptone, glucose et extrait de levure dans le milieu contribuerait à l'augmentation de la production de spores de *Bacillus stearothermophilus* (Penna *et al.*, 2003). Une autre étude menée par Nguyen Thi Minh *et al.* (Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011) a montré qu'une carence en calcium stoppait la production des spores de *B. subtilis*.

De nombreuses études ont prouvé l'importance de la composition du milieu sur la taille et l'ultrastructure des spores bactériennes. Dans une étude menée par Van der Voort *et al.* (van der Voort and Abee, 2013) sur des souches émétiques de *B. cereus*, il a été montré que les spores formées sur des milieux gélosés avaient une taille plus importante que celles produites en milieux liquides. De plus, les spores produites sur des biofilms étaient les plus grandes en taille. Une autre étude a montré que les spores de *B. subtilis* produites dans un milieu carencé

en calcium avaient des tailles plus petites que celles produites dans un milieu standard (Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011).

Le peptidoglycane des spores préparées en bouillon nutritif (BN) présente une réduction du pourcentage d'acide muramique avec des substitutions de L-alanine (13.9 %) comparé au peptidoglycane des spores produites dans le milieu de sporulation CCY (20.6 % de L-alanine). L'addition de $MnCl_2$ au milieu BN a conduit à la production de spores de *B. subtilis* avec un peptidoglycane similaire aux spores produites sur le milieu CCY. De plus, cette addition de $MnCl_2$ a conduit à une augmentation du contenu de Mn^{2+} dans les spores (de 0.07 à 6.03 $\mu g\ mg^{-1}$).

La composition chimique des spores peut également être affectée par la composition du milieu de sporulation. de Vries et ses collaborateurs (de Vries *et al.*, 2005) ont montré que les spores de la souche ATCC 14579 de *B. cereus* avaient une faible teneur en eau lorsqu'elles étaient cultivées dans un milieu avec une faible concentration en glutamate.

Les minéraux jouent également un rôle important dans la résistance des spores à la chaleur humide. Dans une étude menée par Cazemier *et al.* (Cazemier *et al.*, 2001), il a été montré que l'ajout de cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} et K^+) dans le milieu était suivi par une augmentation de la résistance des spores de *Bacillus* à la chaleur humide. Chez *B. subtilis*, la déminéralisation des spores entraîne une augmentation de leur sensibilité à la chaleur humide alors que leur re-minéralisation entraîne une augmentation de leur thermorésistance (Igura *et al.*, 2003). Dans un milieu dépourvu de calcium, les spores de *B. subtilis* sont beaucoup plus thermosensibles que celles produites dans un milieu contenant du calcium (Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011).

La présence de nutriments dans le milieu de sporulation influence la capacité de germination des spores de *Bacillus*. Les spores de *B. cereus* produites dans un milieu pauvre en nutriments présentent une altération dans leur germination par rapport aux spores produites dans un milieu riche en nutriments. Ces dernières demandent une concentration en germinants dix fois plus élevée pour donner un taux de germination similaire à celui des spores produites en milieu riche en nutriment (Hornstra *et al.*, 2006). Les spores de *B. cereus* ATCC 14579 germent d'autant mieux dans le milieu YLHG que la concentration en glutamate est élevée (de Vries *et al.*, 2005). Une grande différence a été observée dans la capacité de germination de spores provenant de huit souches émétiques de *B. cereus* et produites dans différentes conditions de sporulation (van der Voort and Abee, 2013). Les spores ont germé efficacement sur gélose à base de lait ainsi que dans un bouillon de viande que sur gélose à base de riz.

5.3. Effet du pH

Le pH de sporulation peut affecter la thermorésistance des spores. La thermorésistance des spores de *B. subtilis* était plus faible à pH 6 qu'à pH 10 (Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011). Chez *B. cereus*, l'augmentation du pH du milieu de sporulation entraînerait une augmentation dans la résistance à la chaleur humide des spores (Mazas *et al.*, 1997). En revanche, chez *B. anthracis*, les spores sont plus thermorésistantes lorsqu'elles sont produites à des pH plus acides (Baweja *et al.*, 2008).

Le pH de sporulation peut également influencer la résistance des spores de *B. anthracis* à l'hydroxyde de sodium et au peroxyde d'hydrogène (Baweja *et al.*, 2008). Dans cette étude, les spores produites à pH acide étaient plus sensibles à ces deux agents chimiques que celles produites à pH alcalin.

Le pH ne semble pas affecter la teneur du DPA des spores de *B. subtilis* (Melly *et al.*, 2002).

5.4. Effet de l'atmosphère

La quantité d'oxygène présente dans le milieu de sporulation est un paramètre important dans le rendement de sporulation. Dans le genre *Bacillus*, la sporulation serait étroitement liée à l'apport en oxygène (Avignonerossa *et al.*, 1992). De récentes expériences ont indiqué que dans un milieu pauvre en oxygène, la production de spores de *B. thuringiensis* était plus faible que dans un milieu aérobie (Avignonerossa *et al.*, 1992; Finlay *et al.*, 2002; Foda *et al.*, 1985). De même Boniolo et ses collaborateurs (Boniolo *et al.*, 2012) ont montré que l'interruption soudaine de l'oxygène à la fin de la phase exponentielle de croissance conduisait à une faible production de spores chez *B. thuringiensis var israelensis* (IP-82). Une autre étude a établi que la mise en œuvre d'une période de non-aération après une période d'oxygénation modérée au cours de la phase de sporulation donnait lieu à un fort rendement de sporulation de *B. thuringiensis* H14. Ces données montrent qu'une fois le processus de sporulation déclenché, il se poursuit jusqu'à la fin, même si l'apport en oxygène est interrompu (Sarrafzadeh and Navarro, 2006). Dans un travail mené par Couchot et Maier en 1974, 11 espèces anaérobies facultatives du genre *Bacillus* ont été testées quant à leur capacité à sporuler en anaérobiose. Les résultats montrent que seules les deux espèces, *B. macerans* (ATCC 8244) et *B. polymyxa* (ATCC 12056), étaient capables de sporuler en l'absence d'oxygène. *B. cereus* (ATCC 12480) n'a pas produit de spores dans cette étude (Couchot and Maier, 1974).

Tableau 2 : Effet des différentes conditions de sporulation sur la capacité de sporulation et les propriétés des spores de *Bacillus*.

Facteurs affectants la sporulation	Espèces	Propriétés de spores induites	Références
Température	<i>B. sphaericus</i> <i>B. anthracis</i>	-Fort rendement de sporulation lorsque les bactéries sont cultivées à des températures proches des températures optimales de croissance	(Depieri and Ludlow, 1992) (Baweja <i>et al.</i> , 2008)
	<i>B. cereus</i>	-La fréquence d'exosporiums endommagés augmentait avec la hausse de la température de sporulation	(Faille <i>et al.</i> , 2007)
	<i>B. subtilis</i>	-La quantité de la protéine CotA diminue de manière significative avec l'augmentation de la température	(Melly <i>et al.</i> , 2002)
	<i>B. subtilis</i>	-La quantité d'acides gras insaturés ainsi que le rapport d'acides gras antéiso/iso diminue avec l'augmentation de la température	(Cortezzo and Setlow, 2005)
	<i>B. cereus</i>	-Les quantités d'acides gras antéiso ont augmenté avec la diminution de la température	(Planchon <i>et al.</i> , 2011)
	<i>B. subtilis</i>	-L'augmentation de la température conduit à une diminution de la teneur en eau du cœur de la spore	(Melly <i>et al.</i> , 2002)
	<i>B. cereus</i> <i>B. anthracis</i>	-La teneur du DPA augmente avec la hausse de la température	(Planchon <i>et al.</i> , 2011) (Baweja <i>et al.</i> , 2008)
	<i>B. subtilis</i>	-Les spores préparées à des températures allant de 22 à 48 °C ont des quantités d'acide dipicolinique identiques	(Melly <i>et al.</i> , 2002)

Facteurs affectants la sporulation	Espèces	Propriétés de spores induites	Références
Température	<i>B.anthraxis</i> <i>B. cereus</i> <i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. subtilis</i>	-Les spores produites à hautes températures sont plus résistantes aux traitements par la chaleur humide que celles produites à basses températures	(Baweja <i>et al.</i> , 2008) (Gounina-Allouane <i>et al.</i> , 2008) (Planchon <i>et al.</i> , 2011) (Igura <i>et al.</i> , 2003)
	<i>B. anthracis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i>	-Les spores produites à des températures élevées sont plus résistantes aux peroxyde d'hydrogène, glutaraldehyde, hydroxyde de sodium et acide chlorhydrique que celles produites à des températures plus basses	(Baweja <i>et al.</i> , 2008) (Melly <i>et al.</i> , 2002) (Planchon <i>et al.</i> , 2011)
	<i>B. subtilis</i>	-Les spores produites à basses températures avaient une meilleure efficacité de germination que celles produites à hautes températures	(Nguyen Thi Minh <i>et al.</i> , 2011)
	<i>B. anthracis</i>	-Les spores produites à hautes températures germaient plus rapidement et plus efficacement que celles produites à basses températures	(Baweja <i>et al.</i> , 2008)
	<i>B. cereus</i>	-Les spores présentait une forte capacité de germination lorsqu'elles étaient produites à basses températures	(Gounina-Allouane <i>et al.</i> , 2008) (Planchon <i>et al.</i> , 2011)
Composition du milieu en nutriments et en sels minéraux	<i>B. stearothermophilus</i>	- Augmentation de la production de spores en présence d'extrait de levure, de peptones et de glucose	(Penna <i>et al.</i> , 2003)
	<i>B. subtilis</i>	-Arrêt de la production de spores, sensibilité à la chaleur et diminution de la taille des spores produites dans un milieu dépourvu de calcium	(Nguyen Thi Minh <i>et al.</i> , 2011)

Facteurs affectants la sporulation	Espèces	Propriétés de spores induites	Références
Composition du milieu en nutriments et en sels minéraux	<i>B. cereus</i>	-Modification de la taille des spores en fonction de la composition du milieu de sporulation	(van der Voort and Abee, 2013)
	<i>B. cereus</i>	-Faible teneur en eau des spores produites dans un milieu avec une faible concentration en glutamate	(de Vries <i>et al.</i> , 2005)
	<i>B. subtilis</i> <i>B. coagulans</i> <i>B. licheniformis</i>	-L'ajout de cations (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Fe ²⁺ et K ⁺) dans le milieu était suivi par une augmentation de la résistance des spores de à la chaleur humide	(Cazemier <i>et al.</i> , 2001)
	<i>B. subtilis</i>	-La déminéralisation des spores entraîne une augmentation de leur sensibilité à la chaleur humide alors que leur re-minéralisation entraîne une augmentation de leur thermorésistance	(Igura <i>et al.</i> , 2003)
	<i>B. cereus</i>	-Les spores de produites dans un milieu pauvre en nutriments présentent une altération dans leur germination par rapport aux spores produites dans un milieu riche en nutriments	(Hornstra <i>et al.</i> , 2006)
pH	<i>B. cereus</i>	-Pas de différence significative au niveau de la teneur en DPA	(van der Voort and Abee, 2013)
	<i>B. subtilis</i>	-La thermorésistance des spores était plus faible à pH=6 qu'à pH=10	(Nguyen Thi Minh <i>et al.</i> , 2011)
	<i>B. anthracis</i>	-Les spores sont plus thermorésistantes lorsqu'elles sont produites à des pH plus acides	(Baweja <i>et al.</i> , 2008)

Facteurs affectants la sporulation	Espèces	Propriétés de spores induites	Références
pH	<i>B. cereus</i>	-L'augmentation du pH du milieu de sporulation entraîne une augmentation dans la résistance à la chaleur humide des spores	(Mazas <i>et al.</i> , 1997)
	<i>B. anthracis</i>	-Le pH de sporulation peut également influencer la résistance des spores à l'hydroxyde de sodium, à l'acide chlorhydrique et au peroxyde d'hydrogène	(Baweja <i>et al.</i> , 2008)
Oxygène	<i>B. thuringiensis</i>	-Diminution de la production de spores avec la diminution de la quantité d'oxygène	(Avignonerossa <i>et al.</i> , 1992) (Finlay <i>et al.</i> , 2002) (Foda <i>et al.</i> , 1985)
	<i>B. polymyxa</i> <i>B. cereus</i> <i>B. macerans</i> <i>B. alvei</i> <i>B. coagulans</i> <i>B. pasteurii</i> <i>B. circulans</i> <i>B. pulvifaciens</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. pantothenicus</i> <i>B. stearothermophilus</i>	-Seules, <i>B. macerans</i> et <i>B. polymyxa</i> , étaient capables de sporuler en l'absence d'oxygène. <i>B. cereus</i> n'a pas produit de spores	(Couchot and Maier, 1974)

MATERIEL ET METHODES

1. Les souches de *Bacillus cereus*

Le choix des souches s'est effectué selon leurs appartenances aux groupes phylogénétiques, leurs origines ainsi que sur la base de connaissances de leurs paramètres de croissance. Un total de 18 souches appartenant aux groupes II, III, IV, V, VI et VII de *B. cereus* ont été sélectionnées. Ces souches ont été conservées à -20 °C dans une solution de glycérol à 30 %. La liste des souches ainsi que leurs principales caractéristiques sont répertoriées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : Liste des souches de *B. cereus* utilisées

Souches de <i>B. cereus</i>	Origines	Températures limites de croissance (°C)	Groupes phylogénétiques
NVH 0861-00	Souche diarrhéique	7-40	II
Bc 05-F1	Sol		II
INRA 15	Aliment		II
F4810/72	Souche émétique	15-45	III-5
DSMZ 4222	Infection de prostate		III-8
F4433/73	Souche diarrhéique		III-12
F4430/73	Souche diarrhéique	10-40/45	IV-3
ATCC14579	Souche type		IV3
NVH1230	/		IV
F2769/77	Souche diarrhéique	10-40	V
NVH 141/1-01	Souche diarrhéique		V
UHDAM TSP9	Environnement		V
INRA KBAB4	Environnement	5/7-37	VI-1
SDA NFFE 664	Environnement		VI-2
WSBC 10204T	Souche type de <i>B. weihens.</i>		VI-1
NVH883/00	Souche diarrhéique	20-50	VII
AFSSA 08CEB44bac	Souche diarrhéique		VII
NVH 391-98	Souche diarrhéique		VII

2. Les milieux de croissance et de sporulation

2.1. Le milieu MODS

La croissance et la sporulation des souches de *B. cereus* ont été réalisées en milieu chimiquement défini MODS. Ce milieu a été optimisé à partir du milieu MOD précédemment décrit par Glatz et Goepfert (Glatz and Goepfert, 1977), et complété avec du K_2HPO_4 (5.74 mM), $(NH_4)_2SO_4$ (45.4 mM), $MgSO_4$ (0.16 mM) (Duport *et al.*, 2004). Le milieu MOD a été dilué au quart et complété avec du $MgCl_2$ (0.5 mM), $MnCl_2$ (0.01 mM), $ZnCl_2$ (0.05 mM) et du $CaCl_2$ (0.2 mM). Le milieu MODS a été ajusté à pH 7.2 avec du KOH (2 M) avant stérilisation et après stérilisation si nécessaire. Le milieu autoclavé a été supplémenté en

glucose (10 mM). Pour la croissance des souches du groupe VII, auxotrophes pour le tryptophane, cet acide aminé (4.8 mM) a été rajouté au milieu.

Pour les expériences en cultures non contrôlées, le milieu MODS a été tamponné avec du tampon phosphate à 2 M, pH 7.2 pour atteindre une concentration finale de 0.1 M dans le milieu.

2.2. Le milieu LB

Le milieu Luria Bertani (LB) a été utilisé pour le dénombrement des cellules et des spores de *Bacillus cereus*. Ce milieu est prêt à l'emploi et contient 10 g l⁻¹ de pastone, 5 g l⁻¹ d'extrait de levure ainsi que 10 g l⁻¹ de NaCl.

2.3. Le milieu CCY

Le milieu Casein Casein Yeast (CCY) (Stewart *et al.*, 1981) a été utilisé comme référence pour la production de spores des 18 souches de *B. cereus*. Ce milieu contient 0.5 mM de MgCl₂, 6H₂O ; 0.01 mM de MnCl₂, 4H₂O ; 0.05 mM de FeCl₃, 6H₂O ; 0.05 mM de Zn Cl₂ ; 13 mM de KH₂PO₄ ; 26 mM de K₂HPO₄ ; 20 mg l⁻¹ de glutamine ; 1 g l⁻¹ d'hydrolysate acide de caséine ; 0.4 g l⁻¹ d'extrait de levure ; 1 g l⁻¹ de peptone et 0.6 g l⁻¹ de glycérol. Le pH a été ajusté à 7 avec du KOH (2 M).

2.4. Le milieu SMB

Le milieu Sporulation Mineral Buffer (SMB) a été utilisé pour les cultures biphasiques de *B. cereus*. Il s'agit d'un tampon minéral composé de 39 mM de tampon phosphate à pH 7.2 (K₂HPO₄, 3H₂O : 4.5 g l⁻¹ ; KH₂PO₄ : 1.8 g l⁻¹), additionné de CaCl₂, 2H₂O (8 mg l⁻¹) et de MnSO₄, H₂O (1.5 mg l⁻¹).

3. Culture des souches

3.1. Culture en conditions contrôlées

Les cultures régulées ont été réalisées pour l'étude de la croissance, la sporulation et les propriétés des spores de la souche AH 187 (F4810/72) appartenant au groupe phylogénétique III. Un bioréacteur d'une capacité de 2 L (Inceltech Discovery 100, Toulouse, France), contenant 1.3 L de MODS a été utilisé. Il est équipé d'une résistance afin de maintenir la

température à 37 °C tout au long de la culture ; d'une sonde polarographique à oxygène afin de contrôler l'aérobiose (obtenu par un flux d'air) et l'anaérobiose (obtenu par un flux d'azote). Pour l'aérobiose, l'agitation a été réglée pour maintenir la pression partielle en oxygène (pO₂) au-dessus de 60 %. Le pH a été régulé à 7.2 par addition de KOH (2 M).

Trois expériences indépendantes ont été réalisées pour chaque condition.

3.2. Culture en conditions non contrôlées

Les cultures en conditions non contrôlées ont été réalisées pour les 18 souches de *B. cereus*.

Pour les expériences anaérobies, les cultures ont été réalisées dans des tubes de Hungate avec des septums en butyle contenant 12 ml de milieu MODS. Afin d'éliminer toute trace d'oxygène, le milieu a été chauffé sous un flux d'azote envoyé à travers une colonne Hungate.

Les cultures aérobies ont été réalisées en fioles d'Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu MODS.

Après stérilisation à l'autoclave, du tampon phosphate et du glucose ont été rajoutés au milieu à l'aide de micropipette pour les fioles erlenmeyer ou à l'aide de seringues pour les tubes de Hungate afin d'éviter toute contamination à l'oxygène. Les cultures ont été incubées dans l'incubateur (MaxQ400, Thermo Scientific) sous agitation (200 tours/minute). Les cultures des souches de *B. cereus* ont été réalisées à 30 °C pour les souches des groupes phylogéniques II, V, VI et à 37 °C pour les souches des groupes phylogéniques III, IV, VII. Trois répliques biologiques ont été réalisés pour chaque condition.

3.3. Culture biphasique

Cette approche consiste à séparer l'étape de croissance de celle de la sporulation (Baril *et al.*, 2011). Afin de permettre une bonne production de biomasse, les cellules ont été cultivées en condition d'aérobiose, dans le milieu LB à 30 °C pour les souches appartenant aux groupes phylogénétiques II, V et VI, et à 37 °C pour les souches appartenant aux groupes phylogénétiques III, IV et VII. Au début de la phase stationnaire de croissance, les cellules ont été récupérées et centrifugées 10 min à 6,000g à température ambiante. Les culots ont été resuspendus dans le milieu SMB ou milieu MODS à raison de 100 ml (Flacon Erlenmeyer) pour la condition aérobiose ou 12 ml (tubes Hungate) pour la condition anaérobiose. Le MODS n'a pas été supplémenté en glucose de sorte à ce que la croissance n'est pas lieu mais seulement une sporulation.

4. Suivi de la croissance et de la sporulation

Deux méthodes ont été appliquées afin de suivre la croissance des souches de *B. cereus* : par mesure du taux de croissance et par dénombrement sur milieu gélosé.

4.1. Mesure du taux de croissance

La croissance a été suivie par mesure de l'absorbance à 600 nm (A_{600}) au cours de la phase exponentielle. Pour cela, les croissances ont été modélisées en utilisant l'équation modifiée de Gompertz (Zwietering *et al.*, 1990).

4.2. Dénombrement sur LB

La croissance a été suivie en parallèle par dénombrements sur le milieu LB-agar. Pour cela, des dilutions sérielles dans du tampon phosphate à 0.1 M (pH 7.2) ont été effectuées puis, des volumes de 100 μ l de chaque dilution ont été étalés sur le milieu LB. La lecture des résultats (en UFC ml^{-1}) est effectuée après une incubation de 24 heures à 30 °C.

5. Récolte et purification des spores

La production de spores a été évaluée par observation au microscope à contraste de phase (Olympus BX 50 instrument, Rungis, France). La récolte a été effectuée lorsque 90 % des spores libres ont été obtenues. Tout d'abord, la suspension a été centrifugée à 4 °C (8,500g pendant 15 minutes) et le culot obtenu a été suspendu dans de l'eau distillée froide. Par la suite, des lavages par des centrifugations à des vitesses décroissantes (8,500g ; 6,500g et 5,500g pendant 15 minutes) ont été réalisés à 4 °C. A la fin de la récolte, le culot a été suspendu dans 2 ml d'eau distillée froide. La suspension a été pasteurisée à 70 °C pendant 10 minutes et conservée à 4 °C pour les expériences de caractérisation des spores.

6. Résistance des spores

Les propriétés des spores de la souche AH 187 de *Bacillus cereus* produites en absence et présence d'oxygène ont été comparées quant à leurs résistances à la chaleur humide, au peroxyde d'hydrogène, à l'hydroxyde de sodium, à l'acide nitreux, au formaldéhyde, aux UV

et à la lumière pulsée. Trois répliquas biologiques ont été réalisés pour chaque test de résistance.

6.1. Résistance à la chaleur humide

La thermorésistance des spores de la souche AH 187 de *B. cereus* a été étudiée par la méthode des capillaires submergés. Cette méthode permet de déterminer le nombre de spores ayant résisté au traitement par la chaleur en absence et en présence d'oxygène.

Une suspension de spores contenant 10^6 spores ml^{-1} et conservée à 4 °C a été utilisée. A l'aide d'une pipette, un volume de 100 μl de cette suspension a été injecté dans les capillaires par une extrémité. Les capillaires ont ensuite été scellés à l'aide d'un chalumeau (Oxypower CV220, Camping Gaz), puis plongés dans un bain marie à 70 °C pendant 10 minutes afin de déterminer le nombre de spores initial. La résistance à la chaleur humide a été effectuée à différentes températures (90°C, 92.5°C, 95°C, 97.5°C et 100°C) ainsi qu'à différents intervalles de temps allant de 5 à 80 minutes. Après chaque intervalle de temps, les capillaires ont été retirés du bain marie et déposés dans un bac à glace. Des dilutions sérielles ont été réalisées puis étalées sur le milieu LB-agar afin de déterminer le nombre de spores ml^{-1} de milieu.

Des courbes de survie ont été tracées ; elles ont été ajustées selon le modèle linéaire, avec l'équation suivante : $(\log N = \log N_0 - t / D_T)$ (Leguerinel *et al.*, 2007). N_0 et N représentent le nombre de spores initial et au temps t respectivement, exprimé en nombre d'UFC ml^{-1} et le paramètre D_T représente le temps (exprimé en minutes) nécessaire pour réduire une population de 1 \log_{10} pour chaque température T . Les valeurs- z sont déterminées comme la différence de température nécessaire pour augmenter ou réduire de dix fois la valeur D_T en traçant $\log D_T$ comme une fonction de la température. La valeur- z correspond à $(-1 / a)$, où "a" représente la pente de la courbe.

6.2. Résistance aux agents chimiques

6.2.1. Résistance au peroxyde d'hydrogène

Une solution de spores a été suspendue dans un tampon phosphate de potassium 50 mM à pH 7.4, auquel a été ajouté 5 % d' H_2O_2 (Cortezzo and Setlow, 2005). L'incubation a été réalisée à température ambiante pendant 30 minutes et des tubes ont été prélevés toutes les dix minutes et diluées au $1/100^{\text{ème}}$ dans du tampon phosphate de potassium 50 mM à pH 7.4

contenant 100 unités ml^{-1} de catalase bovine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) qui stoppe la réaction en dégradant l' H_2O_2 en H_2O . Avant et après traitement à l' H_2O_2 , les spores ont été dénombrées sur le milieu LB-agar. La mortalité des spores est exprimée par le rapport N_0/N où N_0 et N représentent respectivement le nombre de spores présentes avant et après traitement à un temps t .

6.2.2. Résistance à l'hydroxyde de sodium

Les spores suspendues dans de l'eau ont été activées par chauffage à 70 °C pendant 10 minutes. Par la suite, ces spores ont été incubées à température ambiante dans une solution de soude à une concentration finale de 1 M (Setlow *et al.*, 2002). A différents temps d'incubation (0, 30 et 60 minutes), des prélèvements ont été effectués puis dilués au $1/100^{\text{ème}}$ dans une solution de tampon phosphate 50 mM, à pH 7.4. Les suspensions sont ensuite étalées sur le milieu LB-agar afin de déterminer le nombre de spores ayant résisté au traitement à l'hydroxyde de sodium.

6.2.3. Résistance à l'acide nitreux

Une solution d'acide nitreux à une concentration finale de 0.1 M a été préparée puis filtrée. Par la suite, 100 μl de spores ont été mis en contact avec 100 μl de solution d'acide nitreux. L'expérience s'est déroulée à température ambiante (Setlow *et al.*, 2002 ; Rose *et al.*, 2007). A différents temps (0, 30, 60, 90 et 120 minutes), des échantillons ont été récoltés et dilués au $1/10^{\text{ème}}$ dans un tampon phosphate à 0.1 M, pH 7.4 pendant au moins 10 minutes avant d'être étalés sur le milieu LB-agar.

6.2.4. Résistance au formaldéhyde

Les spores en suspension dans de l'eau ont été préalablement activées (chauffage à 70 °C pendant 10 minutes) puis mélangées à cette solution de formaldéhyde 0.25 M puis incubées à 37 °C (Cortezzo and Setlow, 2005; Loshon *et al.*, 1999). Après l'incubation (0, 20, 40 et 60 minutes), les suspensions ont été diluées au $1/10^{\text{ème}}$ dans un tampon phosphate 0.1 M, pH 7 contenant 2 % de glycine et laissées 10 minutes pour la neutralisation du formaldéhyde. Une fois la solution neutralisée, des dilutions sérielles ont été réalisées puis étalées sur le milieu LB-agar. Après 24 h d'incubation à 30 °C, le taux de survie des spores a été calculé et la courbe $\log(N/N_0)$ en fonction du temps a été tracée.

6.3. Résistance aux UV et à la lumière pulsée

L'étude de la résistance aux UV de la souche AH 187 de *B. cereus* a été réalisée à l'aide de deux appareils, l'un fourni par la société Claranor (Claranor SA, Manosque, France) et l'autre mis en place dans notre laboratoire :

- Le premier est un appareil à lumière pulsée (LP), constitué d'un module pilote pour le commander et d'une enceinte dans laquelle est réalisée la décontamination. L'enceinte est composée d'un assemblage de 3 lampes au xénon et d'un élévateur réglable pour placer l'échantillon sous les lampes à la distance désirée. Cet appareil délivre des impulsions de lumière blanche de courte durée (< 1 ms), ayant un large spectre (200-1100 nm) riche en UV (200-400 nm).
- Le second est un appareil à UV-C continu équipé de trois lampes à mercure à basse pression (Mazda, Suresnes, France) placées à une distance de 45 cm de l'échantillon et délivrant des UV-C monochromes à une longueur d'onde de 254 nm.

Avant le traitement, des dilutions de suspensions de spores contenant entre 10^5 - 10^6 spores ml^{-1} ont été étalées sur le milieu LB-agar en boîtes de Pétri de 9.0 cm de diamètre. Pour empêcher la germination, les suspensions de spores ont été maintenues dans de la glace durant toute la période de l'expérience. Immédiatement après l'étalement, chaque boîte a été exposée à la lumière pulsée ou aux UV-C. Les spores ayant survécus aux traitements ont été énumérées après une incubation de 24 h à 30 °C puis la courbe de destruction des spores [$\log(N/N_0)$] en fonction de la fluence a été tracée.

La Fluence correspond à l'énergie totale reçue par la surface contaminée et varie de 0.3 J cm^{-2} à 1.25 J cm^{-2} (fourni dans un flash) et de 1.8 J cm^{-2} (livré en deux flashes à 1 seconde d'intervalle) en vertu d'une entrée de tension de 2.5 kV. Les différentes fluences UV-C ont été obtenues en faisant varier le temps d'exposition.

La courbe a été modélisée selon l'équation d'Albert et Mafart (Albert et Mafart, 2005) :

$$\log_{10} \frac{N_F}{N_0} = \log_{10} \left[\left(1 - \frac{N_{res}}{N_0} \right) x 10^{-\left(\frac{F}{F_1} \right)^p} + \left(\frac{N_{res}}{N_0} \right) \right] \quad (1)$$

où F est la fluence appliquée (J cm^{-2}), N_F est le nombre d'UFC après le traitement à une fluence F , N_0 est le nombre initial d'UFC, N_{res} est le nombre de bactéries résiduelles, F_1 est la fluence permettant la première réduction \log_{10} et p est un paramètre qui détermine la

convexité ou la concavité de la courbe (concavité: $p < 1$, convexité : $p > 1$). Le modèle détermine les trois derniers paramètres. Les fluences permettant une réduction de 1 \log_{10} ont été calculées en utilisant l'équation (2):

$$F_n = F_1 \left[\left(\log_{10} \left(\frac{1 - \frac{N_{res}}{N_0}}{10^{-n} - \frac{N_{res}}{N_0}} \right) \right)^{\frac{1}{p}} \right]$$

F_1 , p et N_0 ont été calculés en utilisant la fonction solveur de Microsoft® Excel 2010.

7. Etude de la germination des spores

La germination de la souche AH 187 de *B. cereus* a été mesurée par la perte de la résistance à la chaleur des spores produites en aérobiose et anaérobiose.

Les spores ont été activées par chauffage à 70 °C pendant 15 minutes afin de stimuler la germination puis conservées dans de la glace. Le choix des germinants s'est porté sur la L-alanine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) et l'inosine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) connus pour être des germinants potentiels de *B. cereus* (de Vries *et al.*, 2005). Pour la germination à la L-alanine, la D-cycloserine (Acros organics, Geel, Belgique) a été ajoutée à 0.2 M afin d'empêcher la conversion enzymatique de la L-alanine en D-alanine connu pour être un inhibiteur compétitif de la germination à la L-alanine. Par la suite, la germination a été réalisée dans un tampon Tris-HCl à 10 mM, NaCl à 10 mM (pH 7.4) supplémenté avec différentes concentrations d'alanine ou d'inosine. Les concentrations en germinants testées sont de 10, 100 et 200 mM pour la L-alanine et de 0.02, 0.1, 0.5 et 1 mM pour l'inosine. La germination à l'alanine et l'inosine a été réalisée à 30 °C pendant 3 h. Une fois l'expérience terminée, les spores ont été pasteurisées à 70 °C pendant 10 minutes puis refroidies dans de la glace. Des dilutions sérielles dans du tampon phosphate à pH 7 ont été réalisées, puis un volume de 100 μ l de chaque dilution a été prélevé et étalé sur le milieu LB-agar. Le niveau de germination après 3 h correspond à la différence entre le nombre initial de spores (N_0) et le nombre de spores non germées, ayant survécu au traitement thermique au temps t de 3 h, exprimé en pourcentage de $\log N/N_0$. L'étude de la germination a été réalisée sur trois répliques biologiques.

8. Teneur en acide dipicolinique (DPA)

L'extraction du DPA des spores de la souche AH 187 de *B. cereus* a été réalisée en utilisant un traitement thermique afin de libérer le DPA contenu dans le cœur des spores. Les spores ont été suspendues dans de l'eau à une certaine A_{600} , chauffées à 100 °C pendant 30 minutes et enfin refroidies dans de la glace pendant 15 minutes. Une centrifugation à 7,500g pendant 5 minutes (+4 °C) a ensuite été effectuée sur cette suspension de spores puis le surnageant a été récupéré et conservé pour la quantification du DPA.

La détection de l'acide dipicolinique a été obtenue par une méthode colorimétrique consistant en l'utilisation d'un réactif composé de 25 mg de L-cystéine, 170 mg de FeSO_4 et 80 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dissout dans 25 ml d'acétate de sodium (50 mM, pH 4.6) (Janssen et al., 1958 ; Rotman and Fields, 1967). Pour la mesure, un volume de 0.4 ml de surnageant à doser a été ajouté à 0.4 ml d'eau distillée mélangée à 0.2 ml du réactif préparé extemporanément. La lecture de l'absorbance à 440 nm (A_{440}) a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific). Le témoin utilisé était constitué de 0.8 ml d'eau distillée et de 0.2 ml du réactif. L'expérience a été répétée trois fois.

9. Microscopie électronique à transmission

Deux techniques de microscopie électronique ont été utilisées pour étudier l'effet de l'absence d'oxygène sur la structure des spores de *B. cereus* (souche AH 187).

9.1. Technique de la coloration négative

L'ultrastructure et la longueur des spores produites en absence et en présence d'oxygène ont été analysées après coloration négative avec 1 % de molybdate d'ammonium. Les observations ont été réalisées avec un microscope électronique à transmission (MET-FEI-PhilipsCM10, Eindhoven, Pays-Bas). La taille des spores a été déterminée par mesure de la longueur et la largeur en utilisant le logiciel Image J. Un total de 36 échantillons de spores provenant de 3 lots indépendants pour chaque condition (anaérobie et aérobie) a été analysé.

9.2. Technique des coupes minces

Pour l'analyse des différentes couches des spores, 200 μ l d'une suspension de spores fraîche ont été centrifugés à 7,000g pendant 5 min puis fixés 1 h à température ambiante. La fixation s'est déroulée dans du glutaraldéhyde à 2.5 % en tampon de cacodylate de sodium (0.1 M) à pH 7.2 auquel a été ajouté 1 mg ml⁻¹ de rouge de ruthénium. Après incubation, les spores ont été lavées trois fois avec 0.2 M de cacodylate de sodium et fixées 1 h à la température ambiante avec 2 % de tétroxyde d'osmium sous une hotte. Les échantillons ont ensuite été lavés à l'eau et mélangés avec de l'éthanol à 30 %. Après centrifugation, les culots de spores ont été enrobés dans 3 % d'agar et soumis à des bains successifs de déshydratation avec des concentrations croissantes d'éthanol sous agitation (70 %, 90 % et 100 %). L'éthanol a été remplacé par de l'oxyde de propylène et échangé successivement avec de la résine d'araldite. Les échantillons ont été polymérisés 48 h à 60 °C. Des sections de 60 nm d'épaisseur ont été coupées avec un ultramicrotome (Leica, France) puis colorées avec 2 % d'acétate d'uranyle et du citrate de plomb. Les observations ont été réalisées avec un microscope électronique à transmission (MET e-PhilipsCM10 FEI, Eindhoven, Pays-Bas).

10. Analyses statistiques

Le test statistique de Student a été utilisé pour analyser les différences entre les conditions aérobie et anaérobie pour la croissance et la capacité de sporulation. Les variances sont supposées inégales. L'outil utilitaire d'analyse de Microsoft® Excel 2010 a été utilisé.

11. Techniques de biologie moléculaire

11.1. Extraction d'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique (ADNg) de *B. cereus* a été réalisée selon la méthode suivante : une culture de *B. cereus* a été réalisée dans 10 à 25 ml de milieu LB. Une culture avec une A_{600} de 2-3 a été centrifugée à 9,500g pendant 10 minutes. Le culot a été resuspendu dans 400 μ l de tampon TE 10 mM, pH 8 contenant 5 mg de lysozyme et 5 μ l de RNase à 10 mg ml⁻¹ puis incubé 1 h à 37 °C. Par la suite, 25 μ l de SDS 20 % et 100 μ l de perchlorate de sodium (NaClO₄) ont été rajoutés au mélange. L'ADNg a été purifié par extraction phénol/chloroforme et précipité avec de l'éthanol absolu. Après centrifugation, l'ADN obtenu

(formant un filament) a été rincé à l'éthanol 70 % froid et séché sous une hotte. Le culot a été repris dans 50 μ l d'eau ultra pure. L'ADN a été dosé au TECAN infinite M200 pro avec une plaque nanoquant (Männedorf, Switzerland). Les concentrations sont données en $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ à l'aide du logiciel Magellan. L'ADNg est ensuite conservé à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à utilisation.

11.2. Amplification par PCR

La technique de PCR (polymérisation en chaîne) a été réalisée principalement pour des expériences de vérifications des amorces et de purification des ARNs après extraction. Le mélange réactionnel de PCR est composé de 0.8 mM de désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP) (Eurogentec), 1.5 mM de MgCl_2 (Roche), 0.6 μM d'amorces (Eurogentec), 100 ng de matrice et 1.25 unité de polymérase (Go Taq[®] DNA polymerase, Promega) et 1X du tampon de l'enzyme dans un volume final de 50 μ l.

Les amplifications ont été réalisées à l'aide du thermocycleur (Applied biosystems) avec une première étape de dénaturation à $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 5 minutes suivie de 30 cycles composés de 3 étapes (i) une étape de dénaturation de l'ADN bicaténaire à $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 1 minute, (ii) une étape à $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant une minute correspondant à l'hybridation des amorces complémentaires de l'ADN monocaténaire et (iii) une troisième étape à $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour l'élongation par l'ADN polymérase avec une durée d'une minute par kilobase (kb) amplifié. Le dernier cycle correspond à une phase d'élongation pendant 10 minutes à $72\text{ }^{\circ}\text{C}$.

11.3. Electrophorèse

La migration électrophorétique des produits de PCR a été réalisée dans des gels d'agarose à 1 %. La taille des acides nucléiques a été estimée à l'aide du marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec). La migration sur gel a été réalisée dans une solution de tampon TAE 0.5 X à pH 8.8 dans une cuve d'électrophorèse (Mupid-One), sous un potentiel de 100 volts. Après la migration, les gels ont été soumis à un bain de bromure d'éthidium pour permettre la visualisation des acides nucléiques sous UV à l'aide du gel imageur (Gel Doc XR+).

11.4. Quantification relative des ARNm par RT-PCR en temps réel

11.4.1. Les amorces utilisées

Les séquences d'amorces désignées pour cette étude ont été testées par PCR sur l'ADNg de la souche AH 187 de *B. cereus* afin de s'assurer de leurs températures d'hybridation. L'efficacité de ces amorces a également été vérifiée par PCR en temps réel, puis calculée selon l'équation suivante: $E=10^{(-1/a)-1}$ où « a » est la pente de la courbe du *Ct* (Threshold Cycle, seuil de détection de l'ADN) en fonction du log décimal de la concentration en ARN. Lorsque l'efficacité était comprise entre 85 % et 110 %, les amorces ont été considérées comme acceptables. Le tableau ci-dessous représente la liste des séquences d'amorces utilisées.

Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour la mesure de l'expression des gènes de l'initiation de la sporulation par qRT-PCR.

Amorces	Séquences (5'-3')
Spo0A	F-GCGCCATATTGAAAGGTTAAGAC
Spo0A	R-CGGTTTTCCATCTACTGTTGTTG
Spo0B	F-GAAACAGCAGCCGTGCTTAT
Spo0B	R-TTCGCAAGCCAATTCTGTAG
Spo0F	F-CCAAGCAGCGAATGGATTTCAAGC
Spo0F	R-ACAGCGAGTTCATTTCTCACCGC
kinA	F-ACGGAAGCGGATAATCAACA
kinA	R-AACGCAGGCATGGAGTTTAC
kinB1	F-TATCGCGGGAGAAAAACAAA
kinB1	R-ACGACCATCATTCCAAGACC
kinB2	F-ATGCCTCCGAAGCCGAACCG
kinB2	R-ACCCGCAAACGTCCCCAAAACA
kinB3	F-CGCCCAAGGAATTATTGATG
kinB3	R-AGTACCGCCATTAGGCATTG

11.4.2. Prélèvement et extraction des ARN

Afin de suivre l'expression des gènes impliqués dans la cascade de phosphorylation de la sporulation, des prélèvements d'ARN ont été réalisés en cultures contrôlées, à différentes phases de la croissance pendant 10 heures de culture. Un volume de 20 ml de culture a été centrifugé deux fois à 4 °C ; 7,000g pendant 5 minutes. Les culots ont été lavés au tampon phosphate à 0.1 M, pH 7.2 et conservés à -80 °C dans du TRI-reagent (Sigma). Les culots ont ensuite été transférés dans des tubes de FastPrep (MP biomedical, Solon, USA) contenant 300 mg de billes (zirconium/silicium). L'extraction des ARNs a débuté par trois séries

d'homogénéisation à vitesse 6,5 pendant 45 secondes. Par la suite, 200 µl de chloroforme ont été ajoutés dans chacun des tubes contenant 1 ml de TRI-reagent. Les tubes ont été mélangés pendant 15 secondes puis incubés à température ambiante pendant 10 minutes. Les phases aqueuses ont été récupérées par centrifugation à 10,000g pendant 13 minutes à 4 °C. Dans un tube stérile, la phase aqueuse est mélangée à 500 µl d'isopropanol en vortexant pendant 10 secondes puis une incubation est réalisée à température ambiante pendant 5 minutes. Les culots, obtenus après centrifugation à 10,000g pendant 8 minutes à 4 °C, ont été lavés à l'éthanol froid 75 % puis recentrifugés à 10,000g pendant 5 minutes à 4 °C. Les surnageants ont été éliminés et les culots contenant les acides nucléiques séchés sous une hotte aspirante puis repris dans 90 µl d'eau exempte de nucléase (RNase free). La dernière étape a consisté à traiter les solutions d'ARN à la DNase à l'aide du kit turbo DNA free kit Ambion (Invitrogen, Eugene, USA) selon les consignes du fabricant. Le traitement DNase a été répété 3 fois jusqu'à élimination de toute trace d'ADN.

11.4.3. Amplification par RT-PCR quantitative

Les PCR en temps réel (RT-PCR) ont été appliquées pour la mesure relative de l'expression des gènes de la sporulation (*spo0A*, *spo0B*, *spo0F*, *kinA*, *kinB*). Le principe de cette technique s'appuie sur l'utilisation d'un agent fluorescent (le SYBR Green), qui en se fixant sur l'ADN double brin émet une fluorescence détectable. Cette technique repose également sur l'utilisation de gènes de référence comme l'ARN ribosomal *16S* (ARNr) dans notre étude afin de normaliser les gènes à étudier. A chaque échantillon correspond un cycle seuil *Ct* (Threshold Cycle), qui est le cycle à partir duquel l'intensité de la fluorescence devient détectable. Il est inversement proportionnel au nombre initial de copie matrice.

Les PCR en temps réel ont été réalisées sur un « StepOnePlus Real Time PCR system » en utilisant les réactifs du kit « Power SYBR Green RNA to *Ct* » (Applied Biosystem, Carlsbad, USA). Les réactions ont été réalisées dans un volume de 10 µl avec une concentration en ARN de 2.5 ng µl⁻¹. Pour chaque échantillon, les mesures ont été répétées deux fois.

Les expressions relatives des gènes testés ont été calculées selon les équations suivantes:

- Etape 1 : normalisation par rapport au contrôle endogène :

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{gène cible})} - Ct_{(\text{gène de référence})}$$

- Etape 2 : normalisation par rapport au standard :

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{échantillon})} - \Delta Ct_{(\text{condition de comparaison})}$$

- Etape 3 : détermination de la variation du niveau d'expression relative du gène cible

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

RESULTATS

PARTIE 1

Mise au point d'un milieu de croissance et de sporulation pour les souches de *Bacillus cereus*

ARTICLE 1

Mise au point d'un milieu de croissance et de sporulation pour les souches de *Bacillus cereus*

1. Problématique

Les milieux de sporulation couramment utilisés sont complexes avec un certain nombre de caractéristiques communes : milieux riches, solides ou liquides, avec des valeurs de pH de l'ordre de 7 et contenant une combinaison de peptones, d'extrait de levure et de minéraux tels que le fer, le magnésium, le calcium, le cuivre, le manganèse et le zinc.

Les milieux couramment utilisés pour étudier la sporulation des souches de *Bacillus* sont : le CCY (Casein-Casein-Yeast), le FNA (Fortified Nutrient Agar) et le 2×SG (Schaeffer Sporulation medium). Dans ces milieux, les bactéries formant des spores se développent jusqu'à épuisement du milieu puis entrent en sporulation de manière spontanée. La croissance et la sporulation ont lieu dans les mêmes conditions environnementales (mode continu). Ces milieux conduisent alors à la production de spores hétérogènes et peu reproductibles.

Afin de permettre une synchronisation des mécanismes cellulaires, un autre mode de sporulation a été développé et consiste à utiliser deux milieux distincts, en séparant les phases de croissance et de sporulation par transfert des cellules à partir du milieu de croissance vers le milieu de sporulation (mode discontinu). Ce type de protocole est utilisé pour la production d'une concentration élevée de spores ainsi que l'étude de l'influence de l'environnement de sporulation sur les propriétés des spores. Ces milieux chimiquement définis sont de plus en plus utilisés pour la croissance et la sporulation afin d'obtenir une croissance rapide et synchronisée avec une forte production de spores.

De plus, la plupart des études de sporulation des espèces du genre *Bacillus* ont été effectuées en présence d'oxygène. Or, *B. cereus* est une espèce aérobic-anaérobic facultative, capable de se développer en présence mais aussi en absence d'oxygène. Se pose alors la question : les cellules végétatives de *B. cereus* sont-elles capables de sporuler dans un environnement anaérobic ? Si des spores sont produites en anaérobiose, ont-elles les mêmes propriétés que les spores produites en aérobiose ?

2. Objectif

L'objectif de cette étude était d'utiliser ou de mettre au point un milieu chimiquement défini permettant la sporulation des souches de *B. cereus*. Le deuxième objectif était d'obtenir des spores en quantités suffisantes pour comparer leurs propriétés en présence mais aussi en absence d'oxygène.

Pour répondre aux objectifs, le milieu MOD (milieu chimiquement défini), développé au laboratoire afin d'étudier le métabolisme de *B. cereus* a servi de base pour notre étude. Il a ainsi été modifié pour permettre la sporulation des espèces de *B. cereus*. Afin d'avoir une bonne représentativité des souches de *B. cereus*, 18 souches appartenant aux différents groupes phylogénétiques : II, III, IV, V, VI et VII ont été sélectionnées.

3. Stratégie et principaux résultats

3.1. Croissance et sporulation dans le milieu MOD

Dans un premier temps, des cultures de sept jours en batch non régulé, à 30 °C (pour les souches des groupes II, V et VI) et à 37 °C (pour les souches des groupes III, IV et VII), en aérobiose (fiolle d'Erlenmeyer) et en anaérobiose (tubes Hungate) dans le milieu MOD ont été réalisées. La croissance des 18 souches a été suivie par mesure de la densité optique (A_{600}). Des observations en microscopie à contraste de phase ainsi que des dénombrements de cellules et de spores ont été réalisés afin de suivre la sporulation des 18 souches de *B. cereus*.

Aucune spore n'a été obtenue dans les deux conditions testées. De plus, une perte de viabilité cellulaire au cours du temps a été constatée. Le pH descendait très bas dès le premier jour pour atteindre la valeur finale de 5 en aérobiose et de 4.7 en anaérobiose.

3.2. Mise au point d'un milieu chimiquement défini

Les résultats obtenus au cours des premières expériences ont montré que le milieu MOD n'était pas un milieu favorable à la sporulation et à la libération de spores libres matures de *B. cereus*. Dans le but de le rendre favorable à la sporulation, ce milieu a été modifié comme suit afin de se rapprocher le plus possible des milieux de sporulation classiques.

- En se basant sur le milieu de sporulation CCY, les éléments suivants ont été ajoutés au milieu MOD : 0.5 mM de $MgCl_2$, 0.01 mM de $MnCl_2$, 0.05 mM de $ZnCl_2$ et 0.2 mM de $CaCl_2$.
- La concentration en glucose présente dans le milieu MOD (30 mM) a été réduite à 10 mM car habituellement, le glucose n'est pas présent dans les milieux de sporulation (ex : CCY) ou en très faible quantité (ex : FNA, 2×SG). Cependant, cette source de carbone est importante notamment pour la croissance en anaérobiose.
- Les acides aminés (AA) présents dans le milieu MOD sont en excès et représentent 10 g l⁻¹ (pour 15 AA). Dans le milieu de sporulation CCY, un mélange d'acides aminés et de peptides est aussi retrouvé mais avec une concentration de seulement 2.5 g l⁻¹. La concentration d'acides aminés dans le milieu MOD a donc été réduite par 4.
- Le milieu a été tamponné (100 mM de phosphate de potassium) afin de ne pas limiter la croissance par la baisse de pH.

Ce milieu a été nommé MODS.

3.3. Etude de la sporulation en milieu MODS en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose

En aérobiose, les souches appartenant aux groupes II, III, IV, V et VI sporulent avec une moyenne de 8×10^8 spores ml⁻¹. Ce résultat se rapproche fortement de la sporulation dans le milieu de sporulation CCY (2.61×10^8 spores ml⁻¹).

En anaérobiose, une faible sporulation a été observée dans le milieu MODS (moyenne 5×10^4 spores ml⁻¹). Cependant, aucune sporulation n'a eu lieu dans le milieu CCY. Le taux de spores obtenu en MODS est suffisant pour en étudier les propriétés.

Aucune croissance (et donc aucune sporulation) n'a été obtenue pour les souches du groupe VI en aérobiose et en anaérobiose.

Toutes ces modifications effectuées sur le milieu MOD ont permis de mettre au point un milieu appelé MODS, favorable à la sporulation des souches de *Bacillus cereus*. De plus, cette étude nous a permis de sélectionner une souche (AH 187) qui sporule en anaérobiose avec un taux suffisant pour nos futures études concernant la comparaison de la caractérisation des spores produites en absence et présence d'oxygène.

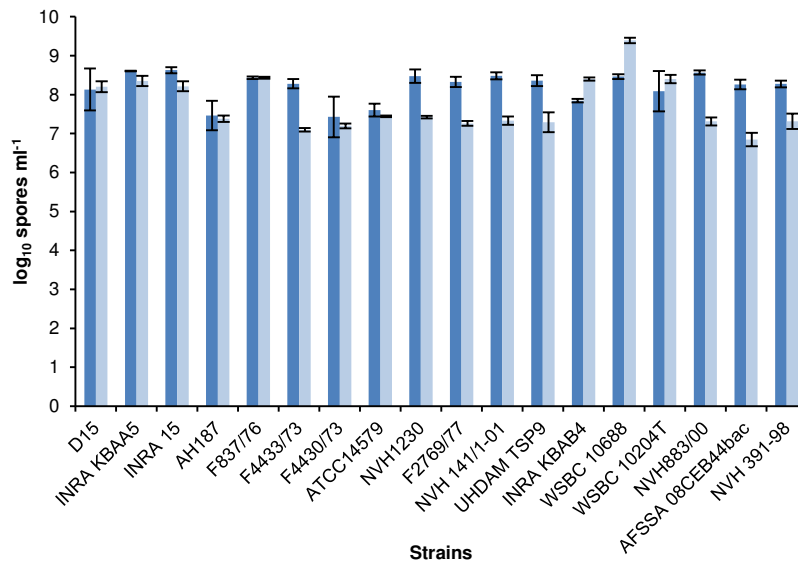
4. Résultats supplémentaires

En aérobiose, le milieu MODS est propice à la production de spores. Cependant, en anaérobiose, une faible concentration en spores a été obtenue. De plus, aucune croissance ni sporulation n'a pu être obtenue pour les souches du groupe VII en aérobiose et en anaérobiose.

Dans notre précédente étude, le même milieu (MODS) a été utilisé pour la croissance mais aussi pour la sporulation des souches de *B. cereus*. Cette méthode conduit à la production de spores hétérogène et peu reproductible (de Vries *et al.*, 2004). Afin de permettre une synchronisation des mécanismes cellulaires, un autre mode de sporulation a été développé et consiste à utiliser deux milieux distincts, en séparant la phase de croissance de celle de la sporulation. Dans ce cas, les cellules se développent dans un milieu riche (le milieu LB par exemple), afin d'avoir une biomasse importante qui pourrait conduire à une quantité importante de spores. En fin de croissance, les cellules sont transférées dans un milieu de sporulation pauvre en nutriment (le milieu SMB) afin d'initier la sporulation (Baril *et al.*, 2011). Ce type de protocole est utilisé pour la production d'une concentration élevée de spores ainsi que l'étude de l'influence de l'environnement de sporulation sur les propriétés des spores. Dans notre cas, les croissances cellulaires ont été réalisées dans le milieu LB, puis, les cellules ont été transférées dans le milieu MODS sans glucose ou le milieu SMB pour la sporulation. Le but était d'augmenter la capacité de sporulation des souches des groupes II, III, IV, V et VI en anaérobiose et permettre une croissance (et une sporulation) des souches du groupe VII.

En aérobiose, aucune différence significative n'a été observée entre la capacité de sporulation des 18 souches étudiées dans les deux milieux testés. Toutes les souches (y compris celles du groupe VII) ont sporulé avec une moyenne de 2.21×10^8 spores ml^{-1} et 2.25×10^8 spores ml^{-1} dans les milieux MODS et SMB, respectivement (Figure 1A).

A/



B/

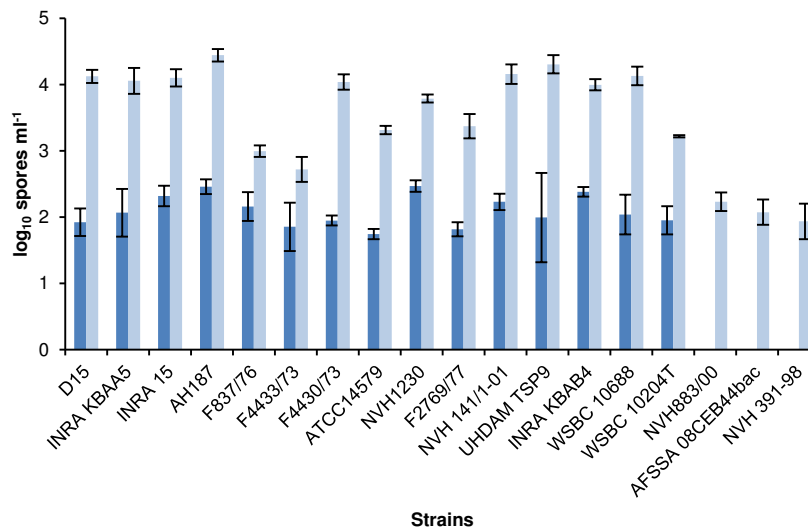


Figure 1. Capacité de sporulation des souches de *B. cereus* dans le milieu MODS (symboles bleus foncés) et dans le milieu SMB (symboles bleus clairs) en aérobiose (A) et en anaérobiose (B), à 30 °C (pour les souches des groupes II, V, VI) et à 37 °C (pour les souches des groupes III, IV, VII).

En anaérobiose, la production de spores dans les deux milieux reste plus faible comparée à l'aérobiose. La moyenne de sporulation a été de 1.29×10^2 spores ml⁻¹ dans le milieu MODS et de 8.44×10^3 spores ml⁻¹, dans le milieu SMB. Notons que les souches du groupe VII n'ont pas produit de spores (Figure 1B). Cependant, une croissance a été obtenue contrairement à la sporulation en culture mono-phasique.

Nos résultats montrent qu'en aérobiose, le milieu MODS serait favorable à la production de spores en culture biphasique. Cependant, il l'est moins en anaérobiose. Cette différence de sporulation pourrait être dû à l'interruption de l'oxygène en début de la phase stationnaire de croissance. Les cellules végétatives emprunteraient une voie différente, selon qu'elles se trouvent en aérobiose ou en anaérobiose.

De plus, La sporulation dans le milieu MODS en culture biphasique était plus faible qu'en culture monophasique. L'hypothèse serait que la composition du milieu MODS en culture biphasique est plus riche que celle du même milieu en fin de croissance (en culture monophasique). Les cellules seraient donc dans un milieu riches en nutriments (AA), elles n'induiseraient pas leur sporulation. De même, le milieu MODS est plus riche que le SMB, ce qui pourrait expliquer également cette différence de sporulation entre les deux milieux (MODS et SMB) en anaérobiose.

Article 1: A new chemically defined medium for growth and sporulation of *Bacillus cereus* strains in anaerobiosis condition

Amina Aicha Abbas^{a,b}, Stella Planchon^{a,b,†}, Michel Jobin^{a,b} and Philippe Schmitt^{a,b}

^a INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon

^b Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale

[†] present address: CTCPA - UMT Qualiveg. Site Agroparc, 449 avenue Clément Ader, ZA de l'Aéroport - BP21203, 84911 Avignon Cedex 9.

Article à soumettre dans Journal of Microbiological Methods

1. Abstract

A new liquid chemically defined medium namely MODS was developed for aerobic and anaerobic growth and sporulation of *Bacillus cereus* strains. This medium consisted of a modification of the basal MOD medium previously developed. MODS contains a mixture of 15 amino acids, minerals (usually present in sporulation media and necessary for spore production from bacilli), glucose as carbon source at the concentration of 10 mM and potassium phosphate buffer to limit the risk of acidification during growth. Comparison of sporulation capacity of eighteen strains of *B. cereus* between MODS and CCY (usually used for *Bacillus* sporulation) media shows no significant difference in aerobiosis. The strains sporulated, with an average of 8×10^8 spores ml⁻¹ and 2.61×10^8 spores ml⁻¹ in MODS and CCY media, respectively. In anaerobiosis, no growth was obtained in the CCY medium for the eighteen *B. cereus* strains tested, whereas effective growth and spore production (average of 5×10^4 spores ml⁻¹) were observed in MODS. In addition, strains of group VII did not sporulate in both tested media, in aerobiosis and anaerobiosis, with the exception of “AFSSA 08CEB44” strain that produced spores in CCY medium only in aerobiosis. Therefore, the MODS medium provides an appropriate culture medium for both growth and sporulation of *B. cereus*.

Keywords: *B. cereus*, anaerobiosis, sporulation, MODS medium, chemically defined sporulation medium.

2. Introduction

Bacillus cereus is a pathogen bacterium producing toxins responsible for emetic and diarrhea syndromes (Carlin *et al.*, 2000; Ceuppens *et al.*, 2013; Ehling-Schulz *et al.*, 2004). Soil is considered as the natural habitat of this bacterium. Consequently, vegetables, milk and rice are frequently contaminated with *B. cereus*. This facultative anaerobic, gram-positive bacterium form spores under environmental stress such as nutrient deprivation (Moir *et al.*, 2002; Setlow *et al.*, 2003; Setlow and Johnson, 2007).

Spores are a differentiated cell type which are metabolically dormant cells, able to resist chemical and physical stresses such as air-drying, high temperature, high pressure, UV light and acidity (Clavel *et al.*, 2004; Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011; Setlow, 2006; Tam *et al.*, 2006). This resistance is due to the presence of several specific layers and high dehydration level of the spore core (de Vries *et al.*, 2005).

Sporulation media commonly used in laboratories are complex with common features such as a high level of nutrients with a combination of peptones, yeast extract, casamino-acids and minerals such as iron, magnesium, calcium, copper, manganese, zinc and presence or absence of agar and a optimal pH value close to 7 (Meyer and Tholozan, 1999; Ting and Fung, 1972). Among these media, CCY (Casein-Casein-Yeast), FNA (Fortified Nutrient Agar) and 2×SG (double-strength Schaeffer sporulation medium) are routinely used to study sporulation of *Bacillus* strains (Fernandez *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 1981). In these media, spore-forming bacteria grow until depletion of the medium and then, sporulate spontaneously. Growth and sporulation are closely linked. Therefore, these media lead to heterogeneous and poorly reproducible production of spores (de Vries *et al.*, 2004).

Currently, chemically defined, synthetic media for growth and sporulation are frequently used (de Vries *et al.*, 2005; de Vries *et al.*, 2004; Donnellan *et al.*, 1964; Ellar and Lundgren, 1966; Hageman *et al.*, 1984; Ramaley and Burden, 1970; Ting and Fung, 1972). In most of these studies, sporulation was performed in aerobiosis. However, *B. cereus* is able to develop in a large variety of environment where oxygen could be missing (intestine, soil or on food processing line). *B. cereus* vegetative cells could sporulate in this anaerobic environment and cause serious problem of food safety. In contrast, *Bacillus* sporulation in anaerobiosis had not been specifically studied.

The aim of this work is to develop a new chemically, defined liquid medium for growth and sporulation of *Bacillus cereus* in aerobiosis and anaerobiosis. The medium consisted of a modification of the basal medium MOD (Rosenfeld *et al.*, 2005). First, we compared aerobic and anaerobic growth and sporulation parameters between the MOD medium, MOD modified medium (MODS) and the CCY sporulation medium, which is frequently used for *Bacillus* sporulation (Stewart *et al.*, 1981).

3. Materials and Methods

3.1. Micro-organisms, growth and sporulation media

Eighteen *B. cereus* strains were used in this study (Table 1). These strains belong to phylogenetic groups II, III, IV, V, VI and VII as defined by Guinebretière *et al.* (2008). In order to study the capacity of sporulation, three media were used in this work: the sporulation medium CCY (Stewart *et al.*, 1981), the chemically defined MOD medium (Rosenfeld *et al.*, 2005) and the new chemically defined medium named MODS. For the latter, the basal medium MOD was firstly quarter-diluted, then, supplemented with 10 mM glucose and minerals such as MgCl₂ (0.5 mM); MnCl₂ (0.01 mM); ZnCl₂ (0.05 mM) and CaCl₂ (0.2 mM). Finally, the pH of MODS was adjusted to 7.2 with KOH. The composition of each medium is given in Table 2.

Table 1: Characteristics of the strains used in this study

<i>B. cereus</i> Strain designation	Origin	Temperature growth limits (°C)	Phylogenetic group*
NVH 0861-00	Diarrhoeal outbreak	7-40	II
Bc 05-F1	Soil		II
INRA 15	Food		II
F4810/72	Emetic outbreak	15-45	III-5
DSMZ 4222	Clinical infection		III-8
F4433/73	Diarrhoeal outbreak		III-12
F4430/73	Diarrhoeal outbreak	10-40/45	IV-3
ATCC14579	Type strain <i>B. cereus</i>		IV3
NVH1230	/		IV
F2769/77	Diarrhoeal outbreak	10-40	V
NVH 141/1-01	Diarrhoeal outbreak		V
UHDAM TSP9	Environnement		V
INRA KBAB4	Environment	5/7-37	VI-1
SDA NFFE 664	Environment		VI-2
WSBC 10204T	Type strain <i>B. weihens.</i>		VI-1
NVH883/00	Diarrhoeal outbreak	20-50	VII
AFSSA 08CEB44bac	Diarrhoeal outbreak		VII
NVH 391-98	Diarrhoeal outbreak		VII

*The phylogenetic groups as defined by Guinebretière *et al.* (2008)

Table 2: Composition of the different media used: MODS, MOD and CCY.

	Concentration (g l ⁻¹)		
	MOD	MODS	CCY
Total Amino Acids	10.41	2.61	2.4
L-Arginine	0.46	0.12	0
L-Aspartic acid	0.91	0.23	0
L-Cysteine	0.04	0.01	0
L-glutamic acid	2	0.50	0
Glycine	0.39	0.10	0
L-Histidine	0.36	0.09	0
L-Isoleucine	0.7	0.18	0
L-Leucine	1.37	0.34	0
L-Lysine	1.18	0.30	0
L-Methionine	0.4	0.10	0
L-Phenylalanine	0.28	0.07	0
L-Serine	0.66	0.17	0
L-Threonine	0.71	0.18	0
L-Tyrosine	0.042	0.01	0
L-Valine	0.91	0.23	0
L-Glutamine	0	0	0
Glycerol	0	0	0.6
Pastone	0	0	1
yeast extract	0	0	0.4
Casamino-acid	0	0	1
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	1	0.25	5.93
KH ₂ PO ₄	0	0	1.768
(NH ₄) ₂ SO ₄	6	1.50	0
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.04	0.01	0
MgCl ₂ , 6H ₂ O	0	0.1	0.1
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0	0.002	0.002
CaCl ₂ , 6H ₂ O	0	0.043	0.043
ZnCl ₂	0	0.007	0.007
FeCl ₃ , 6H ₂ O	0	0.013	0.013
Glucose	5.4	1.8	0
pH	7.2	7.2	7

3.2. Culture conditions and spore production

Growth was performed in uncontrolled batch cultures in the different media. For growth and sporulation in MOD and MODS media, overnight cultures of *B. cereus* strains were

grown with stirring (200 rpm) in MOD supplemented with 30 mM glucose. For growth and sporulation in CCY medium, an overnight culture in LB (Luria-Bertani) broth was performed. Incubation was performed at 30 °C for strains belonging to the phylogenetic groups II, V and VI, and 37 °C for strains belonging to the phylogenetic groups III, IV and VII. After 18 h incubation, culture was centrifuged at 7,000g for 5 min at room temperature then cells were suspended in CCY, MOD or MODS media. For experiments in anaerobiosis conditions, the cultures were performed in Hungate tubes filled with 12 ml of medium and equipped with caps and rubber septa. To eliminate any traces of oxygen, a flow of N₂ was sent through a Hungate column and sparged into the medium. The aerobic cultures were performed in 500 ml conical flasks containing 100 ml of medium. All cultures were performed in triplicate.

3.3. Measure of growth and sporulation

The growth was followed by using a spectrophotometer (Helios Epsilon; Thermo Scientific, Rockford, IL). To avoid oxygen entry in anaerobiosis uncontrolled cultures, tubes were not opened to measure A_{600} values. Consequently, dilution of cultures for which the optical density was outside the linearity curve from the spectrophotometer was not possible.

To follow the growth and sporulation of the eighteen strains, concentration of vegetative cells and spores was determined by plating cells on the appropriate growth media and after heating at 70 °C for 10 min to kill any vegetative cells, respectively. The serial decimal dilutions of cultures were made in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0. An aliquot of 100 µl of each dilution was plated on LB-agar medium and incubated at 30 °C for 24 h. Cells and spores concentration was expressed as colony-forming units per ml (CFU ml⁻¹).

Spore production was monitored using a phase contrast microscope (Olympus BX 50 instrument, Rungis, France). When free phase-bright spores (>90 %) were obtained, harvesting and purification of spores was performed at 4 °C to prevent germination. The culture was first centrifuged at 8,500g for 15 min, then washed with cold distilled water and centrifuged with decreasing rotor speeds (8,500g; 6,500g and 5,500g) for 15 min. The pellet obtained from each centrifugation was suspended in cold distilled water. After harvesting, the spores were pasteurized at 70 °C for 10 min to eliminate any vegetative cells and cooled in an ice bath. Spore suspensions were stored at 4 °C until use.

4. Results

4.1. Growth kinetics in MOD, MODS and CCY media

The growth of 18 strains from the *B. cereus* group was carried out in uncontrolled batch culture in the MOD, MODS and CCY media at pH 7.2 in aerobiosis and anaerobiosis (Table 3). Incubation was performed at 30 °C for strains belonging to the phylogenetic groups II, V and VI or 37 °C for strains belonging to the phylogenetic groups III, IV and VII. Growth kinetics was realised by following optical density at 600 nm during the time.

Table 3: Aerobic and anaerobic growth of the *B. cereus* strains in MODS, MOD and CCY media

		Growth ^a (A_{600})					
		MOD		CCY		MODS	
Strains	Phylogenetic groups	Aerobiosis	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerobiosis
D15		3.24 ± 0.58	0.85 ± 0.12	3.58 ± 0.42	NG ^b	2.71 ± 0.25	0.56 ± 0.20
KBAA5	II	3.18 ± 0.18	0.61 ± 0.18	2.75 ± 0.19	NG	2.24 ± 0.28	0.44 ± 0.04
INRA 15		2.81 ± 0.23	0.77 ± 0.12	2.97 ± 0.20		2.05 ± 0.11	0.44 ± 0.08
AH187		3.31 ± 0.11	0.43 ± 0.03	2.04 ± 0.05	NG	2.93 ± 0.04	0.19 ± 0.04
F837/76	III	3.61 ± 0.22	0.66 ± 0.07	3.01 ± 0.16	NG	3.00 ± 0.13	0.63 ± 0.02
F4433/73		3.57 ± 0.28	0.93 ± 0.11	3.27 ± 0.17		2.56 ± 0.28	0.73 ± 0.03
F4430/73		3.88 ± 0.2	1.24 ± 0.09	2.67 ± 0.03	NG	2.68 ± 0.18	0.64 ± 0.01
ATCC14579	IV	3.53 ± 0.03	0.78 ± 0.02	2.05 ± 0.07	NG	2.38 ± 0.05	0.80 ± 0.02
NVH1230		3.18 ± 0.19	0.80 ± 0.07	2.37 ± 0.22		2.80 ± 0.30	0.69 ± 0.03
F2769/77		3.61 ± 0.07	0.64 ± 0.13	2.65 ± 0.12	NG	2.38 ± 0.24	0.55 ± 0.02
NVH 141/1-01	V	2.06 ± 0.11	0.66 ± 0.10	3.03 ± 0.17	NG	2.69 ± 0.12	0.47 ± 0.05
UHDAM TSP9		3.70 ± 0.02	0.55 ± 0.06	1.71 ± 0.21		1.43 ± 0.10	0.40 ± 0.04
KBAB4		3.70 ± 0.02	1.18 ± 0.07	2.11 ± 0.02	NG	2.80 ± 0.09	0.81 ± 0.01
WSBC 10688	VI	2.53 ± 0.08	0.88 ± 0.04	1.92 ± 0.10	NG	2.09 ± 0.10	0.67 ± 0.04
WSBC 10204		4.00 ± 0.21	0.94 ± 0.19	2.39 ± 0.18	NG	3.59 ± 0.04	0.54 ± 0.07
NVH883/00		NG	NG	NG	-	-	-
NVH 391-98	VII			NG	-	-	-
08CEB44				1.45 ± 0.26	-	-	-

Legend: ^a, Values of optical density measured at the stationary growth phase; ^b, No growth

In anaerobiosis, maximal OD in the stationary phase was lower than in aerobiosis. In aerobiosis, maximal density was quite similar for the strains belonging to the phylogenetic groups II, III, IV, V and VI, and ranged from 2.06 ± 0.11 to 4 ± 0.21 in MOD medium, from 1.43 ± 0.10 to 3.59 ± 0.04 in MODS medium and from 1.45 ± 0.26 to 3.58 ± 0.42 in CCY

medium. In anaerobiosis, the average final density in MODS was lower than in MOD. It ranged from 0.19 ± 0.04 to 0.81 ± 0.01 and from 0.43 ± 0.03 to 1.24 ± 0.09 in MODS and MOD media, respectively. No growth was observed in the CCY medium in anaerobiosis. In addition, strains of group VII did not grow in all tested media, in aerobiosis and anaerobiosis, except the 08CEB44 strain that grew in CCY medium in aerobiosis.

4.2. Ability of *B. cereus* sporulation in MOD, MODS and CCY media

Eighteen strains belonging to the different phylogenetic groups of *B. cereus* (II, III, IV, V, VI and VII) were selected to study their ability to sporulate in the MODS medium in aerobiosis or anaerobiosis (Table 4). The capacity to sporulate was compared to MOD and CCY media. Spore counting was measured after heating the cell suspension in order to evaluate the ability to sporulate.

Table 4: Capacity of *B. cereus* to sporulate in various media in aerobic and anaerobic conditions

Strains	Phylogenetic groups	MOD		CCY		MODS	
		Aerobiosis	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerobiosis
D15		-a	-	+++d	-	+++	+b
KBAA5	II	-	-	+++	-	+++	+
INRA 15		-	-	+++	-	+++	+
AH187		-	-	+++	-	+++	++c
F837/76	III	-	-	+++	-	+++	++
F4433/73		-	-	+++	-	+++	+
F4430/73		-	-	+++	-	+++	++
ATCC14579	IV	-	-	+++	-	+++	++
NVH1230		-	-	+++	-	+++	+
F2769/77		-	-	+++	-	+++	+
NVH 141/1-01	V	-	-	+++	-	+++	+
UHDAM		-	-	+++	-	+++	+
TSP9							
KBAB4		-	-	+++	-	+++	+
WSBC 10688	VI	-	-	+++	-	+++	+
WSBC 10204		-	-	+++	-	+++	+
NVH883/00		-	-	-	-	-	-
NVH 391-98	VII	-	-	-	-	-	-
08CEB44		-	-	+++	-	-	-

Legend: ^aNo growth ; ^b Low sporulation (10^1 to 10^3 CFU ml⁻¹); ^c Moderate sporulation (10^4 to 10^4 CFU ml⁻¹); ^d High sporulation (10^7 to 10^9 CFU ml⁻¹)

In aerobiosis, no significant difference for the capacity to sporulate of the strains belonging to the phylogenic group II, III, IV, V and VI was observed between the MODS and CCY media. In both media, all the strains sporulated with an average of 8×10^8 spores ml^{-1} and 2.61×10^8 spores ml^{-1} , respectively. No sporulation was obtained in the MOD medium for any strain as confirmed by microscopic observations. As no growth was observed in anaerobiosis in the CCY medium, no spore was produced in this condition.

In anaerobic condition, the maximum spore production in the MODS medium was lower (average of 5×10^4 spores ml^{-1}) than in aerobic condition. The highest amount of spores produced was obtained for the strain AH 187 (6.75×10^5 spores ml^{-1}) and the lowest for the F4430/73 strain (2.73×10^1 spores ml^{-1}). In addition, as no growth was observed in aerobiosis and anaerobiosis for strains belonging to the phylogenic group VII in all tested media, no spore was produced except for the 08CEB44 strain that produced spores in CCY medium only in aerobiosis.

5. Discussion

Bacillus cereus is a foodborne pathogen able to produce spores (Ceuppens *et al.*, 2013). Little information was available on *B. cereus* sporulation in the absence of oxygen because most studies on sporulation were performed in aerobic condition (Planchon *et al.*, 2011; Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011). However, *B. cereus* is a facultative anaerobic bacterium, able to grow in a large variety of environment where oxygen level may greatly vary. In anaerobic condition such as intestine, soil or food processing lines, *B. cereus* vegetative cells could sporulate and spores could have different properties compared to spores produced in aerobiosis condition.

In order to know whether *B. cereus* sporulation is possible in anaerobiosis, we optimized an existing medium, MOD, to allow effective growth and sporulation in absence and presence of oxygen. The MOD medium is a chemically defined medium, frequently used for study the effect of nutriments and/or physicochemical factors on growth parameters, growth adaptation, substrate metabolism or toxins production in *B. cereus* species (Duport *et al.*, 2004). This medium supports anaerobic growth of *B. cereus* strains but our results showed no efficiency for their sporulation (Table 3, Table 4). Therefore, modifications have been made to the MOD medium to improve the efficiency of sporulation of the *B. cereus* strains. For this purpose, composition of the new medium must be as close as possible to the traditional media sporulation. To do this, we added minerals usually present in sporulation media and necessary

for development of spores and their resistance into bacilli (Palop *et al.*, 1999). Based on sporulation medium CCY, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $ZnCl_2$ and $CaCl_2$ were added to the MOD medium with the same concentrations. In addition, we reduced the glucose concentration present in the MOD medium because in the sporulation media, glucose is usually at low concentration such as in FNA and 2×SG media, used for *B. subtilis* (Nicholson and Setlow, 1990) or absent in CCY medium used for *B. cereus* (Planchon *et al.*, 2011). It was shown that sporulation was repressed in presens of an excess of glucose (Yamashita *et al.*, 1989). In previous work of De Vries *et al.* (2004), a growth and sporulation medium used for *B. cereus* ATCC 14579 strain contained 10 mM glucose. In our medium, This carbon source is particularly important for the anaerobic condition because without glucose, no growth occurred. It was therefore important to determine the minimal concentration of glucose to distinguish good growth in order to have a reasonable spore production for characterization. Moreover, the MOD medium is a chemically defined medium, rich in amino acids (10 g l^{-1} , 15 AA). It has been previously tested with a concentration of amino acids divided by 2 without negative effect on growth (data not shown). Furthermore, in the sporulation medium CCY, a mixture of amino acids and peptides was found with a low concentration (2.5 g l^{-1}). Finally, for uncontrolled batch cultures, 100 mM of potassium phosphate buffer was added to limit the pH decrease during growth due to metabolites that acidify the medium. The MOD medium supplemented with minerals, buffer and with a final concentration of 10 mM glucose, called MODS, was used for the production of *B. cereus* spores.

In aerobiosis, MODS and CCY media were efficient for sporulation of all the strains belonging to the phylogenic group II, III, IV, V and VI. However, for the phylogenic group VII, no growth and no spore, in aerobiosis and anaerobiosis in all tested media, was produced except for one strain that produced spores in CCY medium only in aerobiosis. This could be due to auxotrophic character of this group.

Our results showed that MODS medium provide an appropriate culture medium for both growth and sporulation of *B. cereus*. In addition, unlike CCY medium, MODS was also efficient in anaerobiosis for growth and sporulation.

In anaerobiosis, sporulation capacity in MODS medium was lesser than in aerobiosis. Previous results showed that a low concentration of oxygen led to a lower spore production on several species of the genus *Bacillus* (Couchot and Maier, 1974). Other experiments reported a lower spore production of *B. thuringiensis*, genetically close to *Bacillus cereus*, under O_2 limitation compared to cultures with O_2 (Avignonerossa *et al.*, 1992; Finlay *et al.*, 2002; Foda *et al.*, 1985).

In conclusion, we have developed an appropriate chemically defined medium, called MODS to study growth and sporulation of *Bacillus cereus* strains in presence but also in absence of oxygen. Considering the lack of information on the *B. cereus* sporulation in the absence of oxygen, these data give better knowledge of *B. cereus* behavior in anaerobiosis environment.

Acknowledgements

Amina Aicha Abbas received a fellowship from the Programme Intergouvernemental Franco-Algérien. This work was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche under the project Food-Redox, ANR-11-ALID-001-04.

References

- Avignonerossa, C., Arcas, J., Mignone, C., 1992.** *Bacillus-thuringiensis* growth, sporulation and delta-endotoxin production in oxygen limited and nonlimited cultures. World. J. Microbiol. Biotechnol. 8, 301-304.
- Carlin, F., Girardin, H., Peck, M.W., Stringer, S.C., Barker, G.C., Martinez, A., Fernandez, A., Fernandez, P., Waites, W.M., Movahedi, S., van Leusden, F., Nauta, M., Moezelaar, R., Del Torre, M., Litman, S., 2000.** Research on factors allowing a risk assessment of spore-forming pathogenic bacteria in cooked chilled foods containing vegetables: a FAIR collaborative project. Int.J. Food Microbiol. 60, 117-135.
- Ceuppens, S., Boon, N., Uyttendaele, M., 2013.** Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. FEMS microbiol. ecol. 84, 433-450.
- Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C., Schmitt, P., 2004.** Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. J. Appl. Microbiol. 97, 214-219.
- Couchot, K.R., Maier, S., 1974.** Anaerobic sporulation in facultatively anaerobic species of the genus *Bacillus*. Can. J. Microbiol. 20, 1291-1296.
- Cortezzo, D.E., Setlow, P., 2005.** Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. J. Appl. Microbiol. 98, 606-617.
- de Vries, Y.P., Hornstra, L.M., de Vos, W.M., Abee, T., 2004.** Growth and sporulation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 under defined conditions: Temporal expression of genes for key sigma factors. Appl. Environ. Microbiology 70, 2514-2519.

- de Vries, Y.P., Atmadja, R.D., Hornstra, L.M., de Vos, W.M., Abee, T., 2005.** Influence of glutamate on growth, sporulation, and spore properties of *Bacillus cereus* ATCC 14579 in defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3248-3254.
- Donnellan, J.E., Jr., Nags, E.H., Levinson, H.S., 1964.** Chemically defined, synthetic media for sporulation and for germination and growth of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 87, 332-336.
- Duport, C., Thomassin, S., Bourel, G., Schmitt, P., 2004.** Anaerobiosis and low specific growth rates enhance hemolysin BL production by *Bacillus cereus* F4430/73. *Arch. Microbiol.* 182, 90-95.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Scherer, S., 2004.** Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS. Microbiol. Lett.* 232, 189-195.
- Ellar, D.J., Lundgren, D.G., 1966.** Fine structure of sporulation in *Bacillus cereus* grown in a chemically defined medium. *J. Bacteriol.* 92, 1748-1764.
- Fernandez, A., Salmeron, C., Fernandez, P.S., Martinez, A., 1999.** Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*. *Trends. Food Sci. Tech.* 10, 158-162.
- Finlay, W.J.J., Logan, N.A., Sutherland, A.D., 2002.** *Bacillus cereus* emetic toxin production in relation to dissolved oxygen tension and sporulation. *Food Microbiol.* 19, 423-430.
- Foda, M.S., Salama, H.S., Selim, M., 1985.** Factors affecting growth physiology of *Bacillus-thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 50-52.
- Guinebretiere, M.H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., De Vos, P., 2008.** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ. Microbiol.* 10, 851-865.
- Hageman, J.H., Shankweiler, G.W., Wall, P.R., Franich, K., McCowan, G.W., Cauble, S.M., Grajeda, J., Quinones, C., 1984.** Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus-subtilis*-growth, sporulation, and extracellular protease production. *J. Bacteriol.* 160, 438-441.
- Meyer, W., Tholozan, J.L., 1999.** A new growth and in vitro sporulation medium for *Clostridium perfringens*. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 98-102.
- Moir, A., Corfe, B.M., Behravan, J., 2002.** Spore germination. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 403-409.

- Nguyen Thi Minh, H., Durand, A., Loison, P., Perrier-Cornet, J.-M., Gervais, P., 2011.** Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1409-1417.
- Palop, A., Sala, F.J., Condon, S., 1999.** Heat resistance of native and demineralized spores of *Bacillus subtilis* sporulated at different temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1316-1319.
- Planchon, S., Dargaignaratz, C., Levy, C., Ginies, C., Broussolle, V., Carlin, F., 2011.** Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 degrees C and 30 degrees C display variations in their properties. *Food Microbiol* 28, 291-297.
- Ramaley, R.F., Burden, L., 1970.** Replacement sporulation of *Bacillus subtilis* 168 in a chemically defined medium. *J. Bacteriol.* 101, 1-8.
- Rosenfeld, E., Duport, C., Zigha, A., Schmitt, P., 2005.** Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. *Can. J. Microbiol.* 51, 149-158.
- Setlow, B., Cowan, A.E., Setlow, P., 2003.** Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. *J. Appl. Microbiol.* 95, 637-648.
- Setlow, P., 2006.** Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 101, 514-525.
- Setlow, P., Johnson, E.A., 2007.** Spores and their significance. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 550-556.
- Stewart, G., Johnstone, K., Hagelberg, E., Ellar, D.J., 1981.** Commitment of bacterial-spores to germinate - a measure of the trigger reaction. *Biochem. J.* 198, 101-106.
- Tam, N.K.M., Uyen, N.Q., Hong, H.A., Duc, L.H., Hoa, T.T., Serra, C.R., Henriques, A.O., Cutting, S.M., 2006.** The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J. Bacteriol.* 188, 2692-2700.
- Ting, M.N., Fung, D.Y., 1972.** Chemically defined medium for growth and sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl. microbiol.* 24, 755-759.

PARTIE 2

**Effet de l'absence d'oxygène sur la capacité de sporulation de
Bacillus cereus et les propriétés des spores**

ARTICLE 2

Effet de l'absence d'oxygène sur la capacité de sporulation de *Bacillus cereus* et les propriétés des spores

1. Problématique

Les environnements de sporulation peuvent être très variés en termes de températures et de nutriments affectant ainsi les diverses propriétés des spores comme la résistance à de multiples facteurs de stress, la structure et la composition de la spore. Chez *B. cereus* et *B. subtilis*, l'effet de la température et du milieu (nutriments et minéraux) sur la résistance des spores à la chaleur, aux UV et aux produits chimiques ainsi que sur la germination a été largement étudié. Cependant, peu d'études concernent l'effet de l'anaérobiose sur la sporulation du groupe *B. cereus*. La plupart des études sur la sporulation dans des conditions anaérobies ont été réalisées sur les genres bactériens anaérobies stricts. Parmi ces genres certains ont une importance tant au niveau de la sécurité des aliments (*C. perfringens*, connu comme la 3^{ème} cause de TIAC en France) que de l'altération des aliments (*Desulfotomaculum*, causant une altération des aliments en conserve).

Les cellules végétatives de *B. cereus* peuvent être retrouvées dans une grande variété de milieux naturels présentant un faible niveau d'oxygène où la sporulation peut avoir lieu comme dans l'intestin, le sol ou dans les aliments en cours de transformation sur des lignes de fabrication industrielle. Les spores produites dans ces milieux anaérobies pourraient donc avoir des propriétés de résistance et de germination différentes. Il est important de savoir si ces propriétés de résistance sont augmentées pour mettre en œuvre des moyens de maîtrise mieux adaptés.

2. Objectif

L'objectif de ce travail est d'étudier la sporogénèse de *Bacillus cereus* en anaérobiose afin de comprendre l'effet de l'absence d'oxygène sur la sporulation ainsi que sur les propriétés de résistance et de germination des spores formées.

3. Stratégie et principaux résultats

Un panel de souches appartenant aux différents groupes phylogénétiques de *B. cereus* (II à VII) a été étudié quant à sa capacité à sporuler en anaérobiose dans le milieu de sporulation MODS que nous avons développé (voir partie 1).

Les résultats indiquent qu'en anaérobiose, la capacité de sporulation est plus faible et plus hétérogène qu'en aérobiose. De plus, parmi les souches testées, *B. cereus* AH 187 produit le niveau de spores le plus important en absence d'oxygène. La quantité de spores est importante pour pouvoir évaluer correctement leurs propriétés. Cette souche a donc été choisie pour étudier la résistance à la chaleur, la résistance chimique, la capacité de germination, la taille des spores ainsi que la structure.

Les résultats montrent que spores de la souche AH 187 produites en anaérobiose sont plus résistantes à la chaleur humide à 90 °C, 92.5 °C, 95 °C, 97.5 °C et 100 °C. Les spores produites en anaérobiose sont également plus résistante à 1 M de NaOH, 1 M d'acide nitreux ainsi qu'à la lumière pulsée à des fluences de 0.34 J cm⁻² et 0.49 J cm⁻². Aucune différence dans la résistance aux rayons UV-C, à 5 % de peroxyde d'hydrogène ou à 0.25 mM de formaldéhyde n'est observée entre les deux conditions.

L'étude de la germination indique qu'en présence de L-alanine, les spores produites en anaérobiose germent plus efficacement que celles produites en aérobiose. Cependant, en présence d'inosine, aucune différence dans la germination n'est observée.

L'observation des spores de la souche AH 187 en microscopie électronique à transmission ne montre aucune différence de taille entre les spores produites dans les deux conditions testées. Toutefois, les spores obtenues dans des conditions anaérobies présentent un exosporium endommagé ou dans certains cas, un exosporium complètement détaché du reste de la spore contrairement aux spores produites dans des conditions aérobies.

Les résultats obtenus montrent que peu de spores sont formées en anaérobiose mais qu'elles sont plus thermorésistantes et chimiorésistantes. **Ces données apportent des connaissances significatives notamment si l'on considère le risque lié à la présence de ce pathogène dans des aliments traités thermiquement et conditionnés en absence d'oxygène.**

Article 2: Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*

Amina Aicha Abbas^{a,b}, Stella Planchon^{a,b,†}, Michel Jobin^{a,b} and Philippe Schmitt^{a,b}

^a INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon

^b Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon

† present address: CTCPA - UMT Qualiveg. Site Agroparc, 449 avenue Clément Ader, ZA de l'Aéroport - BP21203, 84911 Avignon Cedex 9

Article accepted in *Food Microbiology* (2014), Vol 42: 122-131.

1. Abstract

This study was performed to evaluate the effect of anaerobiosis on the formation of *Bacillus cereus* spores and their resulting properties. For this purpose, an appropriate sporulation medium was developed (MODS). Sporulation of 18 strains from different phylogenetic groups of *B. cereus* was studied in MODS medium in aerobiosis and anaerobiosis. In anaerobiosis, sporulation ability was weaker and more heterogeneous than in aerobiosis. Among tested strains, *B. cereus* AH187 produced the highest level of spores in anaerobiosis. This strain was therefore chosen to study spore properties. Spores produced in anaerobiosis were more resistant to wet heat at 90 °C, 92.5 °C, 95 °C, 97.5 °C and 100 °C. For example, D_{90} were $21,09 \pm 1.70$ and 81.87 ± 2.00 for aerobiosis and anaerobiosis conditions, respectively. Spores produced in anaerobiosis have a z -value of 7.70°C compared with 10.52°C for spores produced in aerobiosis. Spores produced in anaerobiosis were also more resistant to 1 M NaOH, 1 M nitrous acid and pulsed light at fluences of 0.34 J cm^{-2} and 0.49 J cm^{-2} . No difference in resistance to UV-C, 5% hydrogen peroxide or 0.25 mM formaldehyde was observed between these two conditions. In the presence of L-alanine, spores produced in anaerobiosis germinated more efficiently than spore produced in aerobiosis. No difference in germination was observed with inosine as inducer. No difference in the size of spores produced in the different conditions was observed by transmission electron microscopy. However, spores obtained under anaerobic conditions had a damaged exosporium, or in some cases a completely detached exosporium, unlike spores produced under aerobic conditions.

This study shows that few spores are formed under anaerobic condition; nevertheless, this condition has an impact on the spore properties of *B. cereus* AH 187 strain. Spores obtained under anaerobic condition were more resistant to heat and to some chemical compounds. This is an important feature, considering the risk associated with the presence of this pathogen in thermally processed and packaged food in absence of oxygen.

Keywords: *B. cereus*, anaerobiosis, sporulation, strain diversity, resistance, germination.

2. Introduction

The *Bacillus cereus* group is formed of ubiquitous Gram-positive facultative anaerobic endospore-forming bacteria. It comprises seven phylogenetically close species: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus cytotoxicus* and *Bacillus cereus sensu stricto*. Seven major phylogenetic groups (I–VII) have been identified, with ecological differences that are evidence for a multiemergence of psychrotolerance in the *B. cereus* group. A moderate thermotolerant group (VII) was basal to the mesophilic group I, from which in turn distinct thermal lineages have emerged, comprising two mesophilic groups (III, IV), an intermediate group (V) and two psychrotolerant groups (II, VI) (Guinebretière *et al.*, 2008; Guinebretière *et al.*, 2013). *B. cereus* is frequently isolated from foods and it can cause two types of foodborne disease, described as emetic and diarrheal. The emetic syndrome results from toxins produced in the ingested food. Diarrheal toxi-infection results from ingesting food contaminated by *B. cereus*, whose cells transit through the digestive tract and produce the diarrheal toxins in the small intestine (Perez Portuondo *et al.*, 2012; Ceuppens *et al.*, 2013).

Under environmental stress conditions such as nutrient deprivation, *B. cereus* cells are able to produce spores (Moir *et al.*, 2002; Setlow, 2003; Setlow and Johnson, 2007). Sporulation can take place (i) in soil (considered the natural habitat of spores), (ii) insects, and animal gut, and (iii) food processing lines or food such as ready-to-eat foods, dairy products and vegetables. It is well known that spores are able to resist chemical and physical stresses such as air-drying, high temperature, high pressure, UV light and acidity (Clavel *et al.*, 2004; Setlow, 2006; Tam *et al.*, 2006; Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011). This high resistance ability is in some extent due to the presence of calcium dipicolinate and the dehydration state of the spore core (de Vries, 2005). These properties favor their survival through food processing and their long-term persistence in foods, where they cause serious problems (Anderson *et al.*,

1995; Carlin, 2011). Under suitable conditions, *B. cereus* spores are able to germinate and revert to life as vegetative cells responsible for toxins production (Paredes-Sabja *et al.*, 2011). Germination may take place within minutes; this depends on strains and conditions under which spores have been produced. In addition, germination can be initiated by some amino acids, sugars or other compounds found in complex culture media in bacilli (van der Voort *et al.*, 2010; McKenney *et al.*, 2013).

The different environments where sporulation take place present numerous temperatures and nutrient conditions affecting various spore properties, including resistance to many different stress factors, structure and composition (Margulis *et al.*, 1998; Nicholson *et al.*, 2002; Cazemier *et al.*, 2001; Melly *et al.*, 2002; Rose *et al.*, 2007; Nguyen Thi Minh *et al.*, 2008; van der Voort *et al.*, 2010; van der Voort and Abee, 2013). In *B. cereus* and *B. subtilis*, the effect of temperature and nutrient conditions on spore resistance to heat, UV and chemicals and germination has been extensively studied (Melly *et al.*, 2002; Faille *et al.*, 2007; Gounina-Allouane *et al.*, 2008; Planchon *et al.*, 2011). Few studies on the effect of anaerobiosis on sporulation of the *B. cereus* group have been published except the effect of oxygen on the sporulation capacity of *B. thuringiensis* but spore properties were not studied (Avignone-Rossa *et al.*, 1992; Finlay *et al.*, 2002; Boniolo *et al.*, 2012). Most studies on sporulation in anaerobic condition were performed with the anaerobic clostridia species (Paredes *et al.*, 2005). However, *B. cereus* vegetative cells can be found in a large variety of natural environments with low oxygen level (intestine, soil or on food processing line) where sporulation can take place. Then, spores of *B. cereus* can be found in various food processing intermediates and foods products. Spores produced in these anaerobic environments could have particular properties and cause a problem of food safety.

The aim of this work was to investigate the sporulation capacity of *B. cereus* in an anaerobiosis environment. In this work, a panel of strains belonging to *B. cereus* phylogenetic groups II to VII was studied for their capacity to sporulate in anaerobiosis. In addition, spores of the strain AH187 from group III were study for heat resistance, chemical resistance, germination capacity, spore size and structure.

3. Materials and methods

3.1. Strains and media

A collection of 18 *B. cereus* strains was selected for this study (Table 1). These strains belong to phylogenetic groups II, III, IV, V, VI and VII as defined by Guinebretière *et al.* (2008). The chemically defined medium MOD, previously described by Glatz and Goepfert (1977), was optimized for the growth and sporulation of *B. cereus* strains. MOD medium was first supplemented with 5.74 mM K₂HPO₄, 45.4 mM (NH₄)₂SO₄, and 0.16 mM MgSO₄ (Duport *et al.*, 2004). This medium (MODS) was then quarter-diluted and supplemented with 0.5 mM MgCl₂, 0.01 mM MnCl₂, 0.05 mM ZnCl₂, and 0.2 mM CaCl₂. MODS was finally adjusted to pH 7.2 with KOH. For the growth of group VII strains, 4.8 mM tryptophan was added to the medium because of their auxotrophy for this amino acid. After autoclave sterilization, MODS was supplemented with 10 mM glucose as a fermentative carbon source. For uncontrolled batch culture, 80 mM K₂HPO₄ and 20 mM KH₂PO₄ were used to buffer the medium.

Table 1: Characteristics of the studied strains

Strain designation	Origin	Temperature growth limits (°C)	Phylogenetic group*
NVH 0861-00	Diarrhoeal outbreak	7-40	II
Bc 05-F1	Soil		II
INRA 15	Food		II
F4810/72	Emetic outbreak	15-45	III-5
DSMZ 4222	Clinical infection		III-8
F4433/73	Diarrhoeal outbreak		III-12
F4430/73	Diarrhoeal outbreak	10-40/45	IV-3
ATCC14579	Type strain <i>B. cereus</i>		IV3
NVH1230	/		IV
F2769/77	Diarrhoeal outbreak	10-40	V
NVH 141/1-01	Diarrhoeal outbreak		V
UHDAM TSP9	Environnement		V
INRA KBAB4	Environment	5/7-37	VI-1
SDA NFFE 664	Environment		VI-2
WSBC 10204T	Type strain <i>B. weihens.</i>		VI-1
NVH883/00	Diarrhoeal outbreak	20-50	VII
AFSSA 08CEB44bac	Diarrhoeal outbreak		VII
NVH 391-98	Diarrhoeal outbreak		VII

*The phylogenetic groups as defined by Guinebretier *et al.* (2008).

3.2. Uncontrolled batch cultures

Overnight cultures of *B. cereus* strains were run in MOD supplemented with 30 mM glucose with stirring (200 rpm). Incubation was performed at 30 °C for strains belonging to phylogenetic groups II, V and VI, and 37 °C for strains belonging to phylogenetic groups III, IV and VII. After incubation for 18 h, each culture was centrifuged at 7,000g for 5 min at room temperature, and cells were suspended in MODS medium. For anaerobic experiments, cultures were run in Hungate tubes equipped with open-top caps and rubber septa, and filled with 12 ml MODS. To eliminate any traces of oxygen, a flow of N₂ sent through a Hungate column was sparged into the medium. Aerobic cultures were performed in 250 ml conical flasks containing 50 ml MODS. Cultures were performed in triplicate.

3.3. Controlled batch cultures

B. cereus AH187 cells from overnight cultures in MOD medium, were centrifuged at 7,000g for 5 min at room temperature, washed twice and resuspended in MODS medium. A 2 L bioreactor (Inceltech Discovery 100 (Toulouse, France) containing 1.3 L of MODS medium was inoculated at an initial A_{600} value of 0.05 in MODS with this suspension. Temperature was regulated at 37 °C. For aerobic conditions, agitation was adjusted to maintain the partial pressure of oxygen (pO₂) above 60 %. Bioreactors were kept under airflow to obtain aerobiosis, or nitrogen flow to obtain anaerobiosis. The pH was regulated at 7.2 by adding 2 M KOH or 2 M HCl. The regulated batch was equipped with a polarographic oxygen electrode (Mettler Toledo) calibrated in a medium flushed with air (100 % value) or pure N₂ (0 % value). Each condition was used in three independent experiments.

3.4. Spore production

Spore formation was monitored in uncontrolled and controlled batch cultures using a phase contrast microscope (Olympus BX 50 instrument, Rungis, France). When free phase-bright spores were obtained, harvesting and purification of spores was performed at 4 °C to prevent germination. The culture was first centrifuged at 8,500g for 15 min, then washed with cold distilled water and centrifuged with decreasing rotor speeds (8,500g; 6,500g and 5,500g) for 15 min. The pellet of spores obtained from each centrifugation was suspended in cold distilled water. After harvesting, the spores were pasteurized at 70 °C for 10 min to eliminate any

vegetative cells, and then cooled in an ice bath. Spore suspensions were stored at 4 °C until use.

3.5. Cell and spore counts

Concentration of vegetative cells and spores was determined, directly and after heating at 70 °C for 10 min to kill any vegetative cells, respectively. Serial decimal dilutions of cultures were made in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0. An aliquot of 100 µl of each dilution was plated on LB-agar medium and incubated at 30 °C for 24 h. Cells and spores concentration was expressed as colony-forming units per ml (CFU ml⁻¹).

3.6. Resistance of *B. cereus* spores produced in controlled batch cultures

3.6.1. Spore wet-heat resistance

Spores of strain AH187 produced in the absence and presence of oxygen were heated for 10 min at 70 °C and then cooled on ice for 15 min to determine initial spore numbers. Wet-heat resistance were performed at 90 °C, 92.5 °C, 95 °C, 97.5 °C and 100 °C in order to evaluate a *z*-value of spores produced in the two conditions. D_T values were determined for each temperature as the time necessary to reduce one log₁₀ cycle of the population. The linear model was used to determine D_T values: $(\log N = \log N_0 - t / D_T)$ where N_0 and N are the initial population and population at time t , respectively. *z*-values were determined as the difference in temperature required to increase or reduce tenfold the D_T value by plotting Log D_T as a function of the temperature. The *z*-value corresponds to $(-1/a)$ where “a” is the slope of the curve. Wet-heat resistance was evaluated on a spore suspension in capillary tubes heated and removed at regular intervals as described by Leguerinel *et al.* (2007).

3.6.2. Resistance of spores to chemicals, acid and alkali

Resistance of spores to hydrogen peroxide, formaldehyde, sodium hydroxide and nitrous acid was tested as previously described (Loshon *et al.*, 1986; Setlow *et al.*, 2002; Cortezzo and Setlow, 2005; Rose *et al.*, 2007; Gounina-Allouane *et al.*, 2008; Planchon *et al.*, 2011). Spore suspensions were mixed with 50 mM KPO₄, pH 7.4 containing 5 % H₂O₂ or 0.25 M formaldehyde, 1 M sodium hydroxide or 0.1 M nitrous acid. Treatment was carried out at room temperature or at 37 °C for formaldehyde. After incubation, samples were diluted 10-fold in 50 mM KPO₄, pH 7.4 containing 100 U of bovine catalase (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) for H₂O₂ treatment, 2 % glycine for formaldehyde and 0.1 M KPO₄, pH 7.5 for nitrous acid and sodium hydroxide assays. For each treatment, spore reduction was

determined by $\log_{10} (N/N_0)$ where N_0 is the initial spore population and N the spore population surviving the treatment.

3.6.3. Ultraviolet and pulsed light treatment

The UV resistance of spores produced under anaerobiosis or aerobiosis was determined using (i) a pulsed light (PL) instrument (Claranor SA, Manosque, France) delivering short pulses (duration 25 μ s) of broad spectrum white light (200–1100 nm) rich in UV (200–400 nm), and (ii) a laboratory-made instrument with germicidal lamp tubes (Mazda, Suresnes, France) delivering monochromatic UV-C at wavelength 254 nm. Suspensions of 10^5 – 10^6 spores ml^{-1} were spread on 9.0 cm diameter Petri dishes of LB agar. Each plate was exposed to pulsed light immediately after spreading the suspension. Fluence corresponds to the total energy received by the contaminated surface and ranged from 0.3 J cm^{-2} to 1.25 J cm^{-2} (delivered in one flash) and 1.8 J cm^{-2} (delivered in two flashes at 1 s interval) with an input voltage of 2.5 kV. The different UV-C fluences were obtained by varying the exposure time. F_1 (fluences to 1 log reduction) was calculated using the model of Albert and Mafart (Albert and Mafart, 2005), as previously performed. The equation is:

$$\log_{10} \frac{N_F}{N_0} = \log_{10} \left[\left(1 - \frac{N_{res}}{N_0} \right) x 10^{-\left(\frac{F}{F_1} \right)^p} + \left(\frac{N_{res}}{N_0} \right) \right] \quad (1)$$

where F is the fluence applied (J.cm^{-2}), N_F is the number of CFU after treatment at a fluence F , N_0 is the initial number of CFU, N_{res} is the residual bacterial number, F_1 is the fluence allowing the first \log_{10} reduction and p is a parameter which determines the curve convexity or concavity (upward concavity: $p < 1$, upward convexity: $p > 1$). The model determines the last three parameters. Fluences allowing a $n \log_{10}$ reduction were calculated using equation (2):

$$F_n = F_1 \left[\left(\log_{10} \left(\frac{1 - \frac{N_{res}}{N_0}}{10^{-n} - \frac{N_{res}}{N_0}} \right) \right)^{\frac{1}{p}} \right]$$

F_1 , p and N_0 were calculated using the Microsoft[®] Excel 2010 solver function.

3.7. Spore germination

Spore germination was evaluated by the loss of heat resistance. After heat activation for 10 min at 70 °C, germination was performed in a 10 mM Tris, 10 mM NaCl buffer (pH 7.4) supplemented with different concentrations of inosine or L-alanine. The last germinant was used in combination with 0.2 M D-cycloserine, preventing enzymatic conversion of L-alanine into D-alanine, which is a competitive inhibitor of L-alanine for germination. Germination was followed for 3 h at 30 °C in aerobic conditions with shaking. Aliquots were harvested after 3 h, pasteurized for 15 min at 70 °C and cooled on ice. The level of germination corresponds to the difference between the initial number of spores (N_0) and the number of non-germinated spores after 3 h (N), expressed as $\log N/N_0$. The percentage of germination was determined using the formula $[(N_0 - N)/N_0] \times 100$.

3.8. Transmission electron microscopy

Fresh AH187 spores produced in controlled batch cultures, in the absence and presence of oxygen, were examined after negative staining with 1 % ammonium molybdate. Observations were made with a transmission electron microscope (TEM-FEI-PhilipsCM10, Eindhoven, Netherlands). Spore size was determined by measuring spore length and width directly on the image using Image J software, from three independent samples of at least 36 spores for anaerobic and aerobic conditions. For spore section analysis, 200 μ l of a fresh spore suspension was centrifuged at 7,000g for 5 min and fixed for 1 h at room temperature with 2.5 % of glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2, containing 1 mg ml⁻¹ ruthenium red. After incubation, the spores were washed three times with 0.2 M of sodium cacodylate and post-fixed for 1 h at room temperature with 2 % osmium tetroxide under a fume hood. Samples were washed in water and mixed with 30 % ethanol. After centrifugation, spore pellets were embedded in 3 % agar and submitted to successive dehydration baths with increasing concentrations of ethanol under shaking (70 %, 90 % and 100 %). Ethanol was replaced with propylene oxide and sequentially exchanged with araldite resin. Samples were polymerized for 48 h at 60 °C. Thin sections (width 60 nm) were cut with an ultramicrotome (Leica, France) and stained with 2 % uranyl acetate and lead citrate. Observations were made with a transmission electron microscope (TEM e FEI-PhilipsCM10, Eindhoven, Netherlands).

3.9. Dipicolinic acid DPA content

DPA content was measured by a colorimetric assay (Rotman and Fields, 1967). DPA was extracted from spore suspensions (A_{600} of 1.0) by autoclaving at 121°C for 30 min and then cooling. Autoclaved suspensions were centrifuged at 7,000g for 15 min at room temperature. A 0.8 ml volume of samples was mixed with 0.2 ml of reagent composed of 1% (w vol⁻¹) ammonium iron (II) sulphate $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 0.1 % (w vol⁻¹) cystein in sodium acetate buffer 0.05 M, pH 4.0. Then, A_{400} was measured to determine the DPA concentration via a calibration curve using a 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DPA solution. Spore DPA content was expressed in mg per unit of the initial A_{600} of spore suspensions.

3.10. Statistical analysis

A Student *t*-test was used to analyze differences for cell growth and sporulation capacity in aerobiosis and anaerobiosis conditions, assuming unequal variances and using the Microsoft® Excel 2010 analytical tool.

4. Results

4.1. Growth and sporulation capacity of *B. cereus* strains in uncontrolled batch culture

Eighteen strains belonging to the different phylogenetic groups of *B. cereus* were selected to cover the phenotypic diversity of *B. cereus* strains (Table 1). Their growth and ability to sporulate in MODS were tested in aerobic and anaerobic conditions.

The final biomass, measured in stationary growth phase by cell counting, is expressed as CFU ml⁻¹ (Figure 1). In aerobiosis, the final biomass was similar for all tested strains, and ranged from about 2.95×10^8 CFU ml⁻¹ to 3×10^9 CFU ml⁻¹ (Figure 1A). No growth was observed for the three strains belonging to phylogenetic group VII, presumably because this group requires more nutrients for growth than those present in the MODs medium. In anaerobiosis, the average final biomass was lower than in aerobiosis, ranging from 2×10^6 CFU ml⁻¹ for the UHDAM TSP9 strain (group V) to 10^8 CFU ml⁻¹ for the ATCC 14579 strain (group IV). No correlation between ability to grow under anaerobic conditions and phylogenetic group was observed.

The capacity to sporulate in aerobiosis or anaerobiosis was evaluated by spore counting after heating the cell suspension (Figure 1B). In the presence of oxygen, all the strains

sporulated, with an average of 8×10^8 spores ml^{-1} , corresponding to a sporulation rate of $77 \pm 3.93\%$. Similar results were obtained in CCY sporulation medium, which is frequently used for *Bacillus* sporulation (data not shown). In anaerobiosis, strains displayed lower sporulation ability than in aerobiosis, with an average of 5×10^4 spores ml^{-1} , corresponding to a $0.26 \pm 0.17\%$ sporulation rate. In addition, high heterogeneity among the strains was observed. The highest amount of spores produced was 6.75×10^5 spores ml^{-1} for the strain AH187 and the lowest amount was 2.73×10^1 spores ml^{-1} for the F4430/73 strain. No correlation was noted between sporulation capacity and phylogenetic group. The *B. cereus* AH187 strain was chosen for further characterization of sporulation and spore properties because this strain was the best spore producer in the absence of oxygen among the tested strains.

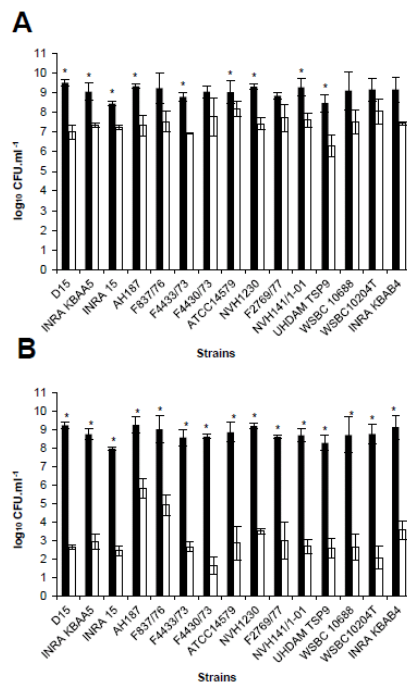


Figure 1: Growth (A) and sporulation (B) of 15 strains of *B. cereus* in MODS medium in aerobiosis and anaerobiosis at 30 °C for strains of groups II, V, VI and at 37 °C for strains of groups III, IV, VII. Number of total cells (A) and total spores (B) (CFU ml^{-1}) in aerobiosis (■) and in anaerobiosis (□). Means labelled with (*) were significantly different at $P < 0.05$ (Student's *t*-test).

4.2. Growth and sporulation of *B. cereus* strain AH187 in controlled batch culture

Aerobic or anaerobic growth of *B. cereus* AH187 was carried out in controlled batch culture with MODS medium at pH 7.2 and temperature 37 °C. In aerobiosis, final biomass

was obtained after 10 h of culture and was about 10^9 CFU ml⁻¹. In anaerobiosis, final biomass was lower than in aerobiosis (10^7 CFU ml⁻¹), and was obtained after 8 h of incubation (Figure 2). Endospore formation and spores released from sporangium (free spores) were followed during the culture by phase contrast microscopic observation and cell counting. The first endospores were observed 10 h after cell inoculation both in the presence and in the absence of oxygen, but were probably not mature because no form of resistance was counted at either time. The first free spores were released 24 h after cell inoculation in both atmospheric conditions (Figure 2). Maximum spore production in aerobiosis was higher than in anaerobiosis. It was about 10^8 spores ml⁻¹ and 10^6 spores ml⁻¹, respectively. Spores were harvested after 5 days in both conditions.

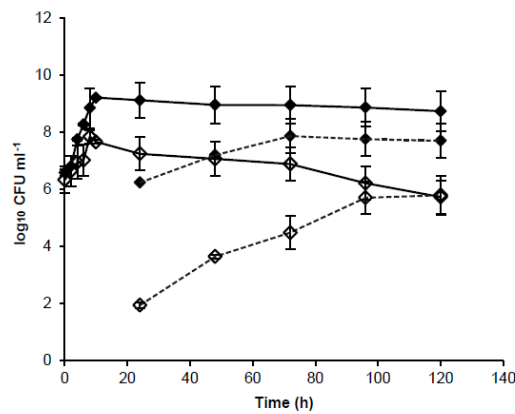


Figure 2: Growth and sporulation of *B. cereus* AH187 in MODS media in anaerobiosis and aerobiosis at 37 °C. Number of total cells (continuous line) and total spores (dashed line) (CFU ml⁻¹) in aerobiosis (filled symbols) and in anaerobiosis (open symbols).

4.3. Spore resistance

4.3.1. Spore wet-heat resistance

Spore wet-heat resistance at 90 °C, 92.5 °C, 95 °C, 97.5 °C and 100 °C was followed for 60-80 min. The mean D_T -values determined for spores produced in the two tested conditions are shown in the Table 2. These results show that the AH187 spores produced in the absence of oxygen were significantly more heat-resistant than those produced in its presence. The most important difference in D value between spores produced in both conditions was at 90 °C where spores obtained in anaerobiosis were highly heat resistant ($D_{90^{\circ}\text{C}} = 81.87 \pm 2$ min)

compared to spore obtained in aerobiosis ($D_{90^{\circ}\text{C}} = 21.09 \pm 1.70$ min). This difference decreased greatly with increasing temperature.

Spores produced in aerobiosis have a z-value of 10.52°C compared with 7.74°C for spores produced in anaerobiosis (Table 2, Figure 3). High determination coefficients (R^2) were obtained for all cases.

Table 2. Mean Dt- values (min) obtained for spores of *B. cereus* AH187 strain in aerobiosis and anaerobiosis

Condition	D_{90}	$D_{92.5}$	D_{95}	$D_{97.5}$	D_{100}	z-Value ($^{\circ}\text{C}$)	Coefficient R^2
Aerobiosis	21.09 ± 1.70	16.85 ± 0.77	11.29 ± 0.14	3.94 ± 0.24	2.83 ± 0.13	10.52	0.932
Anaerobiosis	81.87 ± 2.00	19.68 ± 1.04	18.25 ± 1.79	5.58 ± 0.99	3.76 ± 0.05	7.74	0.932

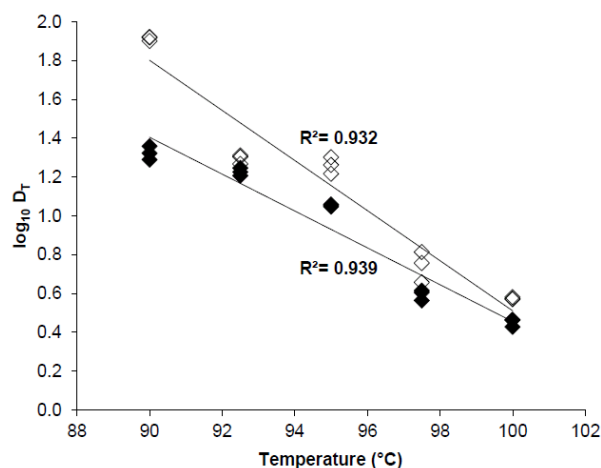


Figure 3: Decimal reduction time curves of *B. cereus* AH 187 strain in aerobiosis (open symbols) and anaerobiosis (filled symbols).

4.3.2. Spore chemicals, acid and alkali resistance

The level of resistance to sodium hydroxide, nitrous acid, hydrogen peroxide and formaldehyde of *B. cereus* AH187 spores produced in anaerobiosis and aerobiosis was determined (Figure 4).

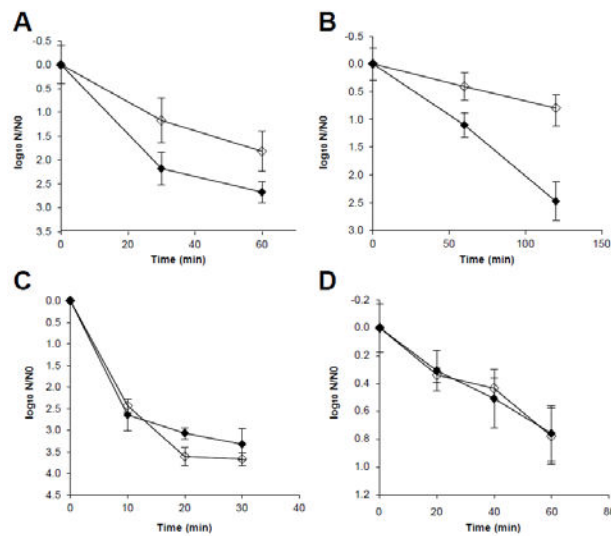


Figure 4: Data points represent the mean of logarithmic reduction of three independent spore suspensions for each condition.

The number of spores surviving after 60 min incubation with NaOH was $2.67 \pm 0.22 \log_{10}$ CFU ml⁻¹ for spores formed under aerobiosis and $1.82 \pm 0.42 \log_{10}$ CFU ml⁻¹ under anaerobiosis (Figure 4A), showing that spores produced under anaerobiosis were significantly more resistant to sodium hydroxide. Spores produced under anaerobiosis were significantly more resistant to nitrous acid, with a reduction of only $0.79 \pm 0.28 \log_{10}$ CFU ml⁻¹ after 120 min incubation, compared with $3.35 \pm 0.35 \log_{10}$ CFU ml⁻¹ for spores produced under aerobiosis (Figure 4B). No significant difference in hydrogen peroxide and formaldehyde resistance was observed between the two conditions of sporulation (Figures 4C and 4D).

4.3.3. Resistance of spores to pulsed light (PL) and UV

Under PL treatment, increasing fluence was followed by a decrease in spore survival in both conditions studied.

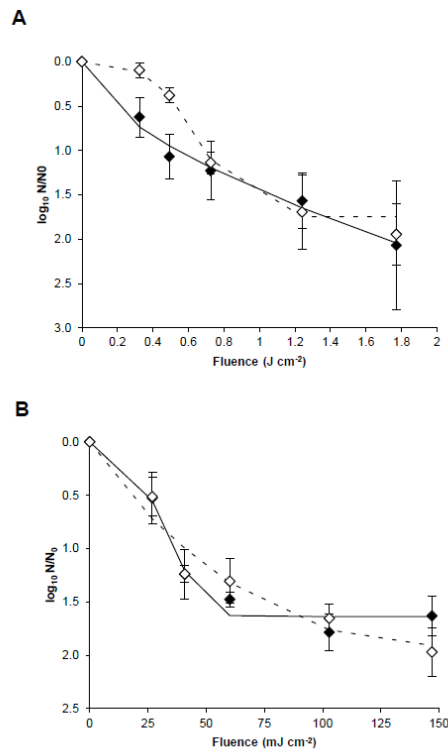


Figure 5: Resistance of *B. cereus* AH187 spores to pulsed light (A) and to UV continuous light (B). Data points represent the mean of logarithmic reduction of three independent spore suspensions prepared in aerobiosis (filled symbols) and anaerobiosis (open symbols). The continuous line and discontinuous line represent the fitting of the experimental data (lozenge forme) to the model of Albert and Mafart (2005) in aerobiosis and anaerobiosis, respectively.

For a fluence of $0.34\ J\ cm^{-2}$, spores produced under anaerobiosis and aerobiosis gave a $0.11 \pm 0.04\ \log_{10}\ CFU\ ml^{-1}$ reduction and a $0.74 \pm 0.26\ \log_{10}\ CFU\ ml^{-1}$ reduction, respectively. For a fluence of $0.49\ J\ cm^{-2}$, a $0.38 \pm 0.05\ \log_{10}\ CFU\ ml^{-1}$ reduction and a $0.95 \pm 0.22\ \log_{10}\ CFU\ ml^{-1}$ reduction were obtained under anaerobiosis and aerobiosis, respectively. These results show that, for these two fluences, spores produced under anaerobiosis were more resistant to PL than those produced under aerobiosis (Figure 5A). No significant difference was observed between the two sporulation conditions for UV-C at 254 nm continuous illumination (Figure 5B).

4.4. Spore germination

B. cereus AH187 spore germination in the presence of inosine or L-alanine was followed by loss of heat resistance of the germinated spores after 3 h of incubation because for L-alanine, spores produced in anaerobiosis do not reach the maximum rate of germination after

60 min of incubation (data not shown). For alanine-induced germination, the maximum germination rate ($94.27 \pm 1.97 \%$) was obtained for a concentration of 10 mM alanine for spores produced in anaerobiosis (Figure 6A).

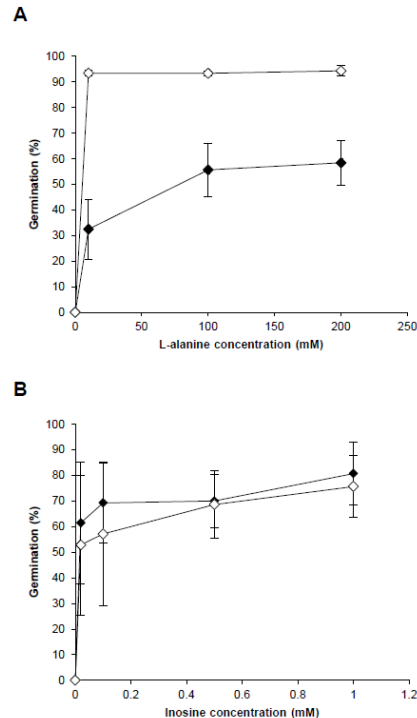


Figure 6: Germination of *B. cereus* AH187 spores formed in aerobiosis (filled symbols) and anaerobiosis (open symbols) in response to L-alanine (A) and inosine (B) after incubation for 3 h at 30 C. The percentage of germination was determined using the formula: $[(N_0 - N)/N_0] \times 100$ as described in Materials and Methods.

The maximum germination ($58.39 \pm 8.57 \%$) was obtained for spores produced in aerobiosis for a concentration of 200 mM alanine (Figure 6A). The greatest difference was obtained with 10 mM of alanine, where the percentage of germination was twice as high for spores produced in anaerobiosis than for spores produced in aerobiosis (Figure 6A). Whatever the alanine concentration, spores produced in anaerobiosis germinated more efficiently than spores produced in aerobiosis. For inosine-induced germination, maximum germination of spores was obtained for a concentration of 1 mM inosine under anaerobiosis and aerobiosis with similar germination rate ($76 \pm 12 \%$ and $84 \pm 12 \%$, respectively). No significant difference in germination was observed between spores produced in anaerobiosis and in aerobiosis at different concentrations of inosine (Figure 6B).

4.5. Spore size, morphology and structure

Microscopic observations were made after negative staining from three independent samples of at least 36 spores for anaerobic and aerobic conditions of the *B. cereus* AH187 strain (Figure 7).

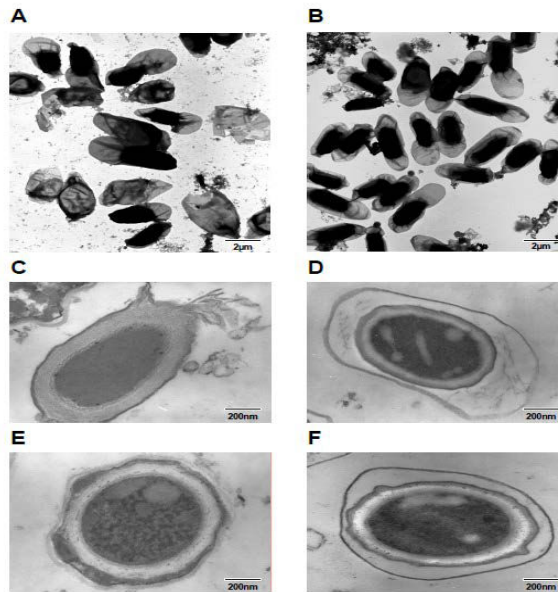


Figure 7: Transmission electron microscopy of *B. cereus* AH187 spores formed in MODS at 37 °C. Negative staining of spores formed in anaerobiosis (A) and aerobiosis (B). Spore sections in anaerobiosis (C, E) and aerobiosis (D, F).

Spores of AH187 strain obtained in anaerobiosis had an average length of 1.92 ± 0.32 µm vs. 1.97 ± 0.23 µm when produced in aerobiosis. The spore width was 0.85 ± 0.44 µm and 0.95 ± 0.11 µm, respectively. Thus lengths and widths of spores produced in anaerobiosis or in aerobiosis showed no significant difference. For spores produced in anaerobiosis, 68 % displayed a damaged exosporium or completely separated exosporium with free exosporium fragments (Figure 7A). Under aerobiosis conditions, only 13 % of spores had a damaged exosporium (Figure 7B). These results were confirmed by spore ultrastructure analyzed on cross-sections (Figures 7C, 7D, 7E, 7F).

4.6. DPA contents

The DPA content was significantly lower in spores produced under aerobic condition ($32.76 \pm 12.05 \mu\text{g}/A_{600}$) than in spores produced under anaerobic condition ($73.31 \pm 18.03 \mu\text{g}/A_{600}$).

5. Discussion

Environmental parameters such as temperature, pH, aeration, minerals and carbon, nitrogen and phosphorus sources are among the major factors influencing the sporulation process (Carlin, 2011). It is known that under aerobic conditions, entry into the stationary phase is caused by progressive nutrient limitation, which finally leads to sporulation in bacilli (Cortezzo and Setlow, 2005; Higgins and Dworkin, 2012). High cell density combined with nutrient depletion is required to trigger sporulation (Grossman, 1995).

Since little information was available on *B. cereus* sporulation in the absence of oxygen, we first optimized an existing medium, MOD, to allow effective growth and sporulation in the absence and presence of oxygen. The chemically defined medium MOD has frequently been used for growth and molecular studies in *B. cereus* species (Duport *et al.*, 2004). This medium supports anaerobic growth of *B. cereus* strains, but was not effective for sporulation (data not shown). Thus, minerals necessary for development of spores into bacilli (Palop *et al.*, 1999) were added to this medium, giving the MODS medium.

The *B. cereus* group consists of seven phylogenetically close species classified into seven phylogenetic groups, each with its own range of growth temperature (Guinebretière *et al.*, 2008; Guinebretière *et al.*, 2013). In our study, the sporulation capacity of 18 *B. cereus* strains belonging to groups II to VI was compared in MODS medium in anaerobic and aerobic conditions. For all tested strains, the lowest spore counts were obtained in anaerobic conditions. This agrees with previous results obtained on several species of the genus *Bacillus* (Couchot and Maier, 1974). In this work, 11 facultatively anaerobic species of the genus *Bacillus* were tested for their ability to sporulate anaerobically on common laboratory media. Results showed that only two species, *B. macerans* and *B. polymyxa*, were able to sporulate in the absence of oxygen. *B. cereus* did not produce spores in this study (Couchot and Maier, 1974). More recent experiments report that under O₂ limitation, spore production of *B. thuringiensis* (a species genetically close to *Bacillus cereus*) was lower than in cultures with

O₂ (Foda *et al.*, 1985; Avignone-Rossa *et al.*, 1992; Finlay *et al.*, 2002). Likewise, Boniolo and coworkers (Boniolo *et al.*, 2012) showed that interrupting the oxygen supply immediately after the end of the exponential growth phase leads to a lower spore production in *B. thuringiensis* var *israelensis* (IP-82). In addition, another study established that carrying out one non-aeration period followed by a moderate oxygenation period during the sporulation phase resulted in higher sporulation of *B. thuringiensis* H14 (Sarrafzadeh and Navarro, 2006). In *B. cereus*, these data mean that once sporulation has been triggered, it will go to completion even if the oxygen supply is interrupted.

Effects of environmental conditions such as temperature, pH, and water activity of the environment on the heat resistance of *Bacillus* spores have been well documented in previous work (Baweja *et al.*, 2008; Carlin, 2011; Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011; Planchon *et al.*, 2011). Overall, spores produced at high temperature, alkaline pH or low water activity are more resistant to wet-heat treatment than those produced at low temperature, acid pH or high water activity (Melly *et al.*, 2002; Leguerinel *et al.*, 2007; Gounina-Allouane *et al.*, 2008; Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011). Data on the effect of anaerobiosis on spore properties of *Bacillus* species are lacking. In our study, we found that spores of *B. cereus* AH187 produced in anaerobiosis condition were more resistant to wet-heat. The most important difference in *D* value (about 61 min) between spores produced in both conditions was obtained at the lowest temperature (90 °C). At greatest temperature (100 °C) the difference in *D* values was lowest (about 1 min). Moreover, the *z*-value for spores produced in anaerobiosis was lower than for spores produced in aerobiosis. Therefore, the effect of anaerobiosis conditions on the wet-heat resistance decrease as the temperature treatment increase. Several reports have identified some factors playing important roles in spore wet-heat resistance. In addition to dehydration in spore cores, these factors include the level of minerals in spore cores, small acid soluble proteins (SASP), dipicolinic acid (DPA) and membrane fluidity in vegetative cells (Nakashio and Gerhardt, 1985; Beaman and Gerhardt, 1986; Marquis and Shin, 1994; Setlow, 1994; Popham *et al.*, 1995; Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011). Our results showed that DPA content was significantly lower in spores produced in aerobiosis than in spores produced in anaerobiosis. This is in agreement with previous studies showing that DPA contribute to lower the spore water content and consequently to increase heat resistance in *B. subtilis* and *B. cereus* (Setlow *et al.*, 2006; Planchon *et al.*, 2011).

In our study, spores obtained in anaerobiosis conditions were more resistant to nitrous acid (0.1 M) and sodium hydroxide (1 M) than those obtained in aerobiosis. No significant

difference was obtained in spore resistance to hydrogen peroxide (5 %), or to formaldehyde (0.25 M). The reason for this could be the presence of the spore coat, which protects spores from some substances such as chlorine dioxide, hypochlorite and hydrogen peroxide (Gould *et al.*, 1963; Riesenman and Nicholson, 2000; Young and Setlow, 2003). In addition, it has been shown that SASPs play an important role in the resistance of spores to DNA-damaging agents (Setlow, 2006).

Spores of *B. cereus* AH187 produced in aerobiosis were more sensitive than those produced in anaerobiosis to UV treatment delivered by pulsed light (for a fluence of 0.34 J cm⁻² and 0.49 J cm⁻²), whereas no significant difference was observed for continuous UV-C at 254 nm between the two sporulation conditions. Pulsed light delivers a broad spectrum of visible and UV light (from 100 to 1100 nm), and this may explain the differences in destruction efficiency compared with monochromatic UV (Planchon *et al.*, 2011). It has been shown that SASPs protect spores against UV radiation by binding to DNA (Setlow, 2006).

B. cereus AH187 spore germination using alanine as inducer showed that spores produced in anaerobiosis germinated more efficiently than those produced in aerobiosis. According to the literature, spore germination is a complex process under the influence of several factors. For example, it has been shown that a low level of DPA in *B. cereus* and *B. subtilis* grown at different temperatures or in medium with various DPA concentrations decreased the capacity of germination (Keynan and Halvorson, 1962; Magge *et al.*, 2008; Planchon *et al.*, 2011). Our results are not in agreement with these studies. In our study, the higher germination rate occurred for spores containing greater DPA concentration. This suggests that other factors are involved in the trigger of germination. In our experimental conditions, the evaluation of spore germination was carried out in atmospheric environment. Therefore, we can hypothesis that oxygen is an important factor in this process.

In addition, previous studies showed that the expression of genes encoding germination proteins was better in Y1 medium, a nutrient-rich, chemically defined sporulation medium, than in modified G medium, containing low amounts of nutrients. The expression of these genes is under the influence of the composition of growth media (Hornstra *et al.*, 2006). The reason for a better germination in anaerobiosis in our study is unknown. It might be attributable to some genes encoding lytic enzymes and/or some other proteins such as the Ger family proteins or those from the exosporium. Interestingly, our study shows that the germination process was better for spores that had lost their exosporium, or spores with a damaged exosporium (anaerobic condition). This suggests an important role of exosporium in

the germination process. Severson and co-workers showed that a protein from exosporium (ExsK) played a role in *B. anthracis* germination. In this study, it was shown that (i) a Δ ExsK mutant spores germinated to a significantly greater extent than did wild type spores, and (ii) no difference in structural exosporium was observed between Δ ExsK mutant and wild type. The authors suggest that ExsK protein directly or indirectly inhibits germination in response to several germinants (Severson *et al.*, 2009). However, exosporium is composed of approximately 20 proteins, of which few have been characterized. In addition, the role of the exosporium proteins is complex and not clearly elucidated. For inosine-induced germination, maximum germination of spores was obtained for a concentration of 1 mM inosine under anaerobiosis and aerobiosis with similar germination rate. As previously described, inosine was an efficient germinant for *B. cereus* strains, particularly at the highest concentrations (1 mM) (Clements and Moir, 1998; Broussolle *et al.*, 2008). This is in agreement with our results. Indeed, the extent of germination was better with increasing concentration of inosine, as reported by Collado and its collaborators (Collado *et al.*, 2006).

Microscopy has shown that under aerobic condition, only few spores had a damaged or detached exosporium. Previous work showed that the frequency with which spores of *B. cereus* with damaged exosporium were obtained increased when sporulation occurred under less favorable conditions, such as high temperature (Faille *et al.*, 2007). Differences in spore heat resistance, chemical resistance and germination between anaerobic and aerobic conditions suggest a difference in spore structure. However, our results show that spore size (width and lengths) produced in both atmospheric conditions did not vary significantly. Other studies show that environmental parameters such as high and low humidity, and calcium deficiency, affect swell and shrink of spores of *B. thuringiensis* (Westphal *et al.*, 2003, Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011). Our study reports an effect of anaerobiosis on the structure of *B. cereus* AH187 as visualized by transmission electron microscopy. It can be hypothesized that anaerobiosis is an unfavorable condition, as discussed above, resulting in spores with damaged exosporium.

In conclusion, this work provides new knowledge on the effect of anaerobiosis on spore properties such as resistance, germination and structure in *B. cereus* species. Our study revealed a strong decrease in sporulation rate in the absence of oxygen in *B. cereus* species. One practically important finding is the higher resistance to wet-heat of spores produced anaerobically compared with those produced aerobically. This observation is relevant to food products conserved in anaerobiosis for long periods at refrigerated temperatures, given that

B. cereus is a food spoilage organism and a foodborne pathogen. Further investigation is needed to determine which sporulation genes are affected during the sporulation process in anaerobiosis.

Acknowledgements

Amina Aicha Abbas received a fellowship from the Programme Intergouvernemental Franco-Algérien. This work was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche under the project Food-Redox, ANR-11-ALID-001-04.

We thank Dr Frédéric Carlin and Dr Véronique Broussolle for helpful discussion (INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon).

We thanks Isabelle Bornard for the microscopic imaging (INRA, *Unité de Pathologie Végétale, Laboratoire de microscopie, F-84143 Montfavet*), Sabine Mallea and Gérémy Clair for technical assistance and support (INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon).

References

- Albert, I., Mafart, P., 2005.** A modified Weibull model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology* 100, 197-211.
- Andersson, A., Rönner, U., 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, 145-155.
- Avignone-Rossa, C., Arcas, J., Mignone, C., 1992.** *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and δ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 301-304.
- Baweja, R.B., Zaman, M.S., Mattoo, A.R., Sharma, K., Tripathi, V., Aggarwal, A., Dubey, G.P., Kurupati, R.K., Ganguli, M., Chaudhury, N.K., Sen, S., Das, T.K., Gade, W.N., Singh, Y., 2008.** Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. *Arch. Microbiol.* 189, 71-79.
- Beaman, T.C., Gerhardt, P., 1986.** Heat-resistance of bacterial-spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 1242-1246.

- Boniolo, F., Rodrigues, R., Prata, A., López, M., Jacinto, T., Silveira, M., Berbert-Molina, M., 2012.** Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and δ -endotoxin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 625-636.
- Broussolle, V., Gaillard, F., Nguyen-The, C., Carlin, F., 2008.** Diversity of spore germination in response to inosine and L-alanine and its interaction with NaCl and pH in the *Bacillus cereus* group. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1081-1090.
- Carlin, F., 2011.** Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiol.* 28, 177-182.
- Cazemier, A.E., Wagenaars, S.F.M., TerSteege, P.F., 2001.** Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *J. Appl. Microbiol.* 90, 761-770.
- Ceuppens, S., Boon, N., Uyttendaele, M., 2013.** Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 84, 433-450.
- Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C., Schmitt, P., 2004.** Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J. Appl. Microbiol.* 97, 214-219.
- Clements, M.O., Moir, A., 1998.** Role of the *gerI* operon of *Bacillus cereus* 569 in the response of spores to germinants. *J. Bacteriol.* 180, 6729-6735.
- Collado, J., Fernandez, A., Rodrigo, M., Martinez, A., 2006.** Modelling the effect of a heat shock and germinant concentration on spore germination of a wild strain of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 85-89.
- Cortezzo, D.E., Setlow, P., 2005.** Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 98, 606-617.
- Couchot, K.R., Maier, S., 1974.** Anaerobic sporulation in facultatively anaerobic species of the genus *Bacillus*. *Can. J. Microbiol.* 20, 1291-1296.
- de Vries, Y.P., Atmadja, R.D., Hornstra, L.M., de Vos, W.M., Abee, T., 2005.** Influence of glutamate on growth, sporulation, and spore properties of *Bacillus cereus* ATCC 14579 in defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3248-3254.
- Duport, C., Thomassin, S., Bourel, G., Schmitt, P., 2004.** Anaerobiosis and low specific growth rates enhance hemolysin BL production by *Bacillus cereus* F4430/73. *Arch. Microbiol.* 182, 90-95.

- Faille, C., Tauveron, G., Gentil-Lelievre, C.L., Slomianny, C., 2007.** Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *J. Food Prot.* 70, 2346-2353.
- Finlay, W.J.J., Logan, N.A., Sutherland, A.D., 2002.** *Bacillus cereus* emetic toxin production in relation to dissolved oxygen tension and sporulation. *Food Microbiol.* 19, 423-430.
- Foda, M., Salama, H., Selom, M., 1985.** Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 50-52.
- Glatz, B.A., Goepfert, J.M., 1977.** Production of *Bacillus cereus* endotoxin in defined media in fermenter-grown cultures. *J. Food Prot.* 40, 472-474.
- Gould, G.W., Hitchins, A.D., 1963.** Sensibilization of bacterial spores to lysozyme and to hydrogen peroxide with agents which rupture disulphide bonds. *J. Gen. microbial.* 33, 413-423.
- Gounina-Allouane, R., Broussolle, V., Carlin, F., 2008.** Influence of the sporulation temperature on the impact of the nutrients inosine and L-alanine on *Bacillus cereus* spore germination. *Food Microbiol.* 25, 544-544.
- Grossman, A.D., 1995.** Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* 29, 477-508.
- Guinebretiere, M.H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., De Vos, P., 2008.** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ. Microbiol.* 10, 851-865.
- Guinebretiere, 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., Sorokin, A., 2013.** *Bacillus cytotoxicus* sp nov is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 63, 31-40.
- Higgins, D., Dworkin, J., 2012.** Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 131-148.
- Hornstra, L.M., de Vries, Y.P., de Vos, W.M., Abee, T., 2006.** Influence of sporulation medium composition on transcription of ger operons and the germination response of spores of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3746-3749.
- Keynan, A., Halvorson, H.O., 1962.** Calcium dipicolinic acid-induced germination of *Bacillus cereus* spores. *J. Bacteriol.* 83, 100-105.

- Leguerinel, I., Couvert, O., Mafart, P., 2007.** Modelling the influence of the sporulation temperature upon the bacterial spore heat resistance, application to heating process calculation. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 100-104.
- Loshon, C.A., Fliss, E.R., Setlow, B., Foerster, H.F., Setlow, P., 1986.** Cloning and nucleotide sequencing of genes for small, acid-soluble spore proteins of *Bacillus cereus*, *Bacillus stearothermophilus*, and *Thermoactinomyces thalpophilus*. *J. Bacteriol.* 167, 168-173.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I., 2002.** On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int. J. Food Microbiol.* 72, 107-113.
- Magge, A., Granger, A.C., Wahome, P.G., Setlow, B., Vepachedu, V.R., Loshon, C.A., Peng, L., Chen, D., Li, Y.-q., Setlow, P., 2008.** Role of dipicolinic acid in the germination, stability, and viability of spores of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 190, 4798-4807.
- Margulis, L., Jorgensen, J.Z., Dolan, S., Kolchinsky, R., Rainey, F.A., Lo, S.C., 1998.** The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 1236-1241.
- Marquis, R.E., Shin, S.Y., 1994.** Mineralization and responses of bacterial spores to heat and oxydative agents. *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 375-379.
- McKenney, P.T., Driks, A., Eichenberger, P., 2013.** The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 33-44.
- Melly, E., Genest, P.C., Gilmore, M.E., Little, S., Popham, D.L., Driks, A., Setlow, P., 2002.** Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *J. Appl. Microbiol.* 92, 1105-1115.
- Moir, A., Corfe, B.M., Behravan, J., 2002.** Spore germination. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 403-409.
- Nakashio, S., Gerhardt, P., 1985.** Protoplast dehydration correlated with heat-resistance of bacterial-spores. *J. Bacteriol.* 162, 571-578.
- Nguyen Thi Minh, H., Perrier-Cornet, J.M., Gervais, P., 2008.** Effect of the osmotic conditions during sporulation on the subsequent resistance of bacterial spores. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 107-114.
- Nguyen Thi Minh, H., Durand, A., Loison, P., Perrier-Cornet, J.-M., Gervais, P., 2011.** Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1409-1417.

- Nicholson, W.L., 2002.** Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 410-416.
- Palop, A., Sala, F.J., Condon, S., 1999.** Heat resistance of native and demineralized spores of *Bacillus subtilis* sporulated at different temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1316-1319.
- Paredes, C.J., Alsaker, K.V., Papoutsakis, E.T., 2005.** A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 969-978.
- Paredes-Sabja, D., Setlow, P., Sarker, M.R., 2011.** Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved. *Trends Microbiol.* 19, 85-94.
- Perez Portuondo, I., 2012.** *Bacillus cereus* and food poisoning. *Bacillus cereus* y su papel en las intoxicaciones alimentarias. *Revista Cubana de Salud Publica* 38, 98-108.
- Planchon, S., Dargaignaratz, C., Levy, C., Ginies, C., Broussolle, V., Carlin, F., 2011.** Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 degrees C and 30 degrees C display variations in their properties. *Food Microbiol.* 28, 291-297.
- Popham, D.L., Sengupta, S., Setlow, P., 1995.** Heat, hydrogen peroxide and UV resistance of *Bacillus subtilis* spores with increased core water content and with or without major DNA-binding proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3633-3638.
- Riesenman, P.J., Nicholson, W.L., 2000.** Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 620-626.
- Rose, R., Setlow, B., Monroe, A., Mallozzi, M., Driks, A., Setlow, P., 2007.** Comparison of the properties of *Bacillus subtilis* spores made in liquid or on agar plates. *J. Appl. Microbiol.* 103, 691-699.
- Rotman, Y., Fields, M.L., 1967.** A modified reagent for dipicolinic acid analysis. *Anal. Biochem.* 22, 168-169.
- Sarrafzadeh, M.H., Navarro J.M., 2006.** The effect of oxygen on the sporulation, δ -endotoxin synthesis and toxicity of *Bacillus thuringiensis* H14. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 305-310.
- Setlow, P., 1994.** Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. *Appl. Bacteriol.* 76, S49-S60.
- Setlow, B., Loshon, C.A., Genest, P.C., Cowan, A.E., Setlow, C., Setlow, P., 2002.** Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. *J. Appl. Microbiol.* 92, 362-375.
- Setlow, P., 2003.** Spore germination. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 550-556.

- Setlow, P., 2006.** Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. J. Appl. Microbiol. 101, 514-525.
- Setlow, P., Johnson, E.A., 2007.** Spores and Their Significance. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R.(Eds.), Food Microbiol. Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington DC, pp. 35-68.
- Severson, K.M., Mallozzi, M., Bozue, J., Welkos, S.L., Cote, C.K., Knight, K.L., Driks, A., 2009.** Roles of the *Bacillus anthracis* Spore Protein ExsK in Exosporium Maturation and Germination. J. Bacteriol. 191, 7587-7596.
- Tam, N.K.M., Uyen, N.Q., Hong, H.A., Duc, L.H., Hoa, T.T., Serra, C.R., Henriques, A.O., Cutting, S.M., 2006.** The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. J. Bacteriol. 188, 2692-2700.
- van der Voort, M., Garcia, D., Moezelaar, R., Abee, T., 2010.** Germinant receptor diversity and germination responses of four strains of the *Bacillus cereus* group. Int. J. Food Microbiol. 139, 108-115.
- van der Voort, M., Abee, T., 2013.** Sporulation environment of emetic toxin-producing *Bacillus cereus* strains determines spore size, heat resistance and germination capacity. J. Appl. Microbiol. 114, 1201-1210.
- Westphal, A.J., Price, P.B., Leighton, T.J., Wheeler, K.E., 2003.** Kinetics of size changes of individual *Bacillus thuringiensis* spores in response to changes in relative humidity. P. Natl. Acad. Sci. USA. 100, 3461-3466.
- Young, S.B., Setlow, P., 2003.** Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. J. Appl. Microbiol. 95, 54-67.

PARTIE 3

Mesure de l'expression des gènes de sporulation en anaérobiose

ARTICLE 3

Expression des gènes de l'initiation de la sporulation en anaérobiose par rapport à l'aérobiose

1. Problématique

Les mécanismes de la sporulation comptent environ 170 gènes dont les principaux sont les gènes *spo* ainsi que les facteurs sigma.

L'entrée en sporulation est un mécanisme contrôlé par un phosphorelais impliquant au moins : (i) cinq histidines kinases (KinA, KinB, KinC, KinD et kinE) dont KinA décrite comme ayant le principal rôle, (ii) deux phosphotransférases (Spo0F et Spo0B) et (iii) un régulateur majeur de la transcription, Spo0A. Ce phosphorelais doit activer le régulateur majeur Spo0A par phosphorylation afin de permettre l'entrée en sporulation.

En réponse à une carence nutritionnelle, les histidines kinases se phosphorylent, puis, transfèrent leur résidu phosphate à Spo0F, qui à son tour le transfère à Spo0B. Enfin, le résidu phosphate est transféré à Spo0A, le rendant ainsi actif. L'activation de Spo0A est donc primordiale pour l'initiation de la sporulation.

Tous ces facteurs ainsi que leur activation ont été mis en évidence dans des conditions d'aérobiose chez les Bacilli. Ces mécanismes sont bien conservés entre les bactéries sporulées aérobies et anaérobies. Puisque l'étude de la capacité de sporulation des 18 souches de *B. cereus* dans le milieu MODS a montré une faible sporulation en anaérobiose en comparaison à la condition aérobie, nous avons voulu étudier les niveaux d'expression des gènes de sporulation en anaérobiose par rapport à l'aérobiose.

2. Objectif

L'objectif de ce travail était de comparer les niveaux d'expressions d'un certain nombre de gènes afin de mieux comprendre cette différence de capacité de sporulation entre les conditions d'aérobiose et anaérobiose.

3. Stratégie et principaux résultats

Dans un premier temps, des expériences de RT-PCR quantitatives ont été réalisées afin de déterminer les niveaux d'expression des gènes *kinA*, *kinB*, *spo0F*, *spo0B* et *spo0A* impliqués dans la cascade de phosphorylation initiant la sporulation. Les prélèvements d'ARN ont été réalisés en cultures contrôlées à différents temps de croissance.

Les résultats de ces expériences ont montré que les différentielles d'expression des gènes *kinA*, *spo0F*, *spo0B* et *spo0A* avaient la même cinétique avec une surexpression en début et en fin de croissance en anaérobiose par rapport à l'aérobiose.

Au cours de la croissance, le gène *kinA* est sous exprimé alors que les gènes *spo* ne présentaient aucune différence d'expression en anaérobiose par rapport à l'aérobiose.

Nos résultats ont également montré que les gènes *kinB* (*kinB₁*, *kinB₂*, *kinB₃*) avaient une tendance d'expression inverse à celle des gènes précédents. Ils ne présentaient pas de différence d'expression en anaérobiose comparé à l'aérobiose en début (2 h) et en fin (9 h) de croissance.

Les gènes *spo0A*, *spo0B*, *spo0F*, *kinA* et *kinB* sont exprimés différemment entre l'aérobiose et l'anaérobiose. **Ceci pourrait nous aider à comprendre la différence observée dans la capacité de sporulation des souches de *B. cereus* entre les deux conditions testées.**

Article 3: Temporal expression of genes for initiation of the sporulation in anaerobiosis condition for a *Bacillus cereus* AH187 strain responsible for diarrheic syndrome

Amina Aicha Abbas^{a,b}, Stella Planchon^{a,b,†}, Michel Jobin^{a,b} and Philippe Schmitt^{a,b}

^a INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon.

^b Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon.

[†] present address: CTCPA - UMT Qualiveg. Site Agroparc, 449 avenue Clément Ader, ZA de l'Aéroport - BP21203, 84911 Avignon Cedex 9.

Article en cours de finalisation

1. Abstract

Growth and sporulation of *Bacillus cereus* AH 187 strain was performed in aerobic and anaerobic controlled batch cultures in the chemically defined medium MODS developed in our laboratory. Real-time reverse transcription-PCR was used to study the difference of expression between anaerobiosis and aerobiosis of the sporulation initiation genes: *spo0A*, *spo0B*, *spo0F*, *kinA* and *kinB*. Results showed that the differential expression kinetics of genes: *spo0A*, *spo0B*, *spo0F* and *kinA* had the same trend. They were characterized by a higher expression in anaerobiosis compared to aerobiosis at the beginning and the end of exponential growth phase. Furthermore, *kinB* gene expression was characterized by an increase in anaerobiosis compared to aerobiosis to achieve a peak between 4 and 6 hours of growth.

Keywords: *B. cereus*, anaerobiosis, sporulation genes, real-time reverse transcription-PCR.

2. Introduction

Bacillus cereus is a Gram-positive, facultative anaerobic, rod-shaped bacterium able to produce endospores. *B. cereus* is an ubiquitous bacterium that can be isolated from a wide variety of environments (soil, contaminated raw and processed food) (Kotiranta *et al.*, 2000; Moir *et al.*, 2002; Setlow *et al.*, 2003; Setlow and Johnson, 2007). It causes two types of food poisoning syndromes named emetic and diarrheal depending on cereulide and enterotoxin production, respectively (Carlin *et al.*, 2000; Ceuppens *et al.*, 2013; Ehling-Schulz *et al.*,

2004). Under environmental stress conditions such as starvation, *B. cereus* produces spores able to survive to treatments such as heat, chemicals, UV and acidity (Clavel *et al.*, 2004; Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011; Setlow, 2006; Tam *et al.*, 2006).

Morphological stages of sporulation are similar in all species of the genera *Bacillus* and *Clostridium* (Hilbert and Piggot, 2004). These stages proceed through about 8 to 10 h and result in the formation of a highly resistant spore (de Hoon *et al.*, 2010). The mechanisms and genetic regulation of sporulation were mainly studied in *Bacillus subtilis* spore forming model bacterium. About 170 genes have been described as involved in sporulation; some of them, such as the sigma factors (called *sig*) and sporulation genes (called *spo*) play important roles during sporulation. Entry into sporulation at the end of exponential growth phase is controlled by the phosphorelay signal transduction system. This phosphorelay involves at least five sporulation histidine kinases : KinA, KinB, KinC, KinD and KinE, with KinA and KinB being the primary kinases for initiation of sporulation (Hilbert and Piggot, 2004), two additional phosphotransferases (Spo0F and Spo0B) and Spo0A which is the master regulator (Eswaramoorthy *et al.*, 2010; Fujita and Losick, 2005). The goal of the phosphorelay is to activate the master regulator Spo0A by phosphorylation (Fujita and Losick, 2005).

In response to nutrient depletion, the histidine kinases phosphorylate themselves, and then, transfer this phosphate residue to Spo0F. The resulting Spo0F~P, transfers its phosphoryl group to Spo0B. Finally, the phosphate residue is transferred from Spo0B~P to Spo0A, thereby activating it (Fujita and Losick, 2005; Kobayashi *et al.*, 2008). Phosphorylation of Spo0A, on an aspartyl residue located in the N-terminal portion on the protein, induces a change in the transcription of more than 500 genes, including at least 121 direct target genes (de Hoon *et al.*, 2010). These genes include those that encoded the early compartmentalized sigma factors, σ^F and σ^E , as well as their regulators (Hilbert and Piggot, 2004).

In the *B. cereus* group, most of the studies on sporulation, spores properties, mechanisms of sporulation and expression of genes involved in sporulation were performed in presence of oxygen. Few studies on the sporulation in absence of oxygen have been published. Our previous study showed that in anaerobiosis, *B. cereus* strains displayed lower sporulation ability than in aerobiosis, with an average of $0.26 \% \pm 0.17$ against $77 \% \pm 3.93$ in aerobiosis (Abbas *et al.*, 2014). In order to explain the difference in sporulation capacity between the aerobic and anaerobic conditions, we first compared aerobic and anaerobic growth of the *B. cereus* AH 187 strain in the MODS medium that we optimized. Then, we monitored the

expression of five genes (*spo0A*, *spo0B*, *spo0F*, *kinA*, *kinB*) coding proteins that are involved on the phosphorelay for the sporulation initiation.

3. Material and Methods

3.1. Bacterial strain and media

The *B. cereus* AH 187 strain, responsible for diarrheic syndrome, was selected in this study. This strain belongs to the phylogenetic group III defined by Guinebretière *et al.* (2008). All the experiments were conducted in the chemically defined medium MODS previously described by Abbas *et al.* (2014). The pH of MODS was adjusted to pH 7.2 with KOH. After sterilization, MODS was supplemented with 10 mM glucose as a fermentative carbon source.

3.2. Controlled batch cultures

Controlled batch cultures were performed to study gene expression by real-time RT-PCR. *B. cereus* AH 187 cells from overnight cultures in MOD medium, were centrifuged at 7,000g for 5 min at room temperature, washed twice and resuspended in MODS medium. A 2 L bioreactor (Inceltech Discovery 100 (Toulouse, France) containing 1.3 L of MODS medium was inoculated at an initial A_{600} value of 0.05 in MODS with this suspension. Temperature was regulated at 37 °C. For aerobic conditions, agitation was adjusted to maintain the partial pressure of oxygen (pO_2) above 60 %. Bioreactors were kept under airflow to obtain aerobiosis, or nitrogen flow to obtain anaerobiosis. The pH was regulated at 7.2 by adding 2 M KOH or 2 M HCl. The regulated batch was equipped with a polarographic oxygen electrode (Mettler Toledo) calibrated in a medium flushed with air (100 % value) or pure N₂ (0 % value). Each condition was used for three independent experiments.

3.3. Growth parameters

Growth was monitored using a spectrophotometer (Helios Epsilon; Thermo Scientific, Rockford, IL). The A_{600} values were plotted over time and fitted with the modified Gompertz equation (Zwietering *et al.*, 1990) to calculate the maximal specific growth rate (μ_{max}) and maximal absorbance.

3.4. Cell and spore counts

To monitor the growth and sporulation of the AH 187 strain, the concentration of vegetative cells and spores was determined after heating at 70 °C for 10 min to kill any vegetative cells, respectively. Serial decimal dilutions of cultures were performed in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0. An aliquot of 100 µl of each dilution was plated on LB-agar medium and incubated at 30 °C for 24 h. Cells and spores concentration was expressed as colony-forming units per ml (spores ml⁻¹).

3.5. RNA isolation and real-time RT-PCR

To investigate the expression of genes involved in sporulation initiation (*spo0A*, *spo0B*, *spo0F*, *kinA* and *kinB*), reverse transcription-PCR (RT-PCR) was performed. Total RNA was isolated from three independent cultures of *B. cereus* AH 187 strain grown in presence and absence of oxygen, in controlled batch culture. Six total RNA samples were extracted using TRI Reagent RNA extraction solution as recommended by the manufacturer (Ambion, Huntingdon, United Kingdom). Extraction was performed for each of the two tested conditions at different stages of growth: Early exponential phase (S₁), Middle exponential phase (S₂), late exponential phase (S₃), Early stationary phase (S₄) and Late stationary phase (S₅, S₆) (Figure 1). Real-time RT-PCR was performed using SYBR green technology in a light cycler instrument (Step one plus real time PCR system) as previously described by Brillard and coworkers (Brillard *et al.*, 2010). Briefly, the QuantiFast SYBR green RT-PCR kit was used according to the instructions of the manufacturer (Applied biosystem) with 2.5 ng µl⁻¹ of total RNA as a template. The mRNA level changes for each gene were normalized with the RNA level of the *ssu* gene, encoding 16S RNA, and quantified by the 2^{-ΔΔCt} method as previously described by Pfaffl (2001) (Pfaffl, 2001). The various oligonucleotides primer sets are shown in Table 1.

Table1: Sequences of primers used for the measurement of gene expression of the initiation of sporulation by q-RT-PCR.

Primers	Sequences (5'-3')
Spo0A	F-GCGCCATATTGAAAGGTTAAGAC
Spo0A	R-CGGTTTTCCATCTACTGTTGTTG
Spo0B	F-GAAACAGCAGCCGTGCTTAT
Spo0B	R-TTCGCAAGCCAATTCTGTAG
Spo0F	F-CCAAGCAGCGAATGGATTTCAAGC
Spo0F	R-ACAGCGAGTTCATTTCTCACCGC
kinA	F-ACGGAAGCGGATAATCAACA
kinA	R-AACGCAGGCATGGAGTTTAC
kinB1	F-TATCGCGGGAGAAAAACAAA
kinB1	R-ACGACCATCATTCCAAGACC
kinB2	F-ATGCCTCCGAAGCCGAACCG
kinB2	R-ACCCGCAAACGTCCCCAAAACA
kinB3	F-CGCCCAAGGAATTATTGATG
kinB3	R-AGTACCGCCATTAGGCATTG

4. Results and discussion

4.1. Kinetics of the growth of *B. cereus* strain AH187 in MODS medium

Aerobic and anaerobic growth of *B. cereus* AH 187 were carried out in controlled batch culture in MODS medium at pH 7.2 and 37 °C. The purpose of controlled batch culture is to produce synchronized and homogeneous *B. cereus* spores which facilitate gene-expression studies (de Vries *et al.*, 2004).

Maximal A_{600} was significantly lower in anaerobiosis compared to aerobiosis (Figure 1A). In aerobiosis, the final A_{600} was obtained after 10 h of culture and was about 3.78 ± 0.49 compared to 0.28 ± 0.02 in anaerobiosis (Figure 1A). To compare directly the gene expression between these two conditions, we compared the evolution of gene expression during the different phases of growth. The first step was to determine the growth characteristics of *B. cereus* in the chemical defined MODS medium.

Four different stages in the growth were determined: a lag phase (phase I), an exponential phase (phase II), an early stationary phase (phase III) and a late stationary phase (phase IV) (Figure 1A). In order to perform the different sampling, the A_{600} values were plotted over time and fitted with the modified Gompertz equation (Zwietering *et al.*, 1990) to calculate the maximal specific growth rate (μ_{\max}). The ratio μ/μ_{\max} was calculated thereby to determine the similar phases during aerobic and anaerobic growth (Figure 1B).

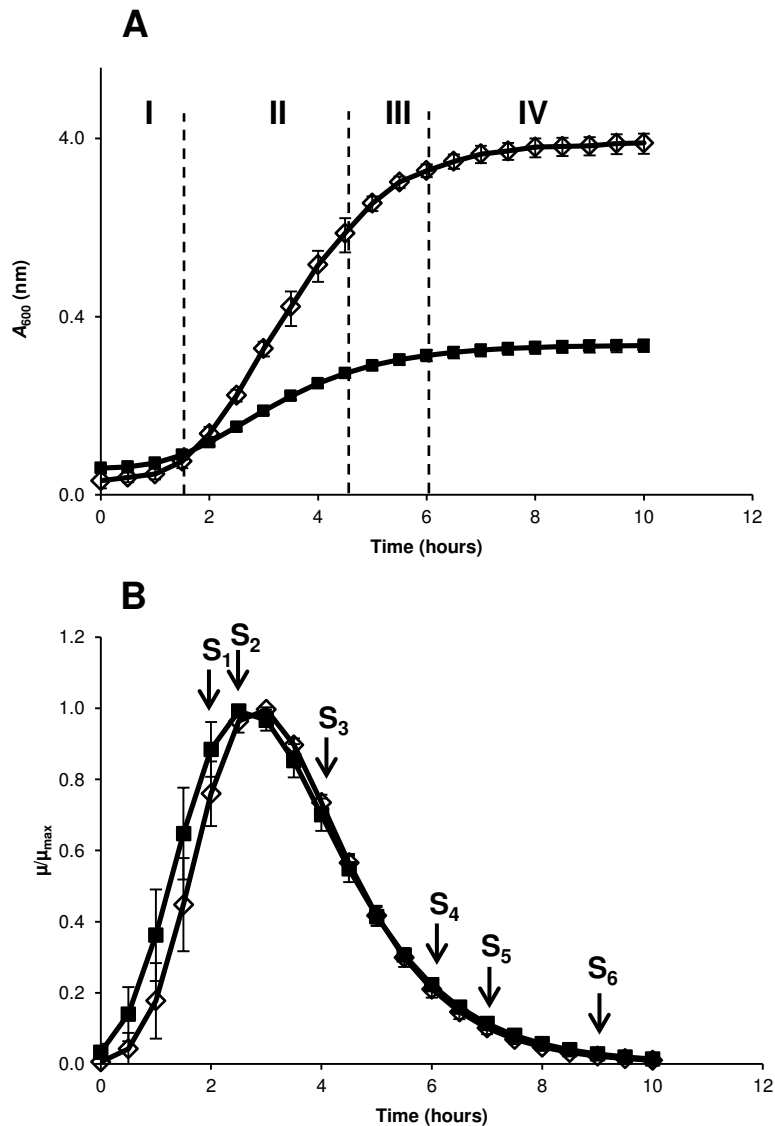


Figure 1: (A) Growth of *B. cereus* AH187 strain in MODS medium in aerobiosis (open symbols) and in anaerobiosis (close symbols). (B): Corresponding ratio μ/μ_{max} in aerobiosis (open symbols) and anaerobiosis (close symbols). S₁ to S₆ correspond to the sampling points for total RNA extraction.

4.2. Sporulation gene expression

The entry into the sporulation pathway is governed by a member of the response regulator family of transcription factors known as Spo0A (Fujita and Losick, 2005; Hoch, 1993). It is activated by a phosphorelay involving histidine kinases such as KinA, KinB and other sporulation factors such as Spo0F and Spo0B (Fujita and Losick, 2005; Hilbert and Piggot, 2004; Paredes *et al.*, 2005). Abbas and coworkers showed that in anaerobiosis, the ability of *B. cereus* to sporulate was lower than in aerobiosis (Abbas *et al.*, 2014). To try to explain this

difference, the evolution of expression through time of *spo0A*, *spo0B*, *spo0F*, *kinA* and *kinB* genes was measured during the various growth phases of *B. cereus* AH 187 in anaerobic and aerobic conditions (Figure 2). Then, we compared difference of gene expressions between anaerobic and aerobic conditions (Figure 3).

4.2.1. Kinetics of gene expression in aerobiosis and anaerobiosis

To monitor the evolution during growth of sporulation gene expression, we compared the different sampling points with the first sampling point S₁ (Figure 2).

Our results showed that *spo* genes (*spo0A*, *spo0B* and *spo0F*) had a similar evolution of expression in aerobiosis and anaerobiosis.

In aerobiosis, the exponential phase II (S₂) was characterized by a low expression of *spo* genes compared to early exponential phase (S₁). The expression of *spo0A*, *spo0B* and *spo0F* was 10, 100 and 30-fold lower, respectively. Thereafter, *spo* genes expression increased gradually to reach a peak at the end of phase III (S₄) corresponding to the early stationary phase. The expression of *spo0A*, *spo0B* and *spo0F* genes was 18, 2 and 11-fold higher, respectively, in S₄ phase. The high expression of *spo* genes when cells entered in stationary growth phase supports their contribution in the sporulation initiation process. Finally, *spo* genes expression decreased in the phase IV (S₅, S₆) corresponding to the sporulation phase (Figure 2A). In *B. subtilis*, genomic analysis indicated that 120 genes are under the direct control of Spo0A and a further 400 genes are indirectly controlled by Spo0A (Molle *et al.*, 2003; Piggot and Hilbert, 2004). This transcriptional control depends of the Spo0A~P dose. On this principle, there are two categories of genes: those that are activated or repressed at a low dose of Spo0A~P (low-threshold genes) and those that require a high dose of Spo0A~P to be regulated (high-threshold genes) (Fujita and Losick, 2005). Genes that are directly involved in sporulation generally fall in the high-threshold category, whereas genes that are involved in auxiliary processes, such as cannibalism (Gonzalez-Pastor *et al.*, 2003) and fruiting body formation (Branda *et al.*, 2001) largely fall in the low-threshold category (Fujita and Losick, 2005). Therefore, this could explain the high expression of the *spo* genes (*spo0A*, *spo0B* and *spo0F*) in early sporulation phase and their low expression during growth of *B. cereus* AH187.

In anaerobiosis, we observed the same evolution of the *spo* genes. Expression of *spo* genes was stable in the early phase II (S₂) and gradually increased from the middle of phase II (S₃) to the end of the phase III (S₄). In the early stationary phase (S₄) expression was 13 and 3-fold higher for *spo0A* and *spo0F*, respectively while *spo0B* expression remained stable. Phase IV (S₅ and S₆) was characterized by a quite stable *spo* genes expression (Figure 2 C).

Concerning *kin* genes, our results showed that their kinetics of expression was different in aerobiosis and anaerobiosis.

In aerobiosis, early phase II (S₂) was characterized by low expression of *kinA*, *kinB₃* and *kinB₁* genes. Their expression was 50, 20 and 3-fold lower, respectively. *kin B₂* was 2-fold higher. Expression of *kinA* highly increased to stabilize between the middle phase II (S₃) and the end of phase III (S₄) (8 and 9-fold higher, respectively). Phase IV was characterized by stabilization of *kinA* expression (S₅, S₆). These data support that KinA participates in the sporulation initiation. *kinB₁* and *kinB₃* genes presented the same expression evolution but at different levels. They were weakly expressed in the early phase II (S₂) until the phase III (S₄) and then stabilized in the phase IV (S₅ and S₆). *kinB₂* expression reached a peak in the phase II (S₃) and in the phase IV (S₅) (Figure 2B).

In anaerobiosis, *kinA*, *kinB₁* and *kinB₂* were relatively stable through the growth phases. *KinB₃* is weakly expressed in the phase II (S₂ and S₃) until the phase III (S₄). In the phase IV, its expression increased in the early phase (S₅), then decreased at the end (S₆) (Figure 2D).

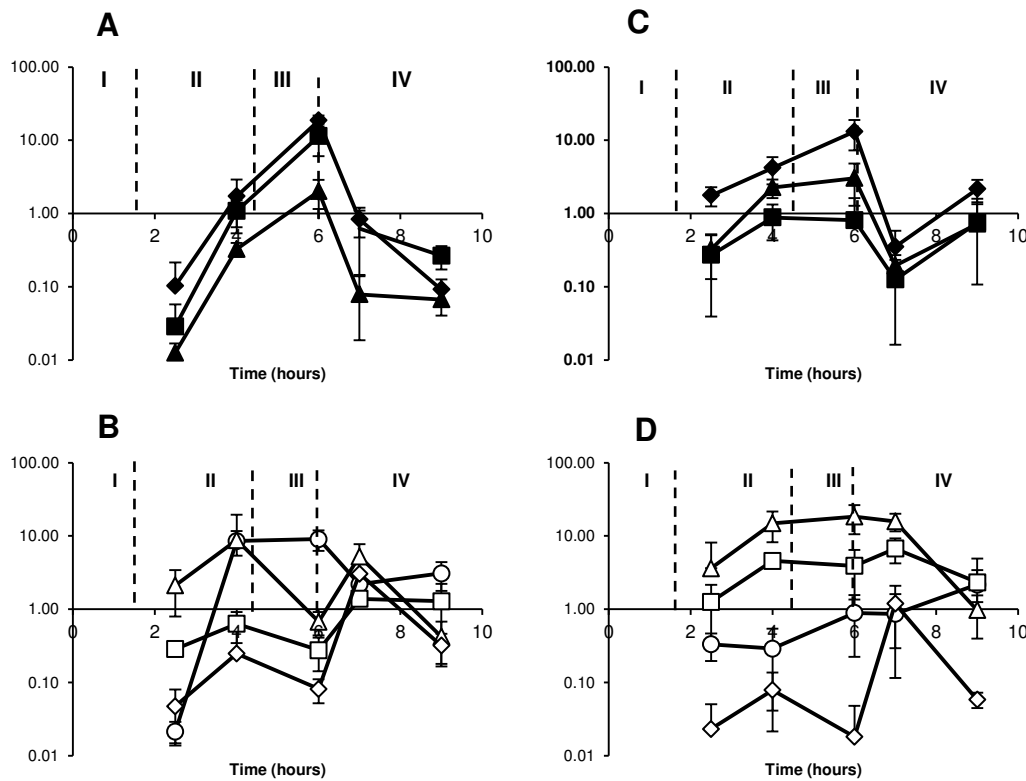


Figure 2: Kinetics of genes expression involved in sporulation initiation: *spo0A* (close diamond symbols), *spo0B* (close square symbols), *spo0F* (close triangle symbols), *kinA* (open round symbols), *kinB₁* (open square symbols), *KinB₂* (open triangle symbols) and *kinB₃* (open diamond symbols) in aerobiosis (A and B) and anaerobiosis (C and D). S1 was used as reference (S1=1).

4.2.2. Difference of gene expression between aerobic and anaerobic conditions

The early phase II (S₁) was characterized by a high expression of *spo0A*, *spo0B*, *spo0F* and *kinA* (Figure 2A) and no difference of *kinB* genes expression in anaerobiosis compared to aerobiosis (Figure 2B). The *spo0A*, *spo0B*, *spo0F* and *kinA* expressions were 8.2 ± 2.2 , 10 ± 4.7 , 22.8 ± 2.6 and 30.2 ± 11.8 fold higher in anaerobiosis compared to aerobiosis, respectively.

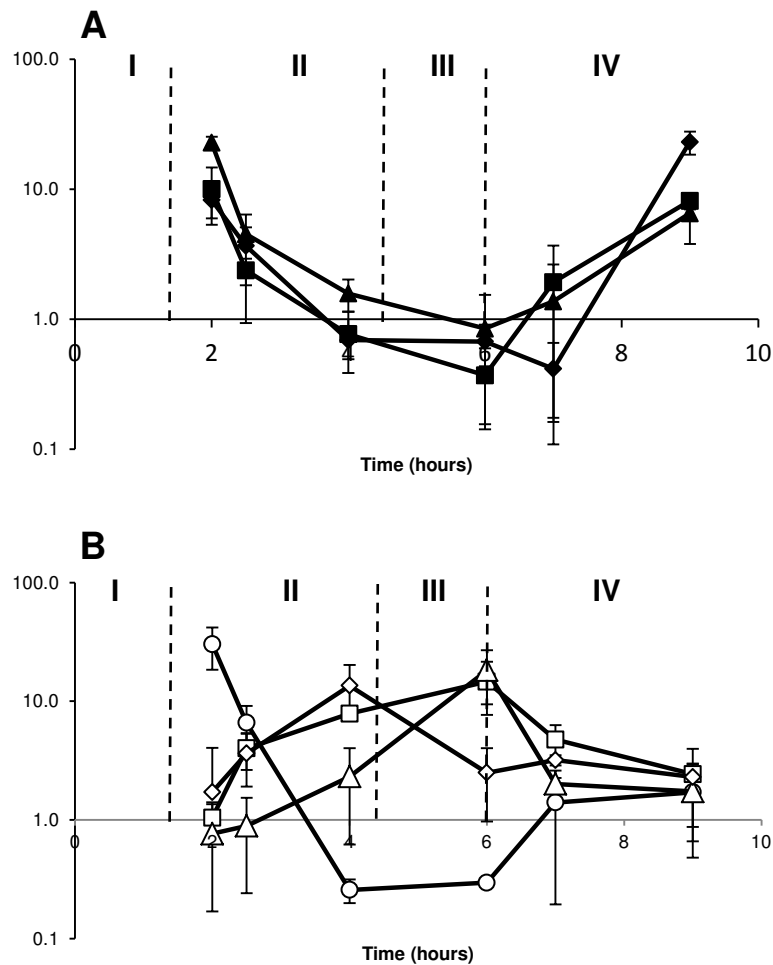


Figure 3: Expression kinetics of (A) the *spo* genes: *spo0A* (close diamond symbols), *spo0B* (close square symbols), *spo0F* (close triangle symbols) and (B) the *kin* genes: *kinA* (open round symbols), *kinB₁* (open square symbols), *kinB₂* (open triangle symbols) and *kinB₃* (open diamond symbols) in anaerobiosis compared to aerobiosis.

After 2 h (S₁) of growth, the differential overexpression in anaerobiosis vs aerobiosis of *spo* and *kinA* genes decreased gradually until the end of the phase II (exponential phase: S₂, S₃) and III (early stationary phase: S₄). At the end of phase II (exponential phase: S₃) and throughout phase III (early stationary phase: S₄), no difference in *spo* genes differential expressions was observed between anaerobic and aerobic conditions. However, *kinA* showed a differential subexpression between 4 h and 6 h of growth corresponding to the end of the exponential phase (phase II) and almost all the early stationary phase (phase III). Phases II and III are also characterized by an increase in *kinB* genes expressions in anaerobiosis compared to the aerobiosis to achieve a peak at 4 h (S₃) for *kinB₃* and at 6 h (S₄) for *kinB₁* and *kinB₂*.

The differential expression of the *spo* genes increased at the beginning of phase IV (late stationary phase) to achieve an expression at 9 h (S₆) of culture of 23 ± 4.7 , 8.1 ± 1.1 and 6.5 ± 2.7 fold higher in anaerobiosis compared to aerobiosis for *spo0A*, *spo0B* and *spo0F*, respectively. Expressions of *kinA* and *kinB* genes seemed to stabilize in phase IV.

Our results showed that the anaerobic vs aerobic differential gene expression of *spo0A*, *spo0B*, *spo0F* and *kinA* presented the same trend. This could be explained by the common role of these four genes. Indeed, these genes encode the protein (Spo0A, Spo0B, Spo0F and KinA) involved in the phosphorelay for the initiation of sporulation (Burbulys *et al.*, 1991; Eswaramoorthy *et al.*, 2010; Fujita and Losick, 2005; Hilbert and Piggot, 2004; Kobayashi *et al.*, 2008; Sonenshein, 2000). The high differential expression of these genes in phase IV (S₆) of cell growth corresponds to the end of the exponential growth phase, where cells encounter starvation and therefore begin to enter in sporulation step.

It is interesting to observe that in the late sporulation phase (IV) and under anaerobic conditions, the level of *spo* genes expression is even higher than in aerobiosis. One hypothesis might be that the cells were stressed, not only by the nutritional limitation but also by the anaerobic condition. Indeed, between 4 and 7 hours of culture, we observed approximately equal expression of *spo* genes in anaerobiosis compared to aerobiosis. This corresponds to the middle and the end of the exponential growth phase when the cells are still growing and they have not yet started to sporulate.

kinB gene expressions (*kinB*₁, *kinB*₂, *kinB*₃) possess an inverse trend to that of *spo* and *kinA* genes. They showed no significant difference in expression under anaerobic conditions compared to aerobic condition in the early phase II (S₁) or at the end of the phase IV (S₆) of cell growth. After 2 hours of culture, *kinB* genes expression increased gradually to achieve a peak of differential expression at 4 h (S₃) (for *kinB*₃) and 6 h (S₄) (for *kinB*₁ and *kinB*₂) of cell growth. In the literature, five histidine kinases have been described as being involved in the phosphorelay, and *kinA* is described as the main one (Piggot and Hilbert, 2004). As previously cited, *kinA* had the same trend as *spo0A*. We can assume that this is KinA which is involved in the phosphorelay and thus activates Spo0A. We also note that the genes *kinA* and *kinB* have inverse differential expression levels. When *kinA* was overexpressed, *kinB* was subexpressed and *vice versa*. These results could assume that the role of *kinB* here is secondary or complementary to *kinA*.

In conclusion to this work, the *spo0A*, *spo0B*, *spo0F*, *kinA* and *kinB* genes are differentially expressed during aerobiosis and anaerobiosis growth. These data may help to understand the difference in *B. cereus* sporulation capacity between aerobic and anaerobic condition.

Acknowledgements

Amina Aicha Abbas received a fellowship from the Programme Intergouvernemental Franco-Algérien. This work was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche under the project Food-Redox, ANR-11-ALID-001-04.

References

- Abbas, A.A., Planchon, S., Jobin, M., Schmitt, P., 2014.** Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*. *Food Microbiology* 42, 122-131.
- Branda, S.S., González-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., Kolter, R., 2001.** Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 11621-11626.
- Brillard, J., Jéhanno, I., Dargaignaratz, C., Barbosa, I., Ginies, C., Carlin, F., Fedhila, S., Nguyen-the, C., Broussolle, V., Sanchis, V., 2010.** Identification of *Bacillus cereus* Genes Specifically Expressed during Growth at Low Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2562-2573.
- Burbulys, D., Trach, K.A., Hoch, J.A., 1991.** Initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* 64, 545-552.
- Carlin, F., Girardin, H., Peck, M.W., Stringer, S.C., Barker, G.C., Martinez, A., Fernandez, A., Fernandez, P., Waites, W.M., Movahedi, S., van Leusden, F., Nauta, M., Moezelaar, R., Ceuppens, S., Boon, N., Uyttendaele, M., 2013.** Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS microbiology ecology* 84, 433-450.
- Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C., Schmitt, P., 2004.** Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *Journal of Applied Microbiology* 97, 214-219.

- de Hoon, M.J.L., Eichenberger, P., Vitkup, D., 2010.** Hierarchical Evolution of the Bacterial Sporulation Network. *Current Biology* 20, R735-R745.
- de Vries, Y.P., Hornstra, L.M., de Vos, W.M., Abee, T., 2004.** Growth and sporulation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 under defined conditions: Temporal expression of genes for key sigma factors. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2514-2519.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Scherer, S., 2004.** Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *Fems Microbiology Letters* 232, 189-195.
- Eswaramoorthy, P., Duan, D., Dinh, J., Dravis, A., Devi, S.N., Fujita, M., 2010.** The Threshold Level of the Sensor Histidine Kinase KinA Governs Entry into Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 192, 3870-3882.
- Fujita, M., Losick, R., 2005.** Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes & Development* 19, 2236-2244.
- Gonzalez-Pastor, J.E., Hobbs, E.C., Losick, R., 2003.** Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* 301, 510-513.
- Guinebretiere, M.H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., De Vos, P., 2008.** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology* 10, 851-865.
- Hilbert, D.W., Piggot, P.J., 2004.** Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 234-+.
- Hoch, J.A., 1993.** Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Microbiology* 47, 441-465.
- Kobayashi, K., Kuwana, R., Takamatsu, H., 2008.** kinA mRNA is missing a stop codon in the undomesticated *Bacillus subtilis* strain ATCC 6051. *Microbiology-Sgm* 154, 54-63.
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Haapasalo, M., 2000.** Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection* 2, 189-198.
- Moir, A., Corfe, B.M., Behravan, J., 2002.** Spore germination. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 403-409.
- Molle, V., Fujita, M., Jensen, S.T., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J.E., Liu, J.S., Losick, R., 2003.** The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 50, 1683-1701.

- Nguyen Thi Minh, H., Durand, A., Loison, P., Perrier-Cornet, J.-M., Gervais, P., 2011.** Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90, 1409-1417.
- Paredes, C.J., Alsaker, K.V., Papoutsakis, E.T., 2005.** A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nature Reviews Microbiology* 3, 969-978.
- Pfaffl, M.W., 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, e45.
- Piggot, P.J., Hilbert, D.W., 2004.** Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* 7, 579-586.
- Setlow, B., Cowan, A.E., Setlow, P., 2003.** Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. *Journal of Applied Microbiology* 95, 637-648.
- Setlow, P., 2006.** Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101, 514-525.
- Setlow, P., Johnson, E.A., 2007.** Spores and their significance.
- Sonenshein, A.L., 2000.** Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* 3, 561-566.
- Tam, N.K.M., Uyen, N.Q., Hong, H.A., Duc, L.H., Hoa, T.T., Serra, C.R., Henriques, A.O., Cutting, S.M., 2006.** The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *Journal of Bacteriology* 188, 2692-2700.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Vantriet, K., 1990.** Modeling of the bacterial-growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1875-1881.

DISCUSSION GENERALE
ET PERSPECTIVES

Discussion générale et perspectives

Bacillus cereus est une bactérie ubiquitaire capable de former des spores en conditions environnementales défavorables. Les spores peuvent présenter des propriétés différentes dépendantes des conditions physico-chimiques et nutritionnelles dans lesquelles elles ont été produites. Les effets de la température, du pH et de l'activité de l'eau sur la résistance des spores de *Bacillus* ont été largement étudiés (Baweja *et al.*, 2008; Carlin, 2011; Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011; Planchon *et al.*, 2011). En général, les spores produites à haute température, à pH alcalin ou à faible activité de l'eau sont plus résistantes à la chaleur que celles produites à basse température, à pH acide ou à forte activité de l'eau (Melly *et al.*, 2002; Leguerinel *et al.*, 2007; Gounina - Allouane *et al.*, 2008; Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011). Ces trois paramètres ont donc un effet sur les propriétés de résistance des spores (ici, thermorésistance).

Lorsque ce travail a été débuté, il y avait très peu de données bibliographiques concernant la capacité de sporulation de *Bacillus cereus* en absence d'oxygène. Par ailleurs, aucune donnée sur l'effet de l'anaérobiose sur les propriétés des spores n'était disponible. L'objectif principal de ce travail a été d'étudier d'une part la capacité de sporulation de *Bacillus cereus* en absence d'oxygène et d'autre part de caractériser les propriétés de résistance et de germination des spores ainsi formées. L'absence d'oxygène a-t-il un effet sur les propriétés des spores de *B. cereus* ?

1. Optimisation du milieu MODS et étude de la capacité de sporulation de *B. cereus* en absence d'oxygène

Les études physiologiques nécessitent l'utilisation d'un milieu chimiquement défini afin d'obtenir des spores homogènes. Dans un premier temps, nous avons voulu optimiser le milieu MOD, couramment utilisé dans notre laboratoire pour l'étude de la croissance et du métabolisme de *B. cereus* (Duport *et al.*, 2004 ; Glatz and Goepfert, 1977). L'optimisation a consisté en l'ajout de minéraux présents habituellement dans les milieux de sporulation, la diminution de la concentration en glucose et en acides aminés et l'ajout de tampon phosphate. **Ce milieu optimisé a été nommé : MODS.**

Dans un second temps, et afin de connaître la capacité de sporulation de *B. cereus* en absence d'oxygène, 18 souches appartenant aux différents groupes phylogénétiques II à VII ont été choisies. Le suivi de la croissance et de la sporulation en batch non régulé dans le milieu MODS en absence et présence d'oxygène a été réalisé.

Nos résultats ont révélé une faible sporulation en condition anaérobie comparée à la condition aérobie. De plus, une hétérogénéité de la capacité de sporulation au sein d'un même groupe a été constatée. Enfin, la souche AH 187 appartenant au groupe phylogénétique III était celle ayant produit le plus de spores en anaérobiose, suivie de la souche F837/76 appartenant au groupe III. Beaucoup de travaux menés dans le genre *Bacillus* ont montré que la capacité de sporulation est étroitement liée à l'apport en oxygène. Nos résultats sont en accord avec ces données. Dans une étude antérieure, les auteurs ont montré que parmi 11 espèces du genre *Bacillus*, seules les espèces *B. macerans* et *B. polymyxa* ont été capables de sporuler en absence d'oxygène et que *B. cereus* (ATCC 12580) ne sporulait pas (Couchot and Maier, 1974). Des expériences plus récentes ont indiqué que dans une condition d'oxygénation limitée, la production de spores de *B. thuringiensis* (une espèce génétiquement proche de *B. cereus*) était plus faible que dans une condition d'oxygénation non limitée (Foda *et al.*, 1985; Avignone-Rossa *et al.*, 1992; Finlay *et al.*, 2002). De même, Boniolo et ses collaborateurs (Boniolo *et al.*, 2012), ont montré que l'interruption de l'approvisionnement en oxygène immédiatement après la fin de la phase exponentielle de croissance, conduisait à une faible production de spores de *B. thuringiensis var israelensis*.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié 18 souches appartenant aux différents groupes de *B. cereus*. Une étude plus élargie sur la capacité de sporulation des souches de *B. cereus* en absence d'oxygène pourrait être poursuivie afin d'obtenir une étude plus complète. Elle pourrait également permettre de caractériser plus en détail des souches produisant des spores en forte concentration en anaérobiose comme la souche AH 187.

2. Effet de l'anaérobiose sur les propriétés des spores de *B. cereus*

En ce qui concerne l'effet de l'absence d'oxygène sur les propriétés de résistance et de germination des spores de *B. cereus*, notre étude a montré que certaines propriétés telles que la thermorésistance, la résistance à l'acide nitreux et à l'hydroxyde de sodium, la germination et la structure des spores étaient affectées par l'absence d'oxygène.

2.1. Effet sur la thermorésistance

Dans notre étude, nous avons constaté que les spores de la souche AH 187 de *B. cereus* produites en anaérobiose étaient plus résistantes à la chaleur humide. De plus, la différence la plus importante de la valeur D (environ 61 min) entre les spores produites dans les deux conditions a été obtenue à la température la plus basse (90 °C). À plus haute température (100°C), la différence de la valeur D était plus faible (environ 1 min). Par conséquent, plus la température de traitement augmente, moins la différence de la valeur D entre les spores produites dans ces deux conditions est marquée. En outre, la valeur- z pour les spores produites en anaérobiose (7.74 °C) a été inférieure à celle des spores produites en aérobiose (10.52 °C). Plusieurs études ont identifié certains facteurs jouant un rôle important dans la résistance des spores à la chaleur humide. La déshydratation du cœur de la spore serait le facteur majeur mais d'autres facteurs pourraient aussi être impliqués tels que la teneur en minéraux dans le cœur de la spore, la présence des protéines solubles SASP et de l'acide dipicolinique (DPA). (Nakashio and Gerhardt, 1985; Beaman and Gerhardt, 1986; Marquis and Shin, 1994; Setlow, 1994; Popham *et al.*, 1995; Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011). Nos résultats ont montré que le contenu de le DPA était significativement plus faible dans les spores produites en aérobiose par rapport à celles produites en anaérobiose. Le DPA contribue à diminuer la teneur en eau de la spore et par conséquent, augmente la résistance des spores de *B. subtilis* et de *B. cereus* à la chaleur humide (Setlow *et al.*, 2006; Planchon *et al.*, 2011).

2.2. Effet sur la résistance aux agents chimiques

Dans notre étude, les spores obtenues dans les conditions d'anaérobiose étaient plus résistantes à l'acide nitreux (0,1 M) et à l'hydroxyde de sodium (1 M) que celles obtenues en aérobiose. Aucune différence significative n'a été observée quant à la résistance des spores au peroxyde d'hydrogène (5 %) ou au formaldéhyde (0,25 M). La différence de résistance des spore pourrait être due à la présence des couches de tuniques qui protégeraient les spores contre certaines substances chimiques, telles que, le dioxyde de chlore, l'hypochlorite et le peroxyde d'hydrogène (Gould *et al.*, 1963; Riesenman and Nicholson, 2000; Young and Setlow, 2003). Il a été montré que les protéines SASP jouaient également un rôle important dans la résistance des spores à des agents endommageant l'ADN (Setlow, 2006).

Chez *B. subtilis*, la composition en acides gras de la spore change de manière significative avec la température de sporulation. Cortezzo et Setlow ont démontré qu'à basse température, l'augmentation de la composition de la membrane interne de la spore en acide gras insaturés était couplée à une sensibilité plus importante de ces spores à des agents endommageants l'ADN. Donc, un changement de composition en acides gras membranaires pourrait influencer la résistance de ces spores (Cortezzo and setlow, 2005). Ce phénomène est-il le même lorsqu'on change d'atmosphère ? Il pourrait donc être intéressant de réaliser un profil des acides gras de la membrane interne des spores produites en anaérobiose pour mieux comprendre la différence de résistance aux agents chimiques.

2.3. Effet sur les UV et la lumière pulsée

Nos résultats ont montré que les spores de la souche AH 187 de *B. cereus* produites en aérobiose sont plus sensibles aux traitements UV délivrés par la lumière pulsée (pour une fluence de $0,34 \text{ J cm}^{-2}$ et $0,49 \text{ J cm}^{-2}$) que celles produites en anaérobiose. Cependant, aucune différence significative n'a pu être observée pour les UV-C à 254 nm entre les deux conditions de sporulation. La lumière pulsée offre un large spectre de lumière visible et d'UV (de 100-1100 nm), ce qui peut expliquer les différences d'efficacité de destruction comparée aux UV monochromatiques (Planchon *et al.*, 2011).

2.4. Effet sur la germination

La germination des spores de *B. cereus* AH187 en présence d'alanine comme inducteur a montré que les spores produites en anaérobiose germaient plus efficacement que celles produites en aérobiose. La germination des spores est un processus complexe dont l'activation est sous l'influence de plusieurs facteurs tels que le choc thermique et l'apport en nutriments principalement. Par exemple, en étudiant l'effet de la température sur la germination des spores de *B. cereus*, il a été montré que la capacité de germination augmentait lorsque la concentration en DPA dans le cœur des spores diminuait (Planchon *et al.*, 2011). Dans notre étude, le taux de germination est supérieur pour les spores contenant une plus grande concentration en DPA. Ceci suggère que d'autres facteurs pourraient être impliqués dans le déclenchement de la germination. Dans nos conditions expérimentales, l'étude de la

germination des spores a été réalisée en condition atmosphérique. Par conséquent, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'oxygène serait un facteur important dans ce processus.

En outre, des études antérieures ont montré que l'expression de gènes codant pour des protéines de germination était meilleure dans un milieu de sporulation chimiquement défini, riche en éléments nutritifs (milieu Y1), comparée à un milieu contenant de faibles quantités en nutriments (milieu G) (Hornstra *et al.*, 2006). L'expression de ces gènes était donc sous l'influence de la composition du milieu de croissance. La raison d'une meilleure germination en anaérobiose dans notre étude reste inconnue. Elle serait peut-être attribuable à des gènes codant pour des enzymes lytiques et /ou d'autres protéines telles que les protéines de la famille Ger ou ceux de l'exosporium. Il est intéressant de noter que notre étude a montré que le processus de germination était meilleur pour les spores ayant perdu leur exosporium, ou ayant un exosporium endommagé (condition anaérobiose). Ceci suggère un rôle important de l'exosporium dans le processus de germination. Severson et ses collaborateurs ont montré que la protéine de l'exosporium (ExsK) jouait un rôle dans la germination de *B. anthracis*. Dans cette étude, ils ont montré que les spores du mutants Δ ExsK germaient plus efficacement que celles du type sauvage en réponse à de nombreux germinants. Cependant, aucune différence structurelle dans l'exosporium n'a été observée entre le mutant Δ ExsK et le type sauvage. Les auteurs suggèrent que la protéine ExsK inhibe directement ou indirectement la germination en réponse à différents germinants (Severson *et al.*, 2009). Il faut savoir que, l'exosporium est composé d'environ 20 protéines, dont ExsK, pouvant être impliquées dans la germination.

En présence d'inosine comme germinant, nos résultats ont montré que la germination maximale des spores a été obtenue pour une concentration de 1 mM d'inosine avec un taux de germination similaire en anaérobiose et en aérobiose. La germination avec cet inducteur est donc apparemment indépendante de l'oxygène. Comme décrit précédemment, l'inosine est un germinant efficace pour *B. cereus*, en particulier aux plus fortes concentrations (1 mM) (Clements and Moir., 1998; Broussolle *et al.*, 2008).

2.5. Effet sur la taille et la structure des spores

Les observations en microscopie électronique à transmission ont montré que dans les conditions aérobies, seulement quelques spores avaient un exosporium endommagé ou détaché. Des travaux antérieurs ont montré que la fréquence à laquelle les spores de *B. cereus*

avaient un exosporium endommagé augmentait lorsque la sporulation avait lieu dans des conditions moins favorables, comme une température élevée (40 °C) (Faille *et al.*, 2007). Les différences de résistance des spores à la chaleur humide et aux agents chimique ainsi que la différence de germination entre les deux conditions anaérobies et aérobies suggèrent une différence de structure des spores.

Nos résultats montrent que la taille des spores (largeur et longueur) produites dans les deux conditions atmosphériques ne varie pas de façon significative. D'autres études montrent que les paramètres environnementaux tels que le pourcentage humidité (3 %, > 80 %) et une carence en calcium, affectent le gonflement et rétrécissement des spores de *B. thuringiensis* (Westphal *et al.*, 2003 ; Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011).

3. Effet de l'anaérobiose sur l'expression des gènes de la sporulation

Dans un troisième temps, nous avons voulu mieux comprendre le faible taux de sporulation des souches de *B. cereus* en absence d'oxygène. Pour cela, des expériences de RT-PCR quantitatives ont été réalisées afin de déterminer les niveaux d'expression des gènes *kinA*, *kinB*, *spo0F*, *spo0B* et *spo0A* impliqués dans la cascade de phosphorylation pour l'initiation de la sporulation. Des prélèvements d'ARN ont été réalisés tout au long de la croissance.

Les résultats de ces expériences ont montré que le différentiel d'expression des gènes *kinA*, *spo0F*, *spo0B* et *spo0A* montraient la même tendance avec une surexpression au début et à la fin de la croissance en anaérobiose par rapport à l'aérobiose. Cela s'expliquerait par le rôle commun de ces quatre gènes. En effet, ces gènes codent pour les protéine KinA , Spo0F, Spo0B et Spo0A, respectivement, impliquées dans la cascade de phosphorylation pour l'initiation de la sporulation (Burbulys *et al.*, 1991; Eswaramoorthy *et al.*, 2010; Fujita and Losick, 2005; Hilbert and Piggot, 2004; Kobayashi *et al.*, 2008; Sonenshein, 2000).

La surexpression de ces gènes en anaérobiose par rapport à l'aérobiose, à la fin de la croissance se retrouvent au niveau de la phase où les cellules rencontrent une carence nutritionnelle importante et entrent en sporulation. Des études antérieures ont montré que la concentration ainsi que l'activité de la protéine Spo0A augmentait progressivement au début de la sporulation, ce qui est du à la fois aux conditions de limitation en nutriments et également en réponse à l'induction de la synthèse des kinases (Fujita et Losick, 2005). Cette augmentation d'activité pourrait également être due à l'induction de la synthèse des protéines

Spo0F et Spo0B, ce qui pourrait expliquer leur forte expression. D'une manière générale, le niveau et l'activité de la protéine Spo0A est élevée au début de la sporulation. On peut supposer que le taux d'expression du gène *spo0A* est également élevé à ce stade de la croissance. Cependant, dans des conditions anaérobies, et d'après nos résultats, il apparaît que le niveau d'expression est encore plus élevé. La cellule serait donc plus stressée, non seulement en raison de la carence nutritionnelle, mais aussi, probablement, en raison des conditions anaérobies.

De plus, entre 4 et 7 heures de culture, aucune différence d'expression des gènes *spo* n'a été observée en anaérobiose par rapport à l'aérobiose. Ce moment de la croissance correspond au milieu et la fin de la phase exponentielle de croissance, où les cellules sont encore en croissance, et ne sont pas encore entrées en phase de sporulation. L'analyse génomique montre que 120 gènes sont sous le contrôle direct de Spo0A et que 400 autres gènes sont sous un contrôle indirect (Molle et al., 2003; Piggott and Hilbert, 2004). Ce contrôle de la transcription dépend de la dose de Spo0A~P. Sur ce principe, il existe deux catégories de gènes : ceux qui sont activés ou réprimés à une faible dose de la protéine Spo0A~P (gènes à bas seuil) et ceux qui nécessitent une dose plus élevée pour être activés ou réprimés (gènes à haut seuil) (Fujita et Losick, 2005). Les gènes qui sont directement impliqués dans la sporulation appartiennent généralement à la 2^{ème} catégorie, tandis que les gènes qui sont impliqués dans les processus auxiliaires, tels que le cannibalisme (Gonzalez-Pastor et al., 2003) sont retrouvés dans la 1^{ère} catégorie (Fujita et Losick, 2005). Ceci pourrait donc expliquer d'une part la forte expression des gènes *spo* (*spo0A*, *spo0B* et *spo0F*) en phase de sporulation précoce et d'autre part la faible expression pendant la croissance.

Nos résultats ont également montré que les gènes *kinB* (*kinB₁*, *kinB₂*, *kinB₃*) avaient une tendance d'expression inverse à celle des gènes précédents. Ils ne présentaient pas de différence d'expression en anaérobiose comparé à l'aérobiose en début de croissance (2 h) mais aussi en fin de croissance (9 h). Au delà des 2 h de culture, l'expression différentielle des gènes *kinB* a augmenté graduellement jusqu'à atteindre des pics d'expression à 4 h (*kinB₃*) et à 6 h (*kinB₁* et *kinB₂*) de croissance. Dans la littérature, cinq histidine kinases ont été décrites comme étant impliquées dans la cascade de phosphorylation, cependant, KinA est décrite comme étant la principale pour ce rôle (Piggott et Hilbert, 2004). Comme cité précédemment, *kinA* a la même tendance d'expression différentielle que *spo0A*. Nous pouvons supposer que la protéine KinA initie la cascade de phosphorylation et active de ce fait le

régulateur Spo0A. Nous notons également que les gènes *kinA* et *kinB* ont des niveaux d'expression inverses. Lorsque *kinA* était surexprimé, *kinB* était sous-exprimé et inversement. Ces résultats pourraient laisser supposer que le rôle de *kinB* dans ce cas, est complémentaire de *kinA*.

Nos résultats des q-RT-PCR fournissent des données intéressantes sur l'expression des gènes de la cascade de phosphorylation en anaérobiose comparée à l'aérobiose. Cette étude préliminaire pourrait être suivie par une étude protéomique plus large pouvant donner plus de détails et plus d'explications afin d'éclaircir les mécanismes de la sporulation en absence d'oxygène. Cela permettrait aussi de cibler certains gènes affectés lors de la sporulation en anaérobiose et de caractériser leurs fonctions par le biais de mutations.

Bien que la cascade de phosphorylation soit une étape clé du processus de sporulation, les facteurs sigma (σ^E , σ^F , σ^G et σ^K) jouent un rôle très important dans ce mécanisme. En effet, σ^F et σ^E dirigent l'expression des gènes au début de la sporulation dans le compartiment de la préspore et de la cellule mère, respectivement, alors que, σ^G et σ^K en dirigent l'expression à la fin de la sporulation (de hoon, 2010).

Durant cette thèse, et après avoir étudié l'expression des gènes de la cascade de phosphorylation, nous nous sommes intéressés à l'expression de ces 4 facteurs sigma impliqués dans la sporulation. Pour cela, nous avons voulu entreprendre une autre approche moléculaire. De ce fait, des fusions transcriptionnelles ont été construites entre le promoteur de l'un des 4 gènes codants les facteurs sigma et un gène rapporteur, *lac-z*, codant la β -galactosidase. A la suite de ces expériences, nous sommes parvenus à construire les fusions transcriptionnelles *lacz-sigE* ainsi que *lacz-sigG* puis à vérifier par séquençage avec succès. Cependant, il a été impossible de transformer la souche AH 187 de *B. cereus*, ce qui a rendu la suite de l'étude irréalisable.

En conclusion, ce travail apporte de nouvelles connaissances sur les effets de l'anaérobiose sur les propriétés des spores de *B. cereus*, telles que la résistance, la germination et la structure. Notre étude a révélé une forte diminution du taux de sporulation en absence d'oxygène. Si l'on considère le risque lié à la présence de ce pathogène dans des aliments traités thermiquement et conditionnés en absence d'oxygène, il est intéressant de noter que les spores produites en anaérobiose possèdent une plus grande résistance à la chaleur humide par rapport à celles produites en aérobiose.

L'absence d'oxygène présentait également un effet sur l'expression des gènes de l'initiation de la sporulation. Ces gènes étaient plus exprimés en condition anaérobie. La faible sporulation observée en anaérobiose pourrait probablement s'expliquer par plusieurs hypothèses : i) la première pourrait être la non activation d'une ou de plusieurs protéines de l'initiation de la sporulation, sachant que la forte expression d'un gène n'entraîne pas forcément l'activation de sa protéine. Il serait donc judicieux de tester l'activité de ces protéines. ii) La deuxième hypothèse serait qu'un ou plusieurs gènes impliqués dans les étapes autres que l'initiation de la sporulation (les facteurs sigma) seraient moins exprimés en anaérobiose par rapport à l'aérobiose. Ceci expliquerait le faible rendement de sporulation en anaérobiose.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abee, T., Groot, M.N., Tempelaars, M., Zwietering, M., Moezelaar, R., van der Voort, M., 2011.** Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: Diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiology* 28, 199-208.
- Agata, N., Ohta, M., Yokoyama, K., 2002.** Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *International Journal of Food Microbiology* 73, 23-27.
- Albert, I., Mafart, P., 2005.** A modified Weibull model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology* 100, 197-211.
- Alberto, F., Broussolle, V., Mason, D.R., Carlin, F., Peck, M.W., 2003.** Variability in spore germination response by strains of proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B and F. *Letters in Applied Microbiology* 36, 41-45.
- Atrih, A., Foster, S.J., 1999.** The role of peptidoglycan structure and structural dynamics during endospore dormancy and germination. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 75, 299-307.
- Atrih, A., Foster, S.J., 2001.** Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *Journal of Applied Microbiology* 91, 364-372.
- Avignonnerossa, C., Arcas, J., Mignone, C., 1992.** *Bacillus-thuringiensis* growth, sporulation and delta-endotoxin production in oxygen limited and nonlimited cultures. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 8, 301-304.
- Baril, E., Coroller, L., Postollec, F., Leguerinel, I., Boulais, C., Carlin, F., Mafart, P., 2011.** The wet-heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores produced in a two-step sporulation process depends on sporulation temperature but not on previous cell history. *International Journal of Food Microbiology* 146, 57-62.
- Barlass, P.J., Houston, C.W., Clements, M.O., Moir, A., 2002.** Germination of *Bacillus cereus* spores in response to L-alanine and to inosine: the roles of gerL and gerQ operons. *Microbiology-Sgm* 148, 2089-2095.
- Baweja, R.B., Zaman, M.S., Mattoo, A.R., Sharma, K., Tripathi, V., Aggarwal, A., Dubey, G.P., Kurupati, R.K., Ganguli, M., Chaudhury, N.K., Sen, S., Das, T.K., Gade, W.N., Singh, Y., 2008.** Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. *Archives of Microbiology* 189, 71-79.

- Beaman, T.C., Gerhardt, P., 1986.** Heat-resistance of bacterial-spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 1242-1246.
- Behravan, J., Chirakkal, H., Masson, A., Moir, A., 2000.** Mutations in the gerP Locus of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* Affect Access of Germinants to Their Targets in Spores. *Journal of Bacteriology* 182, 1987-1994.
- Ben-Yehuda, S., Losick, R., 2002.** Asymmetric Cell Division in *B. subtilis* Involves a Spiral-like Intermediate of the Cytokinetic Protein FtsZ. *Cell* 109, 257-266.
- Boland, F.M., Atrih, A., Chirakkal, H., Foster, S.J., Moir, A., 2000.** Complete spore-cortex hydrolysis during germination of *Bacillus subtilis* 168 requires SleB and YpeB. *Microbiology-Uk* 146, 57-64.
- Boniolo, F., Rodrigues, R., Prata, A., López, M., Jacinto, T., Silveira, M., Berbert-Molina, M., 2012.** Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and δ -endotoxin production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94, 625-636.
- Bottone, E.J., 2010.** *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 23, 382-+.
- Boydston, J.A., Yue, L., Kearney, J.F., Turnbough, C.L., 2006.** The ExsY Protein Is Required for Complete Formation of the Exosporium of **Bacillus anthracis**. *Journal of Bacteriology* 188, 7440-7448.
- Broussolle, V., Gauillard, F., Nguyen-The, C., Carlin, F., 2008.** Diversity of spore germination in response to inosine and L-alanine and its interaction with NaCl and pH in the *Bacillus cereus* group. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1081-1090.
- Burbulys, D., Trach, K.A., Hoch, J.A., 1991.** Initiation of sporulation in *Bacillus-subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* 64, 545-552.
- Cabrera-Martinez, R.M., Setlow, B., Setlow, P., 2002.** Studies on the mechanisms of the sporicidal action of ortho-phthalaldehyde. *Journal of Applied Microbiology* 92, 675-680.
- Cano, R.J., Borucki, M.K., 1995.** Revival and identification of bacterial-spores in 25-million-year-old to 40-million-year-old dominican amber (VOL 268, PG 1060, 1995). *Science* 268, 1265-1265.
- Carlin, F., 2011.** Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology* 28, 177-182.

- Carr, K.A., Janes, B.K., Hanna, P.C., 2010.** Role of the gerP Operon in Germination and Outgrowth of *Bacillus anthracis* Spores. *Plos One* 5.
- Cazemier, A.E., Wagenaars, S.F.M., ter Steeg, P.F., 2001.** Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *Journal of Applied Microbiology* 90, 761-770.
- Ceuppens, S., Boon, N., Uyttendaele, M., 2013.** Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS microbiology ecology* 84, 433-450.
- Chen, Y., Fukuoka, S., Makino, S., 2000.** A Novel Spore Peptidoglycan Hydrolase of *Bacillus cereus*: Biochemical Characterization and Nucleotide Sequence of the Corresponding Gene, sleL. *Journal of Bacteriology* 182, 1499-1506.
- Cheung, H.Y., Cui, J.X., Sun, S.Q., 1999.** Real-time monitoring of *Bacillus subtilis* endospore components by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy during germination. *Microbiology-Uk* 145, 1043-1048.
- Chirakkal, H., O'Rourke, M., Atrih, A., Foster, S.J., Moir, A., 2002.** Analysis of spore cortex lytic enzymes and related proteins in *Bacillus subtilis* endospore germination. *Microbiology* 148, 2383-2392.
- Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C., Schmitt, P., 2004.** Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *Journal of Applied Microbiology* 97, 214-219.
- Clements, M.O., Moir, A., 1998.** Role of the gerI operon of *Bacillus cereus* 569 in the response of spores to germinants. *Journal of Bacteriology* 180, 6729-6735.
- Coleman, W.H., De, C., Li, Y.-q., Cowan, A.E., Setlow, P., 2007.** How moist heat kills spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 189, 8458-8466.
- Cohill, T.P., Sagripanti, J.L., 2009.** Bacterial Inactivation by Solar Ultraviolet Radiation Compared with Sensitivity to 254 nm Radiation. *Photochemistry and Photobiology* 85, 1043-1052.
- Cortezzo, D.E., Koziol-Dube, K., Setlow, B., Setlow, P., 2004.** Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes spores to subsequent stress. *Journal of Applied Microbiology* 97, 838-852.
- Cortezzo, D.E., Setlow, P., 2005.** Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 98, 606-617.

- Couchot, K.R., Maier, S., 1974.** Anaerobic sporulation in facultatively anaerobic species of the genus *Bacillus*. *Can. J. Microbiol.* 20, 1291-1296.
- Cowan, A.E., Olivastro, E.M., Koppel, D.E., Loshon, C.A., Setlow, B., Setlow, P., 2004.** Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7733-7738.
- de Hoon, M.J.L., Eichenberger, P., Vitkup, D., 2010.** Hierarchical Evolution of the Bacterial Sporulation Network. *Current Biology* 20, R735-R745.
- de Vries, Y.P., Atmadja, R.D., Hornstra, L.M., de Vos, W.M., Abee, T., 2005.** Influence of glutamate on growth, sporulation, and spore properties of *Bacillus cereus* ATCC 14579 in defined medium. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3248-3254.
- Depieri, L.A., Ludlow, I.K., 1992.** Relationship between *Bacillus-sphaericus* spore heat-resistance and sporulation temperature. *Letters in Applied Microbiology* 14, 121-124.
- Diaz, A.R., Core, L.J., Jiang, M., Morelli, M., Chiang, C.H., Szurmant, H., Perego, M., 2012.** *Bacillus subtilis* RapA Phosphatase Domain Interaction with Its Substrate, Phosphorylated Spo0F, and Its Inhibitor, the PhrA Peptide. *Journal of Bacteriology* 194, 1378-1388.
- Driks, A., Roels, S., Beall, B., Moran, C.P., Losick, R., 1994.** Subcellular-localization of proteins involved in the assembly of the spore coat of *Bacillus-subtilis*. *Genes & Development* 8, 234-244.
- Driks, A., 1999.** *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 1-+.
- Driks, A., 2002.** Overview: development of bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 389-391.
- Duport, C., Thomassin, S., Bourel, G., Schmitt, P., 2004.** Anaerobiosis and low specific growth rates enhance hemolysin BL production by *Bacillus cereus* F4430/73. *Archives of Microbiology* 182, 90-95.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Scherer, S., 2004.** Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *Fems Microbiology Letters* 232, 189-195.
- Eichenberger, P., Fujita, M., Jensen, S.T., Conlon, E.M., Rudner, D.Z., Wang, S.T., Ferguson, C., Haga, K., Sato, T., Liu, J.S., Losick, R., 2004.** The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Plos Biology* 2, 1664-1683.

- Ellar, D.J., 1978.** Spore specific structures and their functions. Symposia of the Society for General Microbiology 28, 295-324.
- Errington, J., 1993.** *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. Microbiological Reviews 57, 1-33.
- Escobar-Cortes, K., Barra-Carrasco, J., Paredes-Sabja, D., 2013.** Proteases and sonication specifically remove the exosporium layer of spores of *Clostridium difficile* strain 630. Journal of Microbiological Methods 93, 25-31.
- Eswaramoorthy, P., Duan, D., Dinh, J., Dravis, A., Devi, S.N., Fujita, M., 2010.** The Threshold Level of the Sensor Histidine Kinase KinA Governs Entry into Sporulation in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 192, 3870-3882.
- Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M.N., Slomianny, C., Benezech, T., 2002.** Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. Canadian Journal of Microbiology 48, 728-738.
- Faille, C., Tauveron, G., Gentil-Lelievre, C.L., Slomianny, C., 2007.** Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. Journal of Food Protection 70, 2346-2353.
- Farrell, H.P., Garvey, M., Cormican, M., Laffey, J.G., Rowan, N.J., 2010.** Investigation of critical inter-related factors affecting the efficacy of pulsed light for inactivating clinically relevant bacterial pathogens. Journal of Applied Microbiology 108, 1494-1508.
- Fay, A., Meyer, P., Dworkin, J., 2010.** Interactions Between Late-Acting Proteins Required for Peptidoglycan Synthesis during Sporulation. Journal of Molecular Biology 399, 547-561.
- Fazzini, M.M., Schuch, R., Fischetti, V.A., 2010.** A Novel Spore Protein, ExsM, Regulates Formation of the Exosporium in *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* and Affects Spore Size and Shape. Journal of Bacteriology 192, 4012-4021.
- Finlay, W.J.J., Logan, N.A., Sutherland, A.D., 2002.** *Bacillus cereus* emetic toxin production in relation to dissolved oxygen tension and sporulation. Food Microbiology 19, 423-430.
- Foda, M.S., Salama, H.S., Selim, M., 1985.** Factors affecting growth physiology of *Bacillus-thuringiensis*. Applied Microbiology and Biotechnology 22, 50-52.

- Foster, S.J., Johnstone, K., 1987.** Purification and properties of a germination-specific cortex-lytic enzyme from spores of *Bacillus-megaterium* KM. *Biochemical Journal* 242, 573-579.
- Foster, S.J., Johnstone, K., 1990.** Pulling the trigger - the mechanism of bacterial spore germination. *Molecular Microbiology* 4, 137-141.
- Foster, S.J., 1994.** The role and regulation of cell wall structural dynamics during differentiation of endospore-forming bacteria. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series* 23, 25S-39S.
- Fujita, M., Losick, R., 2005.** Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes & Development* 19, 2236-2244.
- Genest, P.C., Setlow, B., Melly, E., Setlow, P., 2002.** Killing of spores of *Bacillus subtilis* by peroxyntirite appears to be caused by membrane damage. *Microbiology-Sgm* 148, 307-314.
- Glatz, B.A., Goepfert, J.M., 1977.** Production of *Bacillus-cereus* enterotoxin in defined media in fermenter-grown cultures. *Journal of Food Protection* 40, 472-474.
- Gomez-Lopez, V.M., Devlieghere, F., Bonduelle, V., Debevere, J., 2005.** Intense light pulses decontamination of minimally processed vegetables and their shelf-life. *International Journal of Food Microbiology* 103, 79-89.
- Gonzalez, I., Lopez, M., Martinez, S., Bernardo, A., Gonzalez, J., 1999.** Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 51, 81-84.
- Gould, G.W., Hitchins, A.D., 1963.** Sensitization of bacterial spores to lysozyme and to hydrogen peroxide with agents which rupture disulphide bonds. *Journal of general microbiology* 33, 413-423.
- Gounina-Allouane, R., Broussolle, V., Carlin, F., 2008.** Influence of the sporulation temperature on the impact of the nutrients inosine and L-alanine on *Bacillus cereus* spore germination (vol 25, pg 202, 2007). *Food Microbiology* 25, 544-544.
- Granger, A.C., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Daly, M.J., Setlow, P., 2011.** Effects of Mn and Fe Levels on *Bacillus subtilis* Spore Resistance and Effects of Mn²⁺, Other Divalent Cations, Orthophosphate, and Dipicolinic Acid on Protein Resistance to Ionizing Radiation. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 32-40.
- Guinebretiere, M.H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., De Vos, P.,**

2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology* 10, 851-865.
- Guinebretiere, 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., Sorokin, A., 2013.** *Bacillus cytotoxicus* sp nov is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 31-40.
- Henriques, A.O., Moran, C.P., Jr., 2007.** Structure, assembly, and function of the spore surface layers, *Annual Review of Microbiology*, pp. 555-588.
- Hierro, E., Manzano, S., Ordonez, J.A., de la Hoz, L., Fernandez, M., 2009.** Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on shell eggs by pulsed light technology. *International Journal of Food Microbiology* 135, 125-130.
- Higgins, D., Dworkin, J., 2012.** Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *Fems Microbiology Reviews* 36, 131-148.
- Hilbert, D.W., Piggot, P.J., 2004.** Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 234-+.
- Hong, H.A., Duc, L.H., Cutting, S.M., 2005.** The use of bacterial spore formers as probiotics. *Fems Microbiology Reviews* 29, 813-835.
- Hornstra, L.M., de Vries, Y.P., de Vos, W.M., Abee, T., 2006.** Influence of sporulation medium composition on transcription of ger Operons and the germination response of spores of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3746-3749.
- Igarashi, T., Setlow, B., Paidhungat, M., Setlow, P., 2004.** Effects of a gerF (lgt) mutation on the germination of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 186, 2984-2991.
- Igura, N., Kamimura, Y., Islam, M.S., Shimoda, M., Hayakawa, I., 2003.** Effects of minerals on resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6307-6310.
- Ireland, J.A.W., Hanna, P.C., 2002.** Amino acid- and purine ribonucleoside-induced germination of *Bacillus anthracis* Delta Sterne endospores: gerS mediates responses to aromatic ring structures. *Journal of Bacteriology* 184, 1296-1303.

- Keynan, H.S., Sandler, N., 1983.** Spore research in a historical perspective, p2-42. In A. Hurst and G.W. Gould (ed.), *The Bacterial Spore*, vol. 2. Academic Press, London and New York
- Kennedy, M.J., Reader, S.L., Swierczynski, L.M., 1994.** Preservation records of microorganisms - evidence of the tenacity of life. *Microbiology-Sgm* 140, 2513-2529.
- Kobayashi, K., Kuwana, R., Takamatsu, H., 2008.** kinA mRNA is missing a stop codon in the undomesticated *Bacillus subtilis* strain ATCC 6051. *Microbiology-Sgm* 154, 54-63.
- Kunkel, B., Losick, R., Stragier, P., 1990.** The *Bacillus-subtilis* gene for the developmental transcription factor sigma-k is generated by excision of a dispensable dna element containing a sporulation recombinase gene. *Genes & Development* 4, 525-535.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Danchin, A., 1997.** The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249-256.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K.P., Pruss, B.M., Kaplan, T., Wiessner-Gunkel, E., Stewart, G., Scherer, S., 1998.** *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 1373-1382.
- Leggett, M.J., McDonnell, G., Denyer, S.P., Setlow, P., Maillard, J.Y., 2012.** Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology* 113, 485-498.
- Leguerinel, I., Couvert, O., Mafart, P., 2007.** Modelling the influence of the sporulation temperature upon the bacterial spore heat resistance, application to heating process calculation. *International Journal of Food Microbiology* 114, 100-104.
- Lequette, Y., Garenaux, E., Tauveron, G., Dumez, S., Perchat, S., Slomianny, C., Lereclus, D., Guerardel, Y., Faille, C., 2011.** Role Played by Exosporium Glycoproteins in the Surface Properties of *Bacillus cereus* Spores and in Their Adhesion to Stainless Steel. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 4905-4911.
- Leuschner, R.G.K., Lillford, P.J., 1999.** Effects of temperature and heat activation on germination of individual spores of *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology* 29, 228-232.

- Logan, N.A., 2012.** *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of Applied Microbiology* 112, 417-429.
- Loshon, C.A., Genest, P.C., Setlow, B., Setlow, P., 1999.** Formaldehyde kills spores of *Bacillus subtilis* by DNA damage and small, acid-soluble spore proteins of the alpha/beta-type protect spores against this DNA damage. *Journal of Applied Microbiology* 87, 8-14.
- Makino, S., Ito, N., Inoue, T., Miyata, S., Moriyama, R., 1994.** A spore-lytic enzyme released from *Bacillus cereus* spores during germination. *Microbiology* 140, 1403-1410.
- Makino, S., Moriyama, R., 2002.** Hydrolysis of cortex peptidoglycan during bacterial spore germination. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 8, RA119-127.
- Margulis, L., Jorgensen, J.Z., Dolan, S., Kolchinsky, R., Rainey, F.A., Lo, S.C., 1998.** The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 1236-1241.
- Marquis, R.E., Sim, J., Shin, S.Y., 1994.** Molecular mechanisms of resistance to heat and oxidative damage. *Journal of Applied Bacteriology* 76, S40-S48.
- Mazas, M., Lopez, M., Gonzalez, I., Bernardo, A., Martin, R., 1997.** Effects of sporulation pH on the heat resistance and the sporulation of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology* 25, 331-334.
- McKenney, P.T., Driks, A., Eichenberger, P., 2013.** The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology* 11, 33-44.
- Meador-Parton, J., Popham, D.L., 2000.** Structural analysis of *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan during sporulation. *Journal of Bacteriology* 182, 4491-4499.
- Melly, E., Cowan, A.E., Setlow, P., 2002.** Studies on the mechanism of killing of *Bacillus subtilis* spores by hydrogen peroxide. *Journal of Applied Microbiology* 93, 316-325.
- Melly, E., Genest, P.C., Gilmore, M.E., Little, S., Popham, D.L., Driks, A., Setlow, P., 2002.** Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *Journal of Applied Microbiology* 92, 1105-1115.
- Mock, M., Fouet, A., 2001.** Anthrax. *Annual Review of Microbiology* 55, 647-671.
- Moir, A., Lafferty, E., Smith, D.A., 1979.** Genetic-analysis of spore germination mutants of *Bacillus-subtilis* 168 - correlation of phenotype with map location. *Journal of general microbiology* 111, 165-180.

- Moir, A., 1981.** Germination properties of a spore coat-defective mutant of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 146, 1106-1116.
- Moir, A., Corfe, B.M., Behravan, J., 2002.** Spore germination. Cellular and Molecular Life Sciences 59, 403-409.
- Moir, A., 2003.** Bacterial spore germination and protein mobility. Trends in Microbiology 11, 452-454.
- Moir, A., 2006.** How do spores germinate? Journal of Applied Microbiology 101, 526-530.
- Molle, V., Fujita, M., Jensen, S.T., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J.E., Liu, J.S., Losick, R., 2003.** The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology 50, 1683-1701.
- Murell, W.G., Warth, A.D., 1965.** Composition and heat resistance of bacterial spore, p1-125. In L.L. Campbell and H.O. Halvorson (ed.), Spores, Vol. III. ASM Press, Ann Arbor.
- Nakamura, L.K., 1998.** *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 48, 1031-1035.
- Nakashio, S., Gerhardt, P., 1985.** Protoplast dehydration correlated with heat-resistance of bacterial-spores. Journal of Bacteriology 162, 571-578.
- Nguyen Thi Minh, H., Perrier-Cornet, J.M., Gervais, P., 2008.** Effect of the osmotic conditions during sporulation on the subsequent resistance of bacterial spores. Applied Microbiology and Biotechnology 80, 107-114.
- Nguyen Thi Minh, H., Durand, A., Loison, P., Perrier-Cornet, J.-M., Gervais, P., 2011.** Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. Applied Microbiology and Biotechnology 90, 1409-1417.
- Nicholson, W.L., Law, J.F., 1999.** Method for purification of bacterial endospores from soils: UV resistance of natural Sonoran desert soil populations of *Bacillus spp.* with reference to *B.-subtilis* strain 168. Journal of Microbiological Methods 35, 13-21.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P., 2000.** Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64, 548-+.
- Nicholson, W.L., 2002.** Roles of *Bacillus* endospores in the environment. Cell Mol Life Sci 59, 410-416.
- Nicholson, W.L., Schuerger, A.C., Setlow, P., 2005.** The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural

- processes and human spaceflight. Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 571, 249-264.
- Paidhungat, M., Ragkousi, K., Setlow, P., 2001.** Genetic Requirements for Induction of Germination of Spores of *Bacillus subtilis* by Ca²⁺-Dipicolinate. Journal of Bacteriology 183, 4886-4893.
- Paredes, C.J., Alsaker, K.V., Papoutsakis, E.T., 2005.** A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. Nature Reviews Microbiology 3, 969-978.
- Paredes-Sabja, D., Setlow, P., Sarker, M.R., 2009.** SleC Is Essential for Cortex Peptidoglycan Hydrolysis during Germination of Spores of the Pathogenic Bacterium *Clostridium perfringens*. Journal of Bacteriology 191, 2711-2720.
- Paredes-Sabja, D., Setlow, P., Sarker, M.R., 2011.** Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved. Trends in Microbiology 19, 85-94.
- Penna, T.C.V., Machoshvili, I.A., Ishii, M., 2003.** Effect of media on spore yield and thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. Applied Biochemistry and Biotechnology 105, 287-294.
- Piggot, P.J., Hilbert, D.W., 2004.** Sporulation of *Bacillus subtilis*. Current Opinion in Microbiology 7, 579-586.
- Pirttijarvi, T.S.M., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S., 2000.** Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes. International Journal of Food Microbiology 60, 231-239.
- Planchon, S., Dargaignaratz, C., Levy, C., Ginies, C., Broussolle, V., Carlin, F., 2011.** Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 degrees C and 30 degrees C display variations in their properties. Food Microbiology 28, 291-297.
- Popham, D.L., Sengupta, S., Setlow, P., 1995.** Heat, hydrogen-peroxide, and uv resistance of *Bacillus-subtilis* spores with increased core water-content and with or without major dna-binding proteins. Applied and Environmental Microbiology 61, 3633-3638.
- Prüß, B.M., Dietrich, R., Nibler, B., Märtilbauer, E., Scherer, S., 1999.** The Hemolytic Enterotoxin HBL Is Broadly Distributed among Species of the *Bacillus cereus* Group. Applied and Environmental Microbiology 65, 5436-5442.
- Ragkousi, K., Eichenberger, P., van Ooij, C., Setlow, P., 2003.** Identification of a New Gene Essential for Germination of *Bacillus subtilis* Spores with Ca²⁺-Dipicolinate. Journal of Bacteriology 185, 2315-2329.

- Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Vermeulen, A., Andjelkovic, M., Fitz-James, I., in't Veld, P., Denon, Q., Verhe, R., Debevere, J., 2008.** Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Letters in Applied Microbiology* 46, 536-541.
- Rajkovic, A., Tomasevic, I., Smigic, N., Uyttendaele, M., Radovanovic, R., Devlieghere, F., 2010.** Pulsed UV light as an intervention strategy against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of a meat slicing knife. *Journal of Food Engineering* 100, 446-451.
- Riesenman, P.J., Nicholson, W.L., 2000.** Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 620-626.
- Rose, R., Setlow, B., Monroe, A., Mallozzi, M., Driks, A., Setlow, P., 2007.** Comparison of the properties of *Bacillus subtilis* spores made in liquid or on agar plates. *Journal of Applied Microbiology* 103, 691-699.
- Rotman, Y., Fields, M.L., 1967.** A modified reagent for dipicolinic acid analysis. *Anal. Biochem.* 22, 168e169.
- Sarrafzadeh, M.H., Navarro, J.M., 2006.** The effect of oxygen on the sporulation, delta-endotoxin synthesis and toxicity of *Bacillus thuringiensis* H14. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22, 305-310.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998.** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 775-+.
- Setlow, B., Setlow, P., 1980.** Measurement of the pH within dormant and germinated bacterial spores. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA* 77, 2447-2476.
- Setlow, P., 1993.** Spore Structural Proteins. In Hoch, J.A., Losick, R., Sonenshein, A.L (eds), *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetic. ASM Press, Washington, DC, pp. 801-809.
- Setlow, B., Setlow, P., 1994.** Heat inactivation of *Bacillus-subtilis* spores lacking small, acid-soluble spore proteins is accompanied by generation of abasic sites in spore dna. *Journal of Bacteriology* 176, 2111-2113.
- Setlow, B., Setlow, P., 1995.** Small, acid-soluble proteins bound to dna protect *Bacillus-subtilis* spores from killing by dry heat. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2787-2790.
- Setlow, B., Setlow, P., 1996.** Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. *Journal of Bacteriology* 178, 3486-3495.

- Setlow, P., Johnson, E.A., 1997.** Spores and their significance. In Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. (eds), Food microbiology: Fundamentals and frontiers. ASM Press, Washington DC, pp. 30-65.
- Setlow, B., McGinnis, K.A., Ragkousi, K., Setlow, P., 2000.** Effects of major spore-specific DNA binding proteins on *Bacillus subtilis* sporulation and spore properties. Journal of Bacteriology 182, 6906-6912.
- Setlow, B., Melly, E., Setlow, P., 2001.** Properties of Spores of *Bacillus subtilis* Blocked at an Intermediate Stage in Spore Germination. Journal of Bacteriology 183, 4894-4899.
- Setlow, B., Loshon, C.A., Genest, P.C., Cowan, A.E., Setlow, C., Setlow, P., 2002.** Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. Journal of Applied Microbiology 92, 362-375.
- Setlow, P., 2003.** Spore germination. Current Opinion in Microbiology 6, 550-556.
- Setlow, P., 2006.** Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. Journal of Applied Microbiology 101, 514-525.
- Setlow, P., Johnson, E.A., 2007.** Spores and their significance.
- Severson, K.M., Mallozzi, M., Bozue, J., Welkos, S.L., Cote, C.K., Knight, K.L., Driks, A., 2009.** Roles of the *Bacillus anthracis* Spore Protein ExsK in Exosporium Maturation and Germination. Journal of Bacteriology 191, 7587-7596.
- Shinagawa, K., Ueno, Y., Hu, D.L., Ueda, S., Sugii, S., 1996.** Mouse lethal activity of a HEp-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. Journal of Veterinary Medical Science 58, 1027-1029.
- Sonenshein, A.L., 2000.** Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. Current Opinion in Microbiology 3, 561-566.
- Southworth, T.W., Guffanti, A.A., Moir, A., Krulwich, T.A., 2001.** GerN, an Endospore Germination Protein of *Bacillus cereus*, Is an Na⁺/H⁺-K⁺ Antiporter. Journal of Bacteriology 183, 5896-5903.
- Stenfors, L.P., Granum, P.E., 2001.** Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. Fems Microbiology Letters 197, 223-228.
- Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E., 2008.** From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. Fems Microbiology Reviews 32, 579-606.
- Stephenson, K., Hoch, J.A., 2002.** Histidine Kinase-mediated Signal Transduction Systems of Pathogenic Microorganisms as Targets for Therapeutic Intervention. Current Drug Targets - Infectious Disorders 2, 235-246.

- Stragier, P., Losick, R., 1996.** Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. Annual Review of Genetics 30, 297-341.
- Stewart, G., Johnstone, K., Hagelberg, E., Ellar, D.J., 1981.** Commitment of bacterial spores to germinate - a measure of the trigger reaction. Biochemical Journal 198, 101-106.
- Tam, N.K.M., Uyen, N.Q., Hong, H.A., Duc, L.H., Hoa, T.T., Serra, C.R., Henriques, A.O., Cutting, S.M., 2006.** The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. Journal of Bacteriology 188, 2692-2700.
- Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C., Faille, C., 2006.** Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. International Journal of Food Microbiology 110, 254-262.
- Tennen, R., Setlow, B., Davis, K.L., Loshon, C.A., Setlow, P., 2000.** Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid. Journal of Applied Microbiology 89, 330-338.
- Terry, C., Shepherd, A., Radford, D.S., Moir, A., Bullough, P.A., 2011.** YwdL in *Bacillus cereus*: Its Role in Germination and Exosporium Structure. Plos One 6.
- Thackray, P.D., Behravan, J., Southworth, T.W., Moir, A., 2001.** GerN, an antiporter homologue important in germination of *Bacillus cereus* endospores. Journal of Bacteriology 183, 476-482.
- Todd, S.J., Moir, A.J.G., Johnson, M.J., Moir, A., 2003.** Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* Encoding Proteins of the Exosporium. Journal of Bacteriology 185, 3373-3378.
- van der Voort, M., Garcia, D., Moezelaar, R., Abee, T., 2010.** Germinant receptor diversity and germination responses of four strains of the *Bacillus cereus* group. International Journal of Food Microbiology 139, 108-115.
- van der Voort, M., Abee, T., 2013.** Sporulation environment of emetic toxin-producing *Bacillus cereus* strains determines spore size, heat resistance and germination capacity. Journal of Applied Microbiology, n/a-n/a.
- Vepachedu, V.R., Setlow, P., 2004.** Analysis of the germination of spores of *Bacillus subtilis* with temperature sensitive spo mutations in the spoVA operon. Fems Microbiology Letters 239, 71-77.
- Vepachedu, V.R., Setlow, P., 2007.** Role of SpoVA Proteins in Release of Dipicolinic Acid during Germination of *Bacillus subtilis* Spores Triggered by Dodecylamine or Lysozyme. Journal of Bacteriology 189, 1565-1572.

- Waller, L.N., Fox, N., Fox, K.F., Fox, A., Price, R.L., 2004.** Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiological Methods* 58, 23-30.
- Wang, S.T., Setlow, B., Conlon, E.M., Lyon, J.L., Imamura, D., Sato, T., Setlow, P., Losick, R., Eichenberger, P., 2006.** The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology* 358, 16-37.
- Webb, C.D., Decatur, A., Teleman, A., Losick, R., 1995.** Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene-expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus-subtilis*. *Journal of Bacteriology* 177, 5906-5911.
- Wei, J., Shah, I.M., Ghosh, S., Dworkin, J., Hoover, D.G., Setlow, P., 2010.** Superdormant Spores of *Bacillus* Species Germinate Normally with High Pressure, Peptidoglycan Fragments, and Bryostatins. *Journal of Bacteriology* 192, 1455-1458.
- Wekhof, A., 2000.** Disinfection with flash lamps. *Pda Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 54, 264-276.
- Westphal, A.J., Price, P.B., Leighton, T.J., Wheeler, K.E., 2003.** Kinetics of size changes of individual *Bacillus thuringiensis* spores in response to changes in relative humidity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 3461-3466.
- Young, S.B., Setlow, P., 2003.** Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology* 95, 54-67.
- Zuberi, A.R., Moir, A., Feavers, I.M., 1987.** The nucleotide-sequence and gene organization of the *gerA* spore germination operon of *Bacillus-subtilis* .168. *Gene* 51, 1-11.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Vantriet, K., 1990.** Modeling of the bacterial-growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1875-1881.

VALORISATION DES TRAVAUX

1. Publications avec comité de lecture

- **Abbas, A.A.**, Planchon, S., Jobin, M., Schmitt, P., 2014. Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*. Food Microbiology 42, 122-131.
- **Abbas, A.A.**, Planchon, S., Jobin, M., Schmitt, P. A new aerobiosis and anaerobiosis growth and sporulation defined medium for *Bacillus cereus*. A soumettre dans Journal of Microbiological Methods.

2. Communications internationales sous forme de poster avec résumés dans les actes des colloques

- **Abbas, A.A.**, Jobin, M and Schmitt, P (2012). Anaerobic cells of *Bacillus cereus* strains lose their ability to sporulate. 23rd International ICFMH Symposium FoodMicro 2012. Istanbul, 3-7 September, Turquie. Résumé publié dans les actes du colloque ISBN 978-975-561-423-6 (page 345).
- **Abbas, A.A.**, Jobin, M and Schmitt, P (2013). Influence de l'absence d'oxygène sur la sporulation de *Bacillus cereus*. 9ème Congrès de la Société Française de Microbiologie. Lille, 7 et 8 février 2013, France. Résumé publié dans les actes du colloque (page 151).
- **Abbas, A.A.**, Stella Planchon., Jobin, M and Schmitt, P (2014). Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*. The 6th European Spores Conferences. Londres, 9-11 Avril 2014.

3. Communications nationales sous forme de poster avec ou sans résumés dans les actes des colloques

- **Abbas, A.A.**, Planchon, S., Jobin, M and Schmitt, P (2011). Influence de l'oxygène sur la sporulation de *Bacillus cereus*. Journée scientifique des jeunes chercheurs de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. Avignon 16 juin 2011, France.
- **Abbas, A.A.**, Jobin, M and Schmitt, P (2012). Effet de l'oxygène sur la sporulation de *Bacillus cereus*. Journée des Microbiologistes de l'INRA 2012. Isle sur la sorgue, France. Résumé publié dans les actes du colloque (page 152).

23rd International ICFMH Symposium FoodMicro 2012.
Istanbul, 3-7 September, Turquie

Anaerobic cells of *Bacillus cereus* strains lose their ability to sporulate

AMINA ABBAS, MICHEL JOBIN and PHILIPPE SCHMITT

UMR A408 INRA/Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Sécurité et Qualité des Produits
d'Origine Végétale, F-84914 Avignon, France.
amina.abbas@avignon.inra.fr

Bacillus cereus is a spore-forming, facultative anaerobic, Gram positive, rod-shaped that can be isolated from a wide range of environments. Endospore formation is a process that is generally induced by low availability of nutrients in environment. Spores are a metabolically dormant, capable of surviving extremes of temperature, desiccation and ionizing radiation. Entry into sporulation is governed by the master regulator Spo0A that is activated through a cascade of phosphorylation involving kinases and other proteins (Spo0F and Spo0B).

The aim of this study was to understand the effect of absence of oxygen on *B. cereus* sporulation. For this purpose, an appropriate sporulation medium has been developed (namely MODS). This medium contains a mixture of amino acids and minerals supplemented with glucose as fermentative carbon source. The ability of a panel of *B. cereus* strains to sporulate in aerobic and anaerobic conditions has been tested. This panel includes strains belongs to the phylogenetic groups (II to VII) of *B. cereus*.

Our results showed that *B. cereus* lost its capacity to sporulate when the oxygen was absent. Indeed, only F4810/72 strain was able to produce spores (6.10^4 spores/ml). Therefore, in order to understand the negative effect of oxygen depletion on sporulation, we carried out on two strains from *B. cereus* panel including the only strain that sporulated in anoxic condition. Cells grown in controlled batch cultures in MODS. Then, we compared glucose consumption, metabolites production and sporulation ability between these two strains. Finally, genes expression involved in sporulation mechanism (*kinA*, *kinB*, *spo0A*, *spo0F*, *spo0B*, σE , σF , σK and σG) have been studied in aerobic and anaerobic conditions by quantitative real-time PCR.

23rd International ICFMH Symposium FoodMicro 2012.

Istanbul, 3-7 September, Turquie



Anaerobic cells of *Bacillus cereus* reduce their ability to sporulate

Amina Abbas^{1,2}, Michel Jobin^{1,2} and Philippe Schmitt^{1,2}

¹ INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000

² Université d'Avignon, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000



Introduction

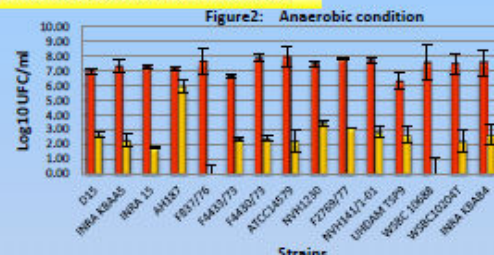
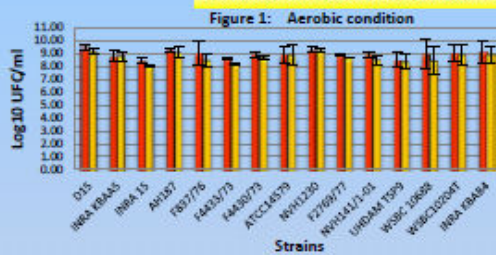
Bacillus cereus is a spores-forming, facultative anaerobic bacterium that can be isolated from a wide variety of environments. Spores are a metabolically dormant and environmentally resistant cell, able to surviving extremes of temperature, desiccation and ionizing radiation (Higgins and Dworkin, 2011). The conditions under which sporulation takes place determine spore properties such as their ability to survive at heat resistance (Atrih and Foster, 2001).

AIM: To determine the ability of sporulation of *Bacillus cereus* in aerobic and anaerobic conditions

To compare the properties of resistance of spores produced in anaerobic and those produced under aerobic conditions

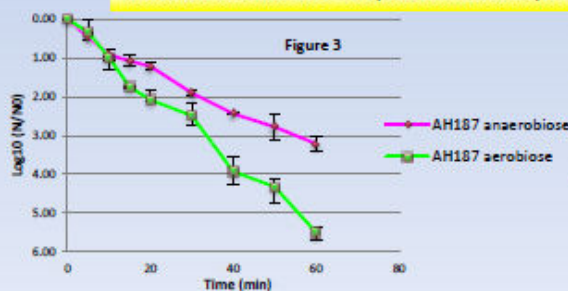
Results

1. Sporulation capacity of the 15 strains studied of *Bacillus cereus* in culture media MOD³



- ❖ To understand the effect of absence of oxygen on the sporulation of *B. cereus*, the aerobic vegetative growth and anaerobic vegetative growth of 15 strains of *B. cereus* were compared in the laboratory medium : MOD³. This medium contains a mixture of amino acids and minerals supplemented with glucose as fermentative carbon source. After harvesting the spores produced, we compared the ability of strains to sporulate in aerobic and anaerobic conditions.
- ❖ Results showed:
 - *Bacillus cereus* strains have a good capacity of sporulation under aerobic conditions. (figure 1). So, this medium is conducive to study sporulation of *B. cereus*.
 - Under anaerobic conditions, strains have a lower sporulation ability . Strain AH187 is one that sporulate best: 10⁶ spores/ml (figure 2).

2. Wet-heat resistance at 95°C of spores of AH187 strain produced in aerobic and anaerobic conditions



- ❖ Strain AH187 was chosen for the study of resistance properties.
- ❖ Wet-heat resistance at 95 C was performed on a spore suspension in capillary tubes heated for 5, 10, 15, 20, 30,40,50 and 60min.
- ❖ Results showed:
 - The spores formed in aerobic conditions were less wet-heat resistant than spores grown in anaerobic conditions

Conclusion

- ❖ Oxygen have an important role in the Mechanisms of sporulation.
- ❖ Sporulation conditions have a great impact on spore resistance.
- ❖ Future research is needed to determine how the oxygen regulates the molecular mecanisms of sporulation.

Authors thank the Algerian and French governments for funding of A.A.A PhD thesis

**9^{ème} Congrès de la Société Française de Microbiologie. Lille, 7
et 8 février 2013, France**

Influence de l'absence d'oxygène sur la sporulation de *Bacillus cereus*

AMINA ABBAS, MICHEL JOBIN and PHILIPPE SCHMITT

UMR A408 INRA/Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Sécurité et Qualité des
Produits d'Origine Végétale, F-84914 Avignon, France.
amina.abbas@avignon.inra.fr

L'objectif de ce travail est d'étudier la sporogénèse de *Bacillus cereus* en anaérobiose afin de comprendre l'effet de l'absence d'oxygène sur la sporulation et la capacité de résistance et de germination des spores ainsi formées.

B. cereus est une bactérie anaérobie facultative sporulante. Les spores, généralement produites en condition de carence nutritionnelle, sont extrêmement résistantes ce qui leur permet de persister dans l'environnement. Elles représentent un problème majeur en industrie alimentaire en qualité d'agents d'altérations ou pathogènes. Elles peuvent survivre aux traitements par la chaleur, les UV, les produits chimiques et les acides. La plupart des travaux sur la sporulation et les spores chez *B. cereus* ont été menés en présence d'oxygène ; peu d'information existent sur la sporulation en anaérobiose. De récents travaux ont permis de structurer les souches de *B. cereus sensu lato* en sept groupes phylogénétiques possédant de plus, une gamme de température de croissance propre à chacun.


Plusieurs souches appartenant aux différents groupes de l'espèce *B. cereus* ont été testées pour leur capacité de sporulation en aérobiose et anaérobiose dans un milieu que nous avons optimisé.

En aérobiose, une bonne sporulation (10^8 spores/ml de milieu de culture) de toutes les souches testées est obtenue. En anaérobiose, il y a peu ou pas de sporulation avec une grande hétérogénéité dans la capacité à sporuler au sein d'un même groupe. La souche AH187 est la souche produisant le plus de spores en anaérobiose, soit 10^5 spores/ml de milieu de culture avec toutefois un rendement de sporulation limité de 7 % environ. Les spores de la souche AH187 sont beaucoup plus thermorésistantes lorsque qu'elles sont formées en anaérobiose plutôt qu'en aérobiose.

L'examen des spores de la souche AH187 en microscopie électronique à transmission après une coloration négative montre une différence dans la forme globale de l'exosporium. Par rapport aux spores produites en aérobiose les spores produites en absence d'oxygène sont entourées d'un exosporium de forme lâche.


Les résultats obtenus montrent que peu de spores sont formées en anaérobiose mais qu'elles sont beaucoup plus thermorésistantes, ce qui représente une caractéristique intéressante, si l'on considère le risque lié à la présence de ce pathogène dans des aliments traités thermiquement et conditionnés en absence d'oxygène.

9^{ème} Congrès de la Société Française de Microbiologie. Lille, 7 et 8 février 2013, France



INRA
SCIENCE & IMPACT

Influence de l'absence d'oxygène sur la sporulation de *Bacillus cereus*



UNIVERSITÉ
D'AVIGNON

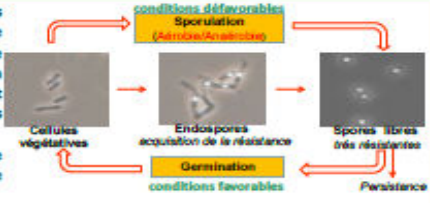
Amina Abbas^{1,2}, Michel Jobin^{1,2}, Philippe Schmitt^{1,2}

1 INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000
2 Université d'Avignon, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000

Introduction

> *B. cereus* est une bactérie anaérobie facultative sporulante. Les spores, généralement produites en condition de carence nutritionnelle, sont extrêmement résistantes ce qui leur permet de persister dans l'environnement. Elles représentent un problème majeur en industrie alimentaire en qualité d'agent d'altération ou pathogène. Elles peuvent survivre aux traitements par la chaleur, les UV, les produits chimiques et les acides. La plupart des travaux sur la sporulation et les spores chez *Bacillus cereus* ont été menés en présence d'oxygène ; peu d'informations existent sur la sporulation en anaérobiose.

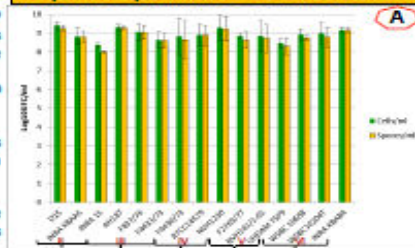
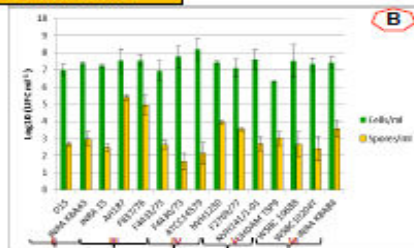
> L'objectif de ce travail est d'étudier la sporogénèse de *B. cereus* en anaérobiose afin de comprendre l'effet de l'absence d'oxygène sur la sporulation et la capacité de résistance et de germination des spores ainsi formées.



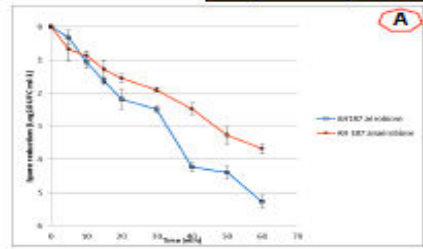
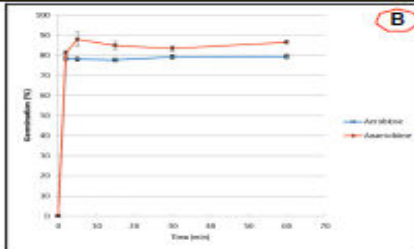
Résultats

1. Capacité de sporulation de 15 souches de *Bacillus cereus* en milieu MOD³

- Bonne sporulation (10^8 à 10^9 spores/ml) de toutes les souches testées en aérobiose (Figure 1A).
- Le milieu MOD³ est propice à l'étude de la sporulation.
- Peu de sporulation des souches testées en anaérobiose (Figure 1B).
- La souche AH187 est la souche produisant le plus de spores (10^5 spores/ml).

2. Propriétés des spores de la souche AH187 de *Bacillus cereus* en anaérobiose et aérobiose





Les spores de la souche AH187 sont plus thermorésistantes lorsqu'elles sont formées en anaérobiose plutôt qu'en aérobiose (Figure 2A).


Les spores de la souche AH187 produites en anaérobiose ont un pourcentage de germination plus élevé que celles produites en aérobiose (Figure 2B).

3. ME à Transmission des spores de la souche AH187 de *Bacillus cereus* (Grossissement x14000)

A Anaérobiose



B Aérobiose




Différence dans la forme globale de l'exosporium. Par rapport aux spores produites en aérobiose (A), les spores produites en absence d'oxygène (B) sont entourées d'un exosporium de forme lâche.


Conclusion

- L'absence d'oxygène réduit la capacité de sporulation des souches de *B. cereus*.
- Différence dans l'ultrastructure, la thermorésistance et la germination des spores de *B. cereus* produites en absence et présence d'oxygène.


Les auteurs remercient Isabelle Bonard pour sa participation à la réalisation des photographies de MET ainsi que le ministère espagnol de l'Enseignement supérieur et de la recherche scientifique pour le soutien financier.



Centre Iera Provence-Alpes-Côte d'Azur
Domaine Saint-Masise
Site Agroparc
CS 40509
84914 Avignon Cedex 9



sfm
Société Française de Microbiologie



6th European Spores Conferences Londres, 9-11 Avril 2014

Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*

AMINA ABBAS, STELLA PLANCHON, MICHEL JOBIN and PHILIPPE SCHMITT

UMR A408 INRA/Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84914 Avignon, France.
amina.abbas@avignon.inra.fr


The *Bacillus cereus* group is formed of ubiquitous Gram-positive facultative anaerobic endospore-forming bacteria. It comprises seven phylogenetically close species: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus cytotoxicus* and *Bacillus cereus sensu stricto*. Under environmental stress conditions such as nutrient deprivation, *B. cereus* cells are able to produce spores. Spores are able to resist chemical and physical stresses such as air-drying, high temperature, high pressure, UV light and acidity. Under suitable conditions, *B. cereus* spores are able to germinate and revert to life as vegetative cells responsible for toxins production.

The different environments where sporulation takes place present numerous temperatures and nutrient conditions affecting various spore properties, including resistance to many different stress factors, structure and composition. In *B. cereus* and *B. subtilis*, the effect of temperature and nutrient conditions on spore resistance to heat, UV and chemicals and germination has been extensively studied. Few studies on the effect of anaerobiosis on sporulation of the *B. cereus* group have been published except the effect of oxygen on the sporulation capacity of *B. thuringiensis* but spore properties were not studied. Most studies on sporulation in anaerobic condition were performed with the anaerobic clostridia species. However, *B. cereus* vegetative cells can be found in a large variety of natural environments with low oxygen level (intestine, soil or on food processing line) where sporulation can take place. Then, spores of *B. cereus* can be found in various food processing intermediates and foods products. Spores produced in these anaerobic environments could have particular properties and cause a problem of food safety.

The aim of this work was to investigate the sporulation capacity of *B. cereus* in an anaerobiosis environment. In this work, a panel of strains belonging to *B. cereus* phylogenetic groups II to VII was studied for their capacity to sporulate in anaerobiosis in an appropriate sporulation medium that we developed (MODS). In anaerobiosis, sporulation ability was weaker and more heterogeneous than in aerobiosis. Among tested strains, *B. cereus* AH187 produced the highest level of spores in anaerobiosis. This strain was therefore chosen to study heat resistance, chemical resistance, germination capacity, spore size and structure. Spores produced in anaerobiosis were more resistant to wet heat at 90 °C, 92.5 °C, 95 °C, 97.5 °C and 100 °C. Spores produced in anaerobiosis were also more resistant to 1 M NaOH, 1 M nitrous acid and pulsed light at fluences of 0.34 J cm⁻² and 0.49 J cm⁻². No difference in resistance to UV-C, 5 % hydrogen peroxide or 0.25 mM formaldehyde was observed between these two conditions. In the presence of L-alanine, spores produced in anaerobiosis germinated more efficiently than spore produced in aerobiosis.


No difference in germination was observed with inosine as inducer. No difference in the size of spores produced in the different conditions was observed by transmission electron microscopy. However, spores obtained under anaerobic conditions had a damaged exosporium, or in some cases a completely detached exosporium, unlike spores produced under aerobic conditions.

6th European Spores Conferences Londres, 9-11 Avril 2014



INRA
SCIENCE & IMPACT

Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*



UNIVERSITÉ
D'AVIGNON

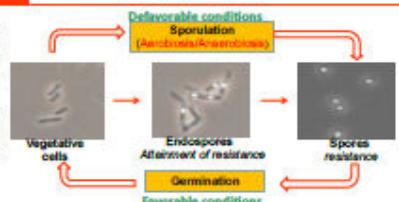
Unité ou Equipe : Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale

Amina Aicha Abbas^{1,2}, Stella Planchon^{1,2†}, Michel Jobin^{1,2}, Philippe Schmitt^{1,2}

1 INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000
 2 Université d'Avignon, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000
 † present address: CTCPA - UMT Qualiveg, Site Agroparc, 449 avenue Clément Ader, ZA de l'Aéroport - BP21203, 84911 Avignon Cedex 9

Introduction

- The *Bacillus cereus* group is formed of ubiquitous Gram-positive facultative anaerobic endospore-forming bacteria. Under environmental stress conditions such as nutrient deprivation, *B. cereus* cells are able to produce spores. Spores are able to resist chemical and physical stresses such as air-drying, high temperature, high pressure, UV light and acidity. Under suitable conditions, *B. cereus* spores are able to germinate and revert to life as vegetative cells responsible for toxin production.
- The different environments where sporulation takes place present numerous temperatures and nutrient conditions affecting various spore properties, including resistance to many different stress factors, structure and composition. In *B. cereus* and *B. subtilis*, the effect of temperature and nutrient conditions on spore resistance to heat, UV and chemicals and germination has been extensively studied. Few studies on the effect of anaerobiosis on sporulation of the *B. cereus* group have been published.
- The aim of this work was to investigate the sporulation capacity of *B. cereus* in an anaerobiosis environment.



Results

1. Sporulation capacity of *B. cereus* strains in uncontrolled batch culture in MODs

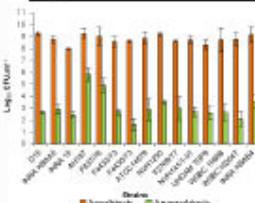
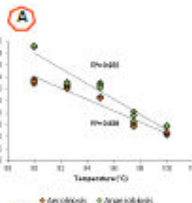


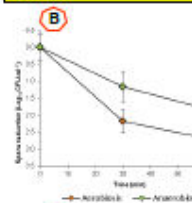
Table 1: Sporulation of 12 strains of *B. cereus* in MODs medium in aerobiosis and anaerobiosis

- ☐ In the presence of oxygen, all the strains sporulated, with an average of 8×10^8 spores ml⁻¹, corresponding to a sporulation rate of 77 ± 3.93%
- ☐ In anaerobiosis, strains displayed lower sporulation ability than in aerobiosis, with an average of 5×10^7 spores ml⁻¹, corresponding to a 0.25 ± 0.17% sporulation rate.
- ☐ The highest amount of spores produced was 6.75×10^8 spores ml⁻¹ for the strain AH187 and the lowest amount was 2.73×10^7 spores ml⁻¹ for the F4436/73 strain.
- ☐ No correlation was noted between sporulation capacity and phylogenetic group.
- ☐ The *B. cereus* AH187 strain was chosen for further characterization of sporulation and spore properties because this strain was the best spore producer in the absence of oxygen among the tested strains.

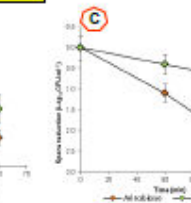
2. Spore properties of the *B. cereus* AH187 strain in anaerobiosis and aerobiosis



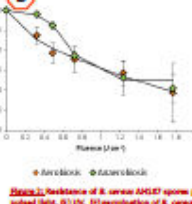
A



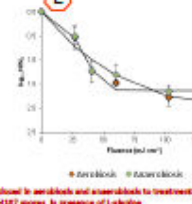
B



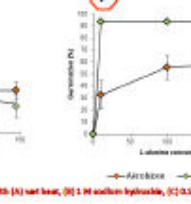
C



D



E



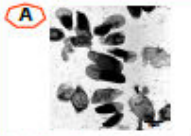
F

Table 2: Resistance of *B. cereus* AH187 spores produced in aerobiosis and anaerobiosis to treatments with (A) wet heat, (B) 1 M sodium hydroxide, (C) 0.1 M nitrous acid, (D) pulsed light, (E) UV.

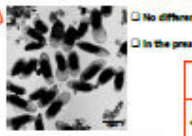
Table 3: Germination of *B. cereus* AH187 spores in presence of L-alanine.

- ☐ Spores produced in anaerobiosis were more resistant to wet heat at 90 °C, 92.5 °C, 95 °C, 97.5 °C and 100 °C. The most important difference in D value between spores produced in both conditions was at 90 °C where spores obtained in anaerobiosis were highly heat resistant ($D_{90} = 81.87 \pm 2$ min) compared to spores obtained in aerobiosis ($D_{90} = 23.09 \pm 1.70$ min). This difference decreased greatly with increasing temperature (A).
- ☐ Spores produced in anaerobiosis were also more resistant to 1 M NaOH (B), 1 M nitrous acid (C) and pulsed light (D) at fluences of 0.54 J cm⁻² and 0.49 J cm⁻².
- ☐ No difference in resistance to UV-C was obtained between spore produced in anaerobiosis and aerobiosis (E).
- ☐ In the presence of L-alanine, spores produced in anaerobiosis germinated more efficiently than spore produced in aerobiosis (F).

3. Spore size, morphology and structure



A



B

Table 4: Transmission electron microscopy of *B. cereus* AH187 spores formed in MODs at 37 °C in aerobiosis (A) and anaerobiosis (B).


- ☐ Lengths and widths of spores produced in anaerobiosis or in aerobiosis showed no significant difference.
- ☐ For spores produced in anaerobiosis, 68% displayed a damaged exosporium or completely separated exosporium with free exosporium fragments (A).
- ☐ Under aerobic conditions, only 13% of spores had a damaged exosporium (B).

Conclusion

- ✦ This study shows that few spores are formed under anaerobic condition; nevertheless, this condition has an impact on the spore properties of *B. cereus* AH 187 strain.
- ✦ Spores obtained under anaerobic condition were more resistant to heat and to some chemical compounds. This is an important feature, considering the risk associated with the presence of this pathogen in thermally processed and packaged food in absence of oxygen


Amina Aicha Abbas received a fellowship from the Programme Intergouvernemental Franco-Algérien. This work was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche under the project Food-Redox, ANR-11-ALID-001-04

We thanks Isabelle Bomard for the microscopic imaging (INRA, Unité de Pathologie Végétale, Laboratoire de microscope, F-84143 Montfavet)



INRA
SCIENCE & IMPACT

Centre Inra Provence-Alpes-Côte d'Azur
 Domaine Saint-Maurice
 Site Agroparc
 CS 40009
 84914 Avignon Cedex 9



**Journée scientifique des jeunes chercheurs de l'Université
d'Avignon et des Pays de Vaucluse. Avignon 16 juin 2011, France**
Capacité de sporulation de *Bacillus cereus* en absence d'oxygène


AMINA ABBAS, MICHEL JOBIN and PHILIPPE SCHMITT

UMR A408 INRA/Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Sécurité et Qualité des Produits
d'Origine Végétale, F-84914 Avignon, France.
amina.abbas@avignon.inra.fr

Bacillus cereus est un bacille à Gram positif, anaérobie facultatif, capable de former des endospores. Six espèces ont été identifiées comme appartenant à ce groupe : *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* et *Bacillus cereus sensu stricto*, agent de toxi-infections alimentaires grâce à la production de toxines émétiques ou diarrhéiques. Dans un environnement défavorable, les spores sont hautement résistantes au stress et se disséminent largement dans l'environnement où elles peuvent devenir des contaminants des aliments. Ces derniers subissent parfois des traitements thermiques modérés (pasteurisation) qui détruirait les cellules végétatives ; les spores quant à elles ne sont pas détruites.


Dans le cadre de la maîtrise des flores pathogènes et d'altération des produits alimentaires, nous cherchons à définir l'effet de l'anaérobiose sur la sporulation de *Bacillus cereus*. Pour cela, des cultures en batch non régulé ont été réalisées dans le milieu MODS que nous avons optimisé et ceux en aérobiose et anaérobiose. Les résultats montrent que le pourcentage de sporulation diminue énormément de l'aérobiose vers l'anaérobiose. *B. cereus* sporule mieux en aérobiose. L'absence d'oxygène doit être un stress pour les cellules.

Journée scientifique des jeunes chercheurs de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. Avignon 16 juin 2011, France




Capacité de sporulation de *Bacillus cereus* ATCC14579 en absence d'oxygène
Amina Abbas, Stella Planchon, Michel Jobin, Philippe Schmitt

UMR A408 INRA/ Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84924 Avignon, France



Contexte



Objectif

- Améliorer le rendement de sporulation de la souche séquencée ATCC 14579 en aérobie et anaérobie, en apportant des modifications au milieu chimiquement défini MOD.

Introduction

Le groupe *Bacillus cereus sensu lato* comprend des bacilles ubiquistes, à Gram positif, aéro-anaérobie facultatifs, capables de former des spores. Les spores sont extrêmement résistantes ce qui leur permet de persister dans l'environnement ; elles sont donc un problème majeur en industrie alimentaire(1, 2). Dans le cadre de la maîtrise des flores pathogènes et d'altération des produits alimentaires, nous cherchons à définir l'effet de l'anaérobiose sur la sporulation de *Bacillus cereus*.

Résultats

- Pour augmenter le rendement de sporulation, 3 modifications ont été apportées au milieu MOD:
 - Modifications nutritionnelles:** Ajout de minéraux.
Diminution de la concentration en glucose et en acides aminées.
 - Modification physico-chimique:** Ajout de tampon pour éviter la chute du pH.
 - Modification énergétique:** Ajout de nitrates pour apporter plus d'énergie à la cellule afin qu'elle sporule.

Sporulation de l' ATCC 14579

- Les cultures réalisées en MOD modifié donnent des cellules en bon état ainsi que des spores libres alors que les cultures réalisées en MOD classique ne produisent pas de spores.

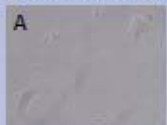
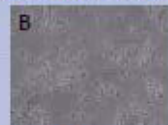







Figure 1: Observations microscopiques de la souche ATCC14579 en MOD classique en aérobie (A) et anaérobie (C) et en MOD modifié aérobie (B) et anaérobie (D).

- La modification du milieu MOD a eu un important effet sur la sporulation de la souche.

Conditions Paramètres	Aérobiose		Anaérobiose	
	MOD classique	MOD modifié	MOD classique	MOD modifié
Observations microscopiques des spores	Pas de spores	Endospores + spores libres	Pas de spores	Présence de spores libres
Concentration en spores(spores/ml)	0	2.10 ⁸	0	2.5.10 ⁸

Tableau 1: Observation et Concentration finale des spores dans les deux conditions.

Diversité des souches

- Le pourcentage de sporulation diminue énormément de l'aérobiose vers l'anaérobiose. Les souches sporulent mieux en aérobie. L'absence de l'oxygène doit être un stress pour les cellules.


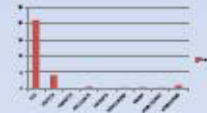



Figure 2: Pourcentage de sporulation des souches de *Bacillus cereus* en aérobie (A) et en anaérobiose (B).

Conclusion

Nos résultats ont montré que:

- Toutes les modifications apportées au milieu MOD ont permis d'obtenir des spores en aérobie et en anaérobiose.
- L'étude de la diversité des souches a permis de constater que la souche ATCC14579 n'était pas la mieux adaptée pour l'étude de la sporulation.

Ce travail sera complété par une étude plus spécifique incluant la résistance de ces spores à la chaleur et le stress acide et la détermination de l'expression de gènes de régulateurs clés.

© J. Marzilli, K.J. Wu, S.Y. Ding, 2004. Molecular mechanisms of resistance to heat and oxidative damage. *ICC Appl Microbiol* 23, 402-408

© J. Nishitani, W.C. Mankala, N. Horvath, G. Mankal, H.J. Salinas, P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to various terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64: 52-72.

Journée des Microbiologistes de l'INRA 2012. Isle sur la sorgue,
France

Effet de l'oxygène sur la sporulation de *Bacillus cereus*

AMINA ABBAS, MICHEL JOBIN, PHILIPPE SCHMITT

UMR A408 INRA/Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Sécurité et Qualité des Produits
d'Origine Végétale, F-84914 Avignon, France.
amina.abbas@avignon.inra.fr

Bacillus cereus est une bactérie à Gram positif, sporulante, anaérobie facultative. Le groupe *B.cereus* sensu lato inclus sept espèces extrêmement proches génétiquement: *B.anthraxis*, *B.thuringiensis*, *B.mycoides*, *B.pseudomycooides*, *B.weihenstephanencis*, *B.cytotoxicus* et *B.cereus sensu stricto*. De récents travaux ont permis de classer ces souches dans sept groupes phylogénétiques possédant une gamme de température propre à chacun.


Les spores constituent une préoccupation majeure dans l'industrie alimentaire à cause de leur extrême résistance à la chaleur, aux UV, aux traitements chimiques et à l'acidité ainsi que leur persistance dans l'environnement.

L'objectif de ce travail est de comprendre l'effet de l'oxygène sur la sporulation des souches de *Bacillus cereus*.

Dans un premier temps, un milieu favorable à la sporulation appelé MODS a été mis au point. Une étude de la capacité de sporulation de *B.cereus* en absence et présence d'oxygène a été réalisée. 25 souches appartenant aux différents groupes de *B.cereus* ont été testées. Les résultats montrent qu'en aérobiose, une bonne sporulation des souches est obtenue avec une moyenne de 10^8 spores/ml de milieu. En anaérobiose, il y a peu ou pas de sporulation avec une grande hétérogénéité dans la capacité à sporuler au niveau des groupes. La meilleure candidate est la souche F4810/72 qui produit en anaérobiose environ 10^5 spores /ml de culture avec un rendement de 7 % environ.

Les spores de la F4810/72 produites en présence et absence d'oxygène ont été caractérisées quant à leur thermorésistance. On remarque une meilleure thermorésistance des spores produites en anaérobiose.



Journée des Microbiologistes de l'INRA 2012. Isle sur la sorgue, France



Influence of anaerobiosis on the sporulation and spore properties of *Bacillus cereus*

Amina Abbas^{1,2}, Michel Jobin^{1,2} and Philippe Schmitt^{1,2}


¹ INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000
² Université d'Avignon, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000

Introduction

Bacillus cereus is a spore-forming, facultative anaerobic bacterium that can be isolated from a wide variety of environments. Spores are metabolically dormant and environmentally resistant forms, able to survive to extreme temperatures, desiccation and ionizing radiations. The conditions under which sporulation occurs determine spore properties such as their heat-resistance.

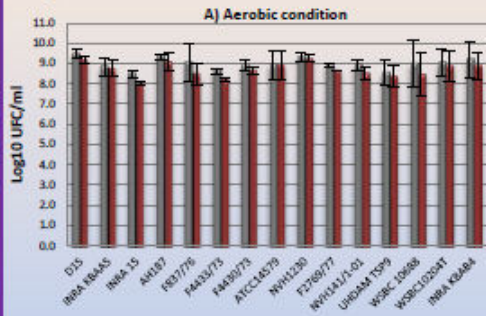
AIM: To determine the ability of sporulation of different strains of *Bacillus cereus* in aerobic and anaerobic conditions
 To compare resistance properties of spores produced in anaerobic versus aerobic conditions



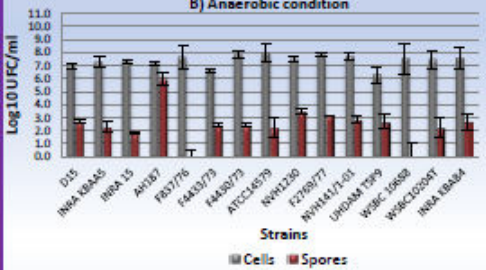
1. Sporulation capacity of 15 strains of *Bacillus cereus* in MOD² media

Figure 1

A) Aerobic condition



B) Anaerobic condition



◆ To understand the effect of the absence of oxygen on the sporulation of *B. cereus*, the aerobic and anaerobic vegetative growth and spore formation of 15 *B. cereus* strains were compared in the MOD² medium. This medium contains a mixture of amino acids and minerals supplemented with glucose as fermentative carbon source.

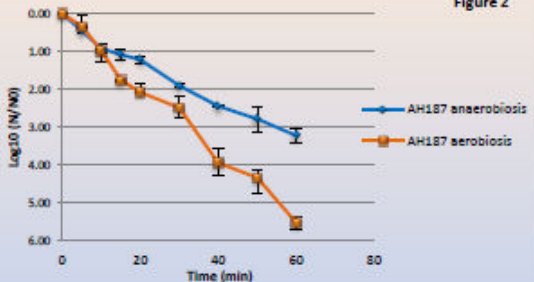
Results showed:

- ◆ *Bacillus cereus* tested strains have a good capacity of sporulation under aerobic conditions. (Figure 1 A). So, this medium is convenient to study sporulation of *B. cereus*.
- ◆ Under anaerobic conditions, strains have a lower sporulation ability. The best rate of sporulation (10⁶ spores/ml) was obtained for strain AH187 under anaerobiosis (Figure 1B).

Results

2. Wet-heat resistance at 95°C of spores of *B. cereus* AH187 strain produced in aerobic and anaerobic conditions

Figure 2



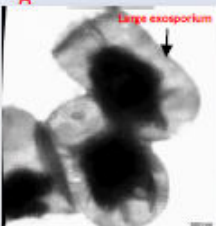
◆ Wet-heat resistance was performed on a spore suspension in capillary tubes heated for 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 and 60 min at 95°C.

Results showed that the spores formed in anaerobic conditions were more wet-heat resistant than spores produced in aerobic conditions.

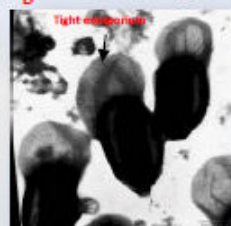
3. Observations by transmission electronic microscopy of *B. cereus* AH187 spores produced in aerobic and anaerobic conditions

Figure 3

A



B



◆ TEM ultrastructure of negatively stained *B. cereus* AH187 spores, produced in anaerobic (Figure 3A) and aerobic (Figure 3B) conditions.

We observed a difference in the form of exosporium: it was larger in spores produced in absence of oxygen.

Conclusion

- ◆ Absence of oxygen has an important impact on the sporulation capacities of several *B. cereus* strains.
- ◆ Sporulation in anaerobiosis increases spore heat-resistance.
- ◆ Future research is needed to determine which molecular mechanism is involved in the difference of sporulation capacity between aerobiosis and anaerobiosis.

Authors thank Isabelle Bonnard for help in the TEM analysis and the Algerian government for funding of A.A PhD thesis

Résumé

L'effet de la température et de la composition du milieu en nutriments sur les propriétés des spores (résistance et germination) de *B. cereus* a été largement étudié contrairement à l'effet de l'anaérobiose. Or, les cellules végétatives de *B. cereus* peuvent se retrouver dans une grande variété de milieux naturels avec un faible niveau d'oxygène (intestin, sol, lignes de traitement des aliments...) où la sporulation peut avoir lieu. Les spores produites dans ces conditions anaérobies pourraient donc avoir des propriétés particulières. Dans ce travail, un panel de 18 souches de *B. cereus* appartenant aux groupes phylogénétiques de II à VII a été étudié pour sa capacité à sporuler en anaérobiose dans un milieu de sporulation approprié que nous avons développé (MODS). En anaérobiose, la capacité de sporulation a été plus faible et plus hétérogène qu'en aérobiose. La souche AH187 a produit le niveau de spores le plus important en anaérobiose, elle a donc été choisie pour étudier les propriétés de ces spores. Les spores produites en anaérobiose étaient plus résistantes à la chaleur humide entre 90°C et 100°C, à 1M de NaOH, 1M d'acide nitreux et à la lumière pulsée. Aucune différence dans la résistance à 5 % de peroxyde d'hydrogène ou à 0.25 mM de formaldéhyde, ni aux UV-C, n'a été observée entre les deux conditions. En présence de L- alanine, les spores produites en anaérobiose germaient plus efficacement que celles produites en aérobiose tandis qu'aucune différence dans la germination n'a été observée en présence d'inosine. Aucune différence dans la taille des spores produites dans les deux conditions n'a été observée par microscopie électronique à transmission. Toutefois, les spores obtenues dans des conditions anaérobies avaient un exosporium endommagé ou dans certains cas un exosporium complètement détaché, contrairement aux spores produites dans des conditions aérobies. Afin de comprendre les différences dans la capacité de sporulation de *B. cereus* entre les 2 conditions, des PCR en temps réel (RT-PCR) ont été utilisées pour étudier l'expression des gènes de l'initiation de la sporulation *spo0A*, *spo0B*, *spo0F*, *KinA* et *kinB*. Les cinétiques d'expressions des gènes *spo0A*, *spo0B*, *spo0F* et *KinA* avaient la même tendance. Ils étaient caractérisés par une expression plus élevée en anaérobiose par rapport à l'aérobiose au début et à la fin de la phase exponentielle de croissance. En outre, l'expression du gène *kinB* était caractérisée par une augmentation en anaérobiose par rapport à l'aérobiose pour atteindre un pic entre 4 h (milieu de phase exponentielle) et 6 h (début de phase stationnaire) de croissance. Les gènes *spo0A*, *spo0B*, *spo0F*, *KinA* et *kinB* sont exprimés de manière différentielle entre l'aérobiose et l'anaérobiose. Ces données pourraient aider à comprendre la différence de capacité de sporulation de *B. cereus* entre la condition aérobie et anaérobie.

Abstract

The effect of temperature and nutrient composition of the medium on *B. cereus* spore properties (resistance and germination) has been extensively studied unlike to the effect of anaerobiosis. Nevertheless, *B. cereus* vegetative cells can be found in a large variety of natural environments with low oxygen level (intestine, soil, food processing line) where sporulation take place. Spores produced in these anaerobic environments could have particular properties. In this work, a panel of *B. cereus* strains belonging to phylogenetic groups II to VII was studied for their capacity to sporulate in anaerobiosis in an appropriate sporulation medium we developed (MODS). In anaerobiosis, sporulation ability was lower and more heterogeneous than in aerobiosis. The *B. cereus* AH187 strain produced the highest level of spores in anaerobiosis, it was therefore chosen to study spore properties. Spores produced in anaerobiosis were more resistant to wet heat from 90°C to 100 °C, 1M NaOH, 1M nitrous acid and pulsed light. No difference in resistance to 5 % hydrogen peroxide or 0.25 mM formaldehyde or UV-C was observed between these two conditions. In the presence of L-alanine, spores produced in anaerobiosis germinated more efficiently than spore produced in aerobiosis. No difference in germination was observed with inosine. No difference in the spores size produced in the two conditions was observed by transmission electron microscopy. However, spores obtained under anaerobic conditions had a damaged exosporium, or in some cases a completely detached exosporium, unlike spores produced under aerobic conditions. To understand differences in sporulation ability between both conditions, Real-time reverse transcription-PCR was used to study the expression the expression of sporulation initiation genes *spo0A*, *spo0B*, *spo0F*, *kinA* and *kinB*. The kinetics of gene expression *spo0A*, *spo0B*, *spo0F* and *kinA* had the same trend. They were characterized by a higher expression in anaerobiosis compared to aerobiosis at the beginning and the end of exponential growth phase. Furthermore, *kinB* gene expression was characterized by an increase in anaerobiosis compared to aerobiosis to achieve a peak between 4 (middle exponential phase) and 6 (early stationary phase) hours of growth. The *spo0A*, *spo0B*, *spo0F*, *kinA* and *kinB* genes are differentially expressed between aerobiosis and anaerobiosis. These data may help to understand the difference in *B. cereus* sporulation capacity between aerobic and anaerobic condition.
