



HAL
open science

Approche combinatoire pour la caractérisation des souches de *Bacillus cereus* à l'origine d'infections chez l'Homme

Benjamin Glasset

► **To cite this version:**

Benjamin Glasset. Approche combinatoire pour la caractérisation des souches de *Bacillus cereus* à l'origine d'infections chez l'Homme. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLA026 . tel-02434728

HAL Id: tel-02434728

<https://theses.hal.science/tel-02434728>

Submitted on 10 Jan 2020

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

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

NNT : 2016SACLA026

**THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
AGROPARISTECH (INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES
DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT)**

**ECOLE DOCTORALE ABIES N°581
Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et Santé
Spécialité de doctorat : Microbiologie**

Par

Monsieur Benjamin Glasset

**Approche combinatoire pour la caractérisation des souches
de *Bacillus cereus* à l'origine d'infections chez l'Homme**

Thèse présentée et soutenue à « AgroParisTech - 16, rue Claude Bernard - F 75231 PARIS cedex 05 », le « 08/12/2016 » :

Composition du Jury :

M. Colin Tinsley, Professeur AgroParisTech, AgroParisTech
Mme Sophie Jan, Maitre de conférences, AgroCampus Ouest, Rennes
M. Frédéric Carlin, Directeur de Recherche, INRA, Avignon
M. Raymond Ruimy, Professeur d'Université-Praticien Hospitalier, CHU Nice
Mme Nathalie Jourdan-Da Silva, Médecin épidémiologiste, Santé Publique France
Mme Anne Brisabois, Directeur de Recherche, ANSES, Maisons-Alfort
Mme Nalini Rama Rao, Chargée de Recherche, INRA MICALIS, Jouy-en-Josas
Mme Sabine Herbin, chef de projet, ANSES, Maisons-Alfort

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinatrice
Directrice de thèse
Directrice de thèse
Superviseur de thèse - Invitée

REMERCIEMENTS

J'ai réalisé ce travail en cotutelle au sein de l'unité SBCL (Staphylocoque, Bacillus, Clostridium et lait) de l'ANSES de Maisons-Alfort, sous la direction d'Anne Brisabois et l'encadrement de Sabine Herbin, et au sein de l'INRA Micalis de Jouy-en-Josas, sous la direction de Nalini Ramarao.

Je souhaite remercier Anne, Nalini et Sabine pour tout ce qu'elles m'ont appris, leurs nombreux conseils et le temps qu'elles ont pu m'accorder tout au long de ce doctorat. Elles ont fait preuve d'un grand sens critique qui m'a toujours remis en question, ce qui m'a permis d'évoluer et de progresser durant ces trois années. Merci également d'avoir accepté de subir ma préparation de triathlon et mes journées de grosse fatigue. Pour tout cela, je vous en remercie énormément.

Je remercie le directeur Laurent Laloux de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de sécurité des aliments de l'ANSES de Maisons-Alfort. Je remercie également Jacques-Antoine Hennekinne de m'avoir accueilli dans l'unité SBCL et d'avoir su être disponible dans la préparation de mon manuscrit et de ma soutenance, ainsi que de son accompagnement dans la préparation des comités de pilotage de l'UMT ARMADA.

Je remercie le chef d'unité Stéphane Aymerich de m'avoir accueilli au sein de l'INRA Micalis de Jouy-en-Josas.

Je remercie vivement Sophie Jan et Frédéric Carlin d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en qualité de rapporteurs. Je remercie également Nathalie Jourdan-Da Silva, Colin Tinsley et Raymond Ruimy d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je remercie Valentin Loux, Pierre Nicolas et particulièrement Cyprien Guérin, membres de l'équipe de la plateforme MIGALE, qui m'ont énormément aidé dans l'analyse de mes données de séquençage.

Je remercie toute l'équipe de la plateforme de séquençage Imagif du CNRS de Gif-sur-Yvette pour leur apport dans mon projet de thèse et leur disponibilité.

Je remercie Sophie Granier pour sa participation au projet, sa gentillesse et de m'avoir initié à l'antibiorésistance.

Un grand merci à Rozenn Dervyn et Joël Grout pour leur fabuleux apport technique et le partage de leur très grande expérience.

Je remercie Muriel Marault, Marie-Léone Vignaud, Sabine Messio, Sylvie Pairaud, Florence Guillier, Thi Trinh Tam Dao, Frédérique Moury, Patricia Ng, Anne-Laure Lardeux, Isabelle Mutel, Rabeb Hennekinne, Laurence Bouhier, Aurélien Maillet, Jean-François Mariet, Damien Michelin, Claude Oudart, Renaud Lailler, Pascal Bouchez, Marc Bourgeois et Laurent Guillier pour ces deux années passées à vos côtés, tous ces bons moments et nos nombreuses discussions.

Je remercie mes sparring-partners sur mes entraînements de courses à pied du midi. Merci à Olivier Firmesse, Jean-Rémi, Ronel et Vincent. C'était un plaisir de souffrir à vos cotés.

Je remercie toutes les personnes qui ont partagé à un moment ou à un autre les bureaux de l'open space de l'ANSES. Je pense bien évidemment aux indétrônables et incroyables Sabine Delannoy, Noémie Vingadassalon et Cédric Woustra, mais aussi à Mélanie Rodriguez, Joséphine Jacques André Coquin, Ludivine Bonanno, Karol Romero, Angélique, Clémentine Henry, Aubin Fleiss, Hattie Webb, Sarah Ison, Josh Ison, Mélissa Amirouche et Byron Chaves. Vous avez su rendre mes journées bien agréables et je garderai de très bons souvenirs de tous nos afterworks.

Je remercie tous les membres de l'équipe MicrobAdapt de l'INRA pour leurs échanges, avis et conseils sur mes travaux de thèse.

Je remercie mes collègues de bureaux de l'INRA Oriana Rossi, Seav-ly Tran, Constance Porrini, Frank Gérard, Momar Mbow et Emmanuel Cuervo. Vous êtes toutes et tous des personnes formidables.

Je remercie tous mes copains de l'INRA, je pense à Laetitia Joubert, Mounia Kortebi, Guy Assou, Laurent Consentino, Gérald Kenanian, Jean-Baptiste Dagieu, Simon Palussiere, Renaud Pourpre et Geoffroy Lescure. À l'heure où j'écris ces lignes, je souris d'avance à l'idée du « lasers, bières et saucisses » qui nous attend vendredi.

Un grand merci à Chayma Gandouz et Mylène Sperry, les deux stagiaires que j'ai encadrées et qui ont marqué mes travaux de thèse. Merci pour tout le travail que vous avez fourni, vos idées et surtout pour m'avoir supporté durant ces quelques mois.

Je remercie chaleureusement Anaïs Overney et Clémentine Fojcik. Anaïs, j'ai eu beaucoup de plaisir à traverser toutes ces épreuves à tes cotés. Ces deux années où nous avons tout partagé ont été supers, que ce soit dans les bons et les mauvais moments. Ton incroyable gentillesse me marquera toute ma vie. Clémentine, ton rire et ta bonne humeur ont égaillé cette dernière année de thèse. Te parler est devenu une constante indispensable aux bons déroulements de mes journées. Et malgré tous nos désaccords et l'agacement que tu provoques chez moi à avoir toujours raison, tu es une amie pour moi aujourd'hui.

Je remercie mes amis de l'US PALAISEAU TRIATHLON, avec vous j'ai appris à me dépasser à chaque entraînement, supporter la souffrance et aller au-delà. Mention spéciale à Serge Kana, Guillaume Malaubier, Stéphane Renaud, Xavier Couget et Nicolas Gernigon.

Je remercie tous mes amis, de Sup'Biotech et d'ailleurs. Je ne peux malheureusement pas tous vous citer mais le cœur y est. Une pensée spéciale à l'intention de mes frères de cœur David Michaud, Nicolas Ferrière, Bastien Untrauer et Jean Philippe Delsuc.

Je remercie ma sœur Juliette et mes parents, Isabelle et Jean-Luc, parce que sans vous je ne serai pas là aujourd'hui et parce que la famille c'est bien évidemment le plus important !!

Enfin, merci à Olympe, pour tous ces sacrifices que tu as consenti, pour la femme que tu es et ce que tu m'apportes au quotidien.

RAPPORT QUALITE POUR LE MEMOIRE DE THESE DE BENJAMIN GLASSET

« ACRONYME DE LA THESE : VIRBAC »

Depuis 1990, le laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses a mis en place une démarche qualité. Il est doté d'une mission *Qualité* rattachée à la direction du laboratoire. Le laboratoire est accrédité par le COFRAC selon le référentiel NF EN ISO 17025 (portée disponible sur www.cofrac.fr) pour un ensemble de programmes

« Essais » correspondant à ses activités d'analyse de contaminants microbiologiques et physico-chimiques dans les aliments. Depuis 2001, le laboratoire a entrepris une démarche de qualité en recherche et a suivi en cela les recommandations de la commission AFNOR sur l'assurance qualité en recherche. Un système de management de la qualité en recherche a été mis en place au sein du laboratoire qui s'applique aux travaux de thèse. Un manuel pour la qualité en recherche auquel les unités accueillant des doctorants doivent se référer est en vigueur. Des audits internes sont réalisés régulièrement dans les unités par la mission Qualité qui reçoit pour cela l'appui de la mission *Soutien et Valorisation de la recherche*.

C'est dans ce contexte que le présent rapport qualité pour les travaux de thèse faisant l'objet de ce mémoire a été rédigé. Les audits et le rapport ci-dessous ne concernent que les travaux effectués à l'Anses, au laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort.

Rédacteurs et auditeurs	Mission Qualité : C. Cecconi (<i>responsable</i>) et A. Chausse (<i>adjoint</i>) Mission Soutien et valorisation de la recherche : S. Dragacci (<i>Dir. de recherche</i>)
Audits Qualité	Sensibilisation à la qualité recherche par le correspondant qualité de Microbiologie (M. Poumeyrol) et de l'unité (S. Herbin) en 2013 (novembre) et courant 2014. Audits qualité réalisés en juin 2015 et novembre 2016.
Unité d'accueil	Unité SBCL- <i>Staphylocoques, Bacillus, Clostridium, Lait</i> ; chef d'Unité J-A. Hennekinne – Dpt Contaminants microbiologiques des aliments (M-Y. Mistou), ANSES-Laboratoire de sécurité des aliments
Date début de thèse	Novembre 2013
Acronyme Thèse	VirBac
Sujet de Thèse	Approche combinatoire pour la caractérisation des souches de <i>Bacillus cereus</i> à l'origine d'infections chez l'Homme
Direction de thèse	Codirection : <ul style="list-style-type: none">• Brisabois A. (HDR), Anses-Laboratoire Sécurité des aliments ; co-encadrant scientifique à l'Anses : S. Herbin• Rama Rao N. (HDR), Inra-Micalis, Jouy-en-Josas
Ecole doctorale	ABIES-Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et Santé (ED n° 0581, AgroParisTech)
Comité de pilotage	C. Bevilacqua (INRA), M-H. Guinebretière (INRA), N. Jourdan-Da Silva (Santé publique France), Y. Leloir (INRA), J. Von Loco (ISP), A. Brisabois (Anses), N. Ramarao (INRA), S. Cadel-Six (Anses), J-A. Hennekinne (Anses), S. Herbin (Anses)
Correspondant qualité de l'Unité	S. Herbin

Extrait de la charte des thèses de l'Anses : « Thèse et système de management de la qualité : Les travaux de thèse doivent s'intégrer dans le système de management de la qualité en recherche en place au sein de l'entité. Le management de la qualité en recherche permet de garantir la bonne conduite de la recherche et ainsi de donner confiance dans les résultats de la recherche. A ce titre, le doctorant accepte d'effectuer ses expériences et manipulations conformément aux méthodes contenues dans le manuel de la qualité du laboratoire dont il a pris connaissance. Le doctorant accepte qu'un audit qualité ait lieu au cours de son travail ainsi qu'il y ait éventuellement

un audit qualité à la fin de son travail, préliminaire à la rédaction du bilan qualité de la thèse par le responsable qualité de l'entité et qui devra accompagner son mémoire de thèse.

D'autre part, le doctorant accepte qu'une fois par an ait lieu un bilan qualité de son travail dont les conclusions pourront comporter des suggestions d'amélioration.

L'entité d'accueil du doctorant s'engage à prendre en charge et assurer la formation qualité de l'étudiant et à mettre à sa disposition toute la documentation qualité dont il a besoin. »

Initiation à l'assurance qualité

Le doctorant (Benjamin Glasset) a été sensibilisé à la démarche qualité en recherche et initié au système d'assurance qualité du laboratoire par les correspondantes qualité de microbiologie (M. Poumeyrol) et de l'unité SBCL (S. Herbin). Il a été constaté que B. Glasset s'est approprié la démarche et qu'il a utilisé le manuel de la qualité en recherche du laboratoire et la documentation afférente.

Présentation par le doctorant de son projet de recherche (pilotage, objectifs et déroulé des travaux)

Le sujet de thèse a été présenté par le doctorant lors du premier audit en mettant en avant les objectifs et hypothèses de travail. Les travaux de thèse ont été réalisés d'une part à l'Anses (de novembre 2013 à septembre 2015) puis à l'Inra (septembre 2015 à octobre 2016) mais seuls les travaux effectués à l'Anses ont fait l'objet d'audits par l'équipe qualité de l'Anses. Globalement, les objectifs de la thèse ont été clairement décrits et les parties expérimentales ont été construites et identifiées en cohérence avec ces objectifs, et tracées de façon pertinente.

Plusieurs réunions du comité de pilotage et du comité interne de thèse ont statué sur l'avancement des travaux et une traçabilité des comptes rendus a été observée.

Réalisation et valorisation du projet de thèse

B. Glasset, épaulé de manière efficace par la correspondante qualité de l'unité (co-encadrante du projet également), s'est investi dans la mise sous assurance qualité de ses travaux de thèse. L'ensemble de la documentation relative à la qualité recherche a été bien compris et appliqué. La prise en compte des axes d'amélioration proposés lors du premier audit a été vérifiée et validée lors d'un second audit.

Globalement, la documentation qualité a été utilisée de façon pertinente : documents de définition et d'acceptation du projet, composition de l'équipe de recherche et du comité de pilotage. Des rapports d'avancement et des rapports de réunions (notamment du comité de pilotage et du comité de thèse) complètent la documentation qualité.

La valorisation du projet de thèse comprend 1 publication parue au 1^{er} décembre 2016 (*Glasset B. et al. (2016) in Eurosurveillance*) et 1 publication soumise, le doctorant signant en premier auteur. Ces travaux ont également été présentés au cours de journées et de colloques nationaux et internationaux.

Traçabilité de la démarche et des expérimentations

L'habilitation technique du doctorant a été réalisée en tant que de besoin et a fait l'objet d'un dossier.

La traçabilité des expérimentations mises en œuvre a été constatée au cours du premier audit et par sondage au cours du second audit. Les fiches du manuel qualité sur le suivi de la partie

expérimentale ainsi que des cahiers de laboratoire pour le relevé quotidien des manipulations ont été globalement correctement tenus. Des améliorations ont été suggérées pour parfaire la traçabilité des expérimentations ; elles ont été prises en compte, ce qui a été constaté lors du second audit.

EN CONCLUSION, LA MISSION QUALITE DU LABORATOIRE DE SECURITE DES ALIMENTS ATTESTE QUE LES TRAVAUX DE THESE MENES PAR B. GLASSET A L'ANSES SE SONT DEROULES EN APPLIQUANT LES ELEMENTS DU SYSTEME QUALITE DU LABORATOIRE, CE QUI PERMET D'AVOIR CONFIANCE DANS LA CONDUITE DU PROJET DE THESE. B. GLASSET S'EST IMPLIQUE DANS CETTE DEMARCHE QUALITE ET A GLOBALEMENT BIEN RESPECTE LES PRECONISATIONS DU MANUEL QUALITE DU LABORATOIRE.

Fait à Maisons-Alfort, le 12 décembre 2016

 <p>A. Brisabois (co-Directrice de thèse) Anses-Laboratoire de sécurité des aliments</p>	 <p>S. Herbin Co-encadrante scientifique Anses-Laboratoire de sécurité des aliments</p>	 <p>C. Cecconi Chef de la mission Qualité Anses-Laboratoire de sécurité des aliments</p>
--	---	--

TABLE DES MATIERES

RAPPORT QUALITE	4
LISTE DES ABREVIATIONS	10
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	12
Chapitre 1 : le groupe <i>Bacillus cereus</i>	12
1. Généralités sur le groupe <i>Bacillus cereus</i>	13
1.1. Bactérie.....	13
1.2. Spore	14
2. Caractères distinctifs et diversité.....	14
3. Méthodes de caractérisation des souches du groupe <i>B. cereus</i>	16
3.1. Séquençage partiel du gène <i>panC</i>	16
3.2. Typage M13-PCR	17
3.3. PFGE	18
3.4. MLST	18
3.5. NGS et cgMLST	19
3.6. MALDI-TOF.....	19
4. Méthodes de dénombrement des souches du groupe <i>B. cereus</i>	20
Chapitre 2 : La pathogénicité du groupe <i>B. cereus</i>	22
1. <i>B. thuringiensis</i> comme bioinsecticide	23
2. <i>B. anthracis</i>	24
3. Les infections à <i>B. cereus</i> chez l'Homme	24
3.1. Infections gastro-intestinales.....	24
3.1.1. Déclarations des Toxi-Infections Alimentaires Collectives	26
3.1.2. Incidence des TIAC à <i>B. cereus</i>	27
3.1.3. Lieu de déclaration des foyers de toxi-infections alimentaires	28
3.1.4. Répartition mensuelle des TIAC.....	28
3.1.5. Surveillance dans l'alimentation	29
3.2. Infections non gastro-intestinales.....	32

3.2.1.	Définition	33
3.2.2.	Aspects cliniques	33
3.2.3.	Mode de contamination.....	35
3.2.4.	Facteurs de risque	36
3.2.5.	Recommandations des traitements antibiotiques en thérapeutique	37
Chapitre 3 : Toxines et facteurs de virulence		38
1.	Le céréulide	39
2.	Les entérotoxines.....	40
3.	Les « pore forming toxins ».....	42
4.	Les phospholipases	43
5.	Les protéases	44
6.	Autres propriétés supportant le pouvoir pathogène de <i>B. cereus</i>	45
7.	Régulation de l'expression des facteurs de virulence de <i>B. cereus</i>	46
7.1.	Facteurs bactériens.....	46
7.1.1.	PlcR	46
7.1.2.	NprR.....	48
7.1.3.	Spo0A et AbrB	48
7.2.	Facteurs environnementaux.....	49
ENJEUX ET OBJECTIFS.....		52
1.	Enjeux.....	53
2.	Objectifs des travaux.....	54
ETUDES EXPERIMENTALES		56
1.	Etude à grande échelle des toxi-infections alimentaires collectives à <i>B. cereus</i> survenues en France entre 2007 et 2014 : Données épidémiologiques et diversité génétique	57
1.1.	Article 1: <i>Bacillus cereus</i> -induced foodborne outbreaks, France 2007-2014, epidemiology and genetic characterization. Article sous presse dans Eurosurveillance, accepté le 16/07/2016 .	59
1.2.	Révision de la fiche <i>Bacillus cereus</i> de l'Anses.....	71
2.	Etude des infections non gastro-intestinales à <i>B. cereus</i> en France.....	80
2.1.	Article 2: Epidemiologic and genetic survey on hospital infections caused by <i>Bacillus cereus</i> . Article soumis à Clinical Infectious Diseases	82

3. De la toxicité au transcriptome : une approche combinatoire pour différencier les souches pathogènes et environnementales de <i>B. cereus</i>	114
3.1. Introduction	114
3.2. Matériels et méthodes	115
3.2.1. Souches bactériennes	115
3.2.2. Mesure de la cytotoxicité	115
3.2.3. Signature génétique	116
3.2.4. Préparation des ARNm	116
3.2.5. qRT-PCR	117
3.2.6. RNAseq	118
3.2.7. Analyses bioinformatiques	119
3.3. Résultats et Discussion	120
3.3.1. Cytotoxicité des souches	120
3.3.2. Présence de gènes de virulence	121
3.3.3. Expression des gènes de virulence	122
 DISCUSSION ET PERSPECTIVES	 131
 VALORISATION	 141
1. Publications	142
2. Présentations orales	142
3. Présentations affichées	142
4. Encadrements	143
 BIBLIOGRAPHIE	 144
 ANNEXES	 162
 RÉSUMÉ/ABSTRACT	 Erreur ! Signet non défini.

LISTE DES ABREVIATIONS

PCR : Polymerase Chain Reaction

RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA

PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis

MLST : MultiLocus Sequence Typing

WGS : Whole Genome Sequencing

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ADNr : ARN ribosomique

ARNm : ARN messenger

RNAseq : Ribonucleic acid sequencing (or « highly scalable whole-transcriptome analysis »)

SNP : Single-Nucleotide Polymorphism

DO : Déclaration Obligatoire

DDPP : Directions Départementales de la Protection des Populations

ARS : Agence Régionale de Santé

TIAC : Toxi Infection Alimentaire Collective

InVS : Institut de Veille Sanitaire (maintenant connue sous le nom de « Santé publique France »)

DGAI : Direction Générale de l'Alimentation

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

EFSA : European Food Safety Authority

ECDC : European Centre for Disease Prevention and Control

IMS : Institut Médico Social

AFNOR : Association Française de Normalisation

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

« *Nothing is given, everything is earned* »

Lebron James

Analyse bibliographique

Chapitre 1 : le groupe *Bacillus cereus*

1. Généralités sur le groupe *Bacillus cereus*

Le groupe *B. cereus* appartient à l'embranchement des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Bacillales*, à la famille des *Bacillaceae* (section 13 du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)(Vos *et al.*, 2009) et au genre *Bacillus*. Le groupe *Bacillus cereus* (groupe *B. cereus*) est composé de huit espèces : *B. mycoïdes*, *B. pseudomycoïdes*, *B. weihenstephanensis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu stricto* (*B. cereus*), *B. cytotoxicus* et *B. toyonensis*. Les bactéries du groupe *B. cereus* sont ubiquitaires. En dehors du sol qui est leur réservoir primaire, elles peuvent coloniser des insectes et des mammifères (Ceuppens *et al.*, 2013; Jensen *et al.*, 2003; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). L'hôte est contaminé par des spores ou des cellules végétatives, présentes dans les aliments ingérés, l'air inhalé, ou pénétrant dans l'organisme par une plaie. Après germination, les bactéries se multiplient à l'intérieur de l'hôte en le dégradant (provoquant ou non sa mort). Elles sont ensuite disséminées dans l'environnement (par l'intermédiaire de l'hémolymphe, du sang, ou des selles de l'hôte), où elles sporulent (Jensen *et al.*, 2003; Vilas-Bôas *et al.*, 2007). Parallèlement à ce cycle de vie pathogène, Jensen *et al.* suggèrent l'existence d'un cycle endosymbiotique dans l'intestin d'invertébrés (Jensen *et al.*, 2003).

Les bactéries du groupe *B. cereus* requièrent un milieu riche pour germer et se multiplier. Dans l'environnement, leur prolifération est vraisemblablement restreinte à quelques niches où les nutriments sont concentrés tels que la rhizosphère (la zone du sol voisine des racines des plantes), les eaux usées ou le fumier (Jensen *et al.*, 2003).

1.1. Bactérie

Les bactéries du groupe *B. cereus* ont la capacité de sporuler, sont à Gram positif, aérobies ou anaérobies facultatives, mobiles par ciliature péritriche ou immobiles. Les *B. anthracis* et quelques *B. mycoïdes* sont non-mobiles (Stenfors and Granum, 2001). Morphologiquement, les espèces du groupe *B. cereus* sont des bacilles minces, droits ou légèrement incurvés avec des extrémités carrées, pouvant former des chainettes. Ce sont des bactéries à Gram positif de 1 x 3-4 µm (Figure 1). Leur structure est constituée d'une membrane interne et d'un peptidoglycane épais qui a la fonction de maintenir la forme de la cellule.

Les bactéries du groupe *B. cereus* présentent les caractéristiques biochimiques suivantes:

- Résistance à la polymyxine.
- Incapacité à métaboliser le mannitol.
- Synthèse d'une lécithinase (phospholipase C) par la plupart des souches.
- Morphologie caractéristique des colonies en « tâche de bougie », très semblable à celle d'une goutte de cire, ou sont rhizoïdes pour *B. mycoïdes* et *B. pseudomycoïdes*. Les colonies

rhizoïdes ont un aspect ressemblant à de longs cheveux ou à des racines qui peuvent se prolonger de plusieurs centimètres à partir du site d'inoculation.

La plupart des souches du groupe *B. cereus* sont hémolytiques et environ 50% peuvent hydrolyser l'amidon (Cadel Six *et al.*, 2012). Les souches de *B. anthracis* sont généralement non-hémolytiques.

« La version de diffusion ne comporte pas la totalité des reproductions pour des raisons de droits »

Figure 1 : Vue microscopique de *B. cereus* observé en coloration de Gram (2015 Report of the Committee on Infectious Diseases, 2015)

1.2. Spore

En plus de la forme végétative qui est active métaboliquement, les espèces du groupe *B. cereus* peuvent également former des endospores lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables. Les spores sont des formes dormantes, sans métabolisme actif, qui se transforment à nouveau en forme végétative par un processus de germination lorsque les conditions redeviennent favorables. Chez le groupe *B. cereus*, les spores sont non déformantes et situées en position centrale à subterminale. Elles sont constituées d'un noyau interne entouré par la membrane interne, d'un cortex entouré de la membrane externe puis d'une couche externe supplémentaire (Kutima and Foegeding, 1987). La couche externe est constituée de protéines et de petites quantités de lipides et de glucides. Ceux-ci permettent à la spore de résister aux agents oxydants et aux produits chimiques en bloquant les molécules toxiques (Setlow, 2006). Aussi, ces spores sont extrêmement résistantes à la dessiccation, aux métaux lourds, aux radiations et à de nombreux agents stérilisants tels que la chaleur (les spores peuvent résister à une température bien supérieure à 80°C pendant 10 minutes) ou aux antibiotiques; elles représentent par conséquent un moyen de survie très efficace. La spore est aussi considérée comme un élément favorable de dissémination. Grâce à toutes ces caractéristiques, les espèces appartenant au groupe *B. cereus* se distribuent très largement dans l'environnement.

2. Caractères distinctifs et diversité

À l'origine, les espèces du groupe ont été classées sur la base de différences phénotypiques, de propriétés de pathogénies distinctes et la présence d'éléments extrachromosomiques qui reflètent le spectre de virulence des espèces. *B. mycoïdes* et *B. pseudomycoïdes* se caractérisent par des colonies rhizoïdes sur milieu nutritif solide (Nakamura, 1998). *B. weihenstephanensis* regroupe des bactéries psychrotrophes capables de se développer à des températures inférieures à 7°C (Lechner *et al.*, 1998; Stenfors and Granum, 2001). Ces trois espèces sont plutôt identifiées comme des bactéries d'altération de denrées alimentaires, notamment dans les produits à base d'œuf et les produits laitiers (Kumari and Sarkar, 2016; Techer *et al.*, 2014). Les souches de *B. thuringiensis* produisent une inclusion cristalline

formée de toxines actives sur une grande variété d'insectes et sur certains nématodes (Schnepf *et al.*, 1998). Les souches des espèces *B. cytotoxicus* et *B. cereus* sont associées à des toxi-infections alimentaires. *B. cytotoxicus* peut être différencié des autres membres du groupe par un intervalle de température de croissance compris entre 20°C et 50°C, l'absence d'hydrolyse de l'amidon et l'absence de croissance sur des milieux synthétiques sans tryptophane (Guinebretiere *et al.*, 2013). Cette espèce est également caractérisée par la forte production de la cytotoxine K-1. *B. anthracis*, l'agent de la maladie du charbon, possède des facteurs portés par des plasmides spécifiques (pXO1 et pXO2) qui sont responsables de son caractère pathogène vis-à-vis des mammifères. Toutes les souches du groupe *B. cereus* qui ne possèdent pas un de ces éléments distinctifs, que ce soit morphologique, phénotypique, la production de toxines spécifiques ou la présence de gènes de virulence plasmidiques, sont considérées comme des souches de l'espèce *B. cereus*. De nouvelles espèces ont néanmoins été décrites récemment, comme *B. toyonensis* et *B. wiedmannii*. L'espèce *B. toyonensis* n'est à ce jour représentée que par une seule et unique souche (Jiménez *et al.*, 2013; Oren and Garrity, 2014). *B. wiedmannii* a été proposée très récemment à la revue de référence : « International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology » (IJSEM) qui valide l'identification des nouvelles espèces et doit encore être officialisée. Cette espèce présente les caractéristiques de ne pas fermenter le saccharose et de ne pas cataboliser l'arginine, ce qui la différencie des autres membres du groupe *B. cereus* (Miller *et al.*, 2016). Cette espèce est psychrotolérante, potentiellement toxique et a été isolée de produits laitiers. D'autres études sont nécessaires pour caractériser cette espèce. Vingt autres nouvelles espèces putatives ont aussi été décrites (Liu *et al.*, 2015) mais celles-ci n'ont pas été officiellement répertoriées par l'IJSEM.

Cependant, la différenciation des espèces au sein du groupe *B. cereus* est complexe et la proximité génétique entre les membres du groupe est si étroite que, d'un point de vue phylogénétique, la classification des espèces qui le composent est encore débattue, si bien que tous les *Bacillus* du groupe pourraient être considérés comme une seule et même espèce (Helgason *et al.*, 2000). Par exemple, les déterminants génétiques portés par des plasmides qui permettent la différenciation des espèces peuvent être échangés (Van der Auwera *et al.*, 2013). Aussi, des caractères phénotypiques spécifiques de *B. anthracis* tels que la synthèse de capsule ou l'absence d'hémolyse peuvent être retrouvés dans certaines souches de *B. cereus* (Slamti *et al.*, 2004; Sue *et al.*, 2006). Enfin, certaines souches du groupe *B. cereus* possèdent des propriétés insecticides (Selvakumar *et al.*, 2007) ou sont impliquées dans des infections semblables à la maladie du charbon (Hoffmaster *et al.*, 2004; Klee *et al.*, 2010). Avec l'essor de la biologie moléculaire, l'approche phénotypique de la classification des microorganismes a laissé place à une classification génotypique fondée sur l'analyse des gènes. Actuellement, la plupart des stratégies utilisées pour établir une classification phylogénétique des

souches repose sur des analyses moléculaires basées sur des hybridations ADN-ADN (Wang *et al.*, 2007) et sur la comparaison des séquences d'ADN ribosomiques (ADNr) (Ash *et al.*, 1991; Awad *et al.*, 2007). Deux souches sont considérées comme appartenant à une même espèce lorsqu'elles présentent plus de 70% de réassociation lors d'une hybridation ADN-ADN et plus de 97% d'identité de séquences des ARN ribosomiques 16S (Vandamme *et al.*, 1996). C'est ainsi que Xu et collaborateurs ont identifié 10 groupes au sein des Bacillaceae sur la base des séquences ITS (Internal Transcribed Spacer) des ADNr 16S et 23S (Xu, 2003), dont sept incluent des membres du genre *Bacillus*. L'ADNr constitue un marqueur moléculaire efficace pour distinguer des genres bactériens mais n'est pas assez résolutif pour différencier les espèces (Konstantinidis and Tiedje, 2007) et surtout celles du groupe *B. cereus*. De nombreuses études décrivent d'autres méthodes d'analyse moléculaire permettant d'identifier la diversité génétique des souches du groupe *B. cereus* et pour certaines, d'établir leur relation phylogénétique. D'autres approches utilisent également des analyses de spectrométrie de masse. L'ensemble des analyses permettant la caractérisation incluent des techniques, combinées ou non, telles que :

- le séquençage du gène *panC* (Guinebretière *et al.*, 2008)
- le typage moléculaire M13-PCR dérivé de la RAPD (RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA) (Guinebretiere and Nguyen-The, 2003)
- l'électrophorèse en champ pulsée (PFGE : pulsed field electrophoresis) (Otlewska *et al.*, 2013)
- le typage génomique multilocus (MLST : multi-locus sequence typing) (Cardazzo *et al.*, 2008; Didelot *et al.*, 2009; Helgason *et al.*, 2004; Hoffmaster *et al.*, 2008; Priest *et al.*, 2004)
- le séquençage de génome complet WGS (WGS : Whole Genome Sequencing) (Eyre *et al.*, 2013; Girault *et al.*, 2014; Turabelidze *et al.*, 2013)
- la spectrométrie de masse MALDI-TOF, basée sur les spectres de dégradation des protéines (MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation- Time-Of-Flight) (Böhm, 2012; Fiedoruk *et al.*, 2016; Lasch *et al.*, 2009)

D'une façon générale, toutes ces études suggèrent que les différentes souches du groupe *B. cereus* présentent un haut niveau de similarité génétique, ce qui ne permet pas de distinguer les espèces entre elles et conduit parfois à une identification erronée. Cependant, les souches de *B. anthracis* forment un groupe monophylétique, et *B. cytotoxicus* et *B. pseudomycoïdes* forment des groupes plus divergents (Auger *et al.*, 2008; Fagerlund *et al.*, 2007; Lapidus *et al.*, 2008; Nakamura, 1998).

3. Méthodes de caractérisation des souches du groupe *B. cereus*

3.1. Séquençage partiel du gène *panC*

La classification moléculaire la plus répandue du groupe *B. cereus* se base sur le séquençage du gène de ménage *panC* qui code la pantoate-bêta-alanine ligase C (Guinebretière *et al.*, 2008). La méthode a été développée en séquençant 425 souches indépendantes du groupe *B. cereus*. Les séquences consensus ont été comparées en utilisant le programme d'alignement multiple CLUSTAL 1.8. Un arbre phylogénétique a été construit en utilisant la méthode « Neighbour-Joining » (NJ), et à l'aide du logiciel « NJplo ». Sept groupes phylogénétiques ont été déterminés sur la base du séquençage partiel du gène *panC*. La structure génétique du groupe *B. cereus* regroupe, au sein d'un même groupe phylogénétique, des souches appartenant à des espèces différentes mais partageant le même domaine de température de croissance spécifique (Figure 2) (Guinebretière *et al.*, 2008). Le groupe I regroupe les souches de l'espèce *B. pseudomycoïdes*, dont la température de croissance est comprise entre 10°C et 43°C. Le groupe II regroupe les souches psychrotrophes de *B. cereus* et *B. thuringiensis* (croissance entre 7°C et 40°C). Les groupes III, IV et V sont composés des souches de *B. cereus* et *B. thuringiensis* les plus mésophiles du groupe *B. cereus*. *B. anthracis* n'a été répertorié que dans le groupe III. Le groupe VI contient les souches psychrotrophes de *B. weihenstephanensis*, *B. mycoïdes* et *B. thuringiensis* capables de se développer à des températures de croissance comprises entre 5°C et 37°C (Bartoszewicz *et al.*, 2009). Le groupe VII contient les souches les plus thermophiles (croissance entre 20°C et 50°C). Ce groupe est le plus éloigné des six autres et est attribué à l'espèce *B. cytotoxicus* (Guinebretière *et al.*, 2013). Des études ont également permis d'évaluer le potentiel de virulence des souches du groupe *B. cereus* dans chacun des groupes phylogénétiques. Les souches appartenant aux groupes III et VII sont les plus toxiques alors que les souches du groupe VI sont les moins toxiques (Guinebretière *et al.*, 2010). Ces tests *in vitro* ont été réalisés sur des cellules épithéliales du colon, la lignée Caco-2.

«La version de diffusion ne comporte pas la totalité des reproductions pour des raisons de droits »

Figure 2 : plage de température de croissance de *B. cereus* en fonction du groupe phylogénétique (Guinebretière *et al.*, 2008)

3.2. Typage M13-PCR

Les méthodes de typage moléculaire rapide utilisant la PCR telle que la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) sont utilisées pour le typage de souches du groupe *B. cereus*. Ces méthodes sont reconnues pour être de bons outils pour distinguer les souches entre elles et tracer des contaminations à *B. cereus*. Ceci a bien été décrit dans le lait pasteurisé, le lait en poudre et l'industrie laitière (Malek *et al.*, 2013). La méthode de typage M13-PCR, dérivée de la RAPD, se base sur la PCR du coliphage M13

afin d'obtenir des profils moléculaires permettant d'étudier la diversité génétique des souches. D'autres techniques moins rapides et plus coûteuses telles que le ribotypage, l'AFLP et la PFGE peuvent être utilisées pour les études à grande échelle et permettent une comparaison de résultats entre plusieurs laboratoires (Guinebretiere and Nguyen-The, 2003). Dans le cas d'études intra-laboratoire, la méthode M13-PCR est appropriée car elle permet une caractérisation rapide, facile, discriminante et peu chère d'un grand nombre de souches (Guinebretiere and Nguyen-The, 2003).

3.3. PFGE

La PFGE pour « Pulsed Field Gel Electrophoresis » est une technique de typage moléculaire très discriminante. Elle est décrite comme la méthode « gold standard » pour le génotypage de quelques bactéries pathogènes comme *Listeria monocytogenes* et *Salmonella enterica* pour mener des études d'épidémiologie moléculaire.

Cette méthode permet de séparer les grands fragments d'ADN (>15kb) obtenus après une restriction enzymatique et présente l'avantage d'analyser la totalité du génome. Quelques études de génotypage de *B. cereus* par la méthode PFGE ont été menées (Merzougui *et al.*, 2013) et ont permis, notamment, de différencier les *B. anthracis* des autres membres du groupe *B. cereus* (Zhong *et al.*, 2007) ou encore de différencier *B. cereus* et *B. mycoïdes* (Otlewska *et al.*, 2013). Cependant, la méthode reste relativement difficile à standardiser entre les laboratoires, même si le réseau international PulseNet (Swaminathan *et al.*, 2001) a déjà développé des protocoles standardisés de la méthode PFGE pour des agents bactériens comme *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* et *Escherichia coli*. Il n'existe pas à ce jour de protocole standardisé pour le groupe *B. cereus*.

3.4. MLST

La méthode « multilocus sequence typing » (MLST) est une méthode de typage moléculaire des souches bactériennes se basant sur le séquençage de plusieurs gènes (Maiden *et al.*, 1998). En fonction de la séquence de chaque gène et des variations nucléotidiques, les souches se voient attribuer un profil allélique ou « séquence type » (ST). Ce ST permet de différencier les souches entre elles et de faire des études phylogénétiques. Les schémas MLST ont été utilisés avec succès pour identifier et caractériser des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes aux antibiotiques et appartenant à un ST particulier, ou pour identifier des souches associées à de graves maladies invasives (Enright *et al.*, 2000). Cependant, plusieurs auteurs affirment que cette méthode manque de pouvoir discriminant pour investiguer les infections épidémiques, notamment celles causées par des pathogènes à caractère clonal (Haase *et al.*, 2014; Ragon *et al.*, 2008). Diverses études proposent plusieurs schémas MLST permettant de faire du génotypage chez les espèces du groupe *B. cereus*

(Cardazzo *et al.*, 2008; Helgason *et al.*, 2004; Sorokin *et al.*, 2006) mais aucune corrélation n'a encore été faite avec le potentiel de toxicité de *B. cereus*. Une étude a identifié 93 ST parmi 134 souches de *B. cereus* isolées du sol et sur des sites différents (Sorokin *et al.*, 2006). Trois grands groupes ont été définis et étaient respectivement associés aux espèces *B. weihenstephanensis*, *B. cereus* et *B. thuringiensis*.

3.5. NGS et cgMLST

L'évolution des nouvelles générations de méthodes de séquençage permet aujourd'hui d'analyser les séquences du génome complet. Plusieurs études menées sur différentes espèces bactériennes ont montré que le séquençage du génome complet (WGS) (Eyre *et al.*, 2013), l'analyse des variants nucléotidiques (SNP) (Turabelidze *et al.*, 2013), et l'étude du profil allélique des gènes composant le core-génome (cgMLST) (Ruppitsch *et al.*, 2015) représentent des moyens très performants pour le typage des souches avec un pouvoir discriminant maximum. Néanmoins, il existe toujours un frein à ces approches basées sur les NGS dû à l'absence d'une nomenclature harmonisée qui faciliterait les échanges de données entre les laboratoires. En utilisant le WSG pour analyser les SNP, Girault *et al.*, ont réussi à mettre en place une reconstruction phylogénétique très précise de la population de *B. anthracis* isolée en France et ont développé un outil puissant qui permet de déterminer et de tracer rapidement l'origine géographique d'une souche (Girault *et al.*, 2014).

Contrairement à l'étude des SNP sur génome complet, le cgMLST est basé sur le concept d'une variation allélique, ce qui signifie que des recombinaisons, des délétions ou des insertions en de multiples positions sont comptabilisées comme des événements évolutifs simples. Cette approche pourrait être biologiquement plus pertinente que les approches qui tiennent compte seulement des mutations ponctuelles. Des études montrent que le cgMLST chez *Listeria monocytogenes* permet de grandement améliorer la traçabilité des infections causées par la bactérie, et de retracer tout le « cycle de vie » de l'épidémie (Ruppitsch *et al.*, 2015). À notre connaissance, il n'existe pas à ce jour d'études de cgMLST chez *B. cereus*.

3.6. MALDI-TOF

Les méthodes décrites précédemment sont efficaces et utilisées pour caractériser les souches du groupe *B. cereus*, mais leur mise en œuvre prend beaucoup de temps et nécessite des cultures bactériennes et des isolements sur milieu sélectif. Connue pour sa sensibilité, sa spécificité et sa reproductibilité, la méthode basée sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF est l'une des méthodes les plus utilisées pour l'identification bactérienne en milieu clinique (Singhal *et al.*, 2015). La technique est basée sur la caractérisation des signaux de masse spectrale de protéines très abondantes

possédant des fonctions de ménage, comme par exemple les protéines ribosomiques. Les sous-unités protéiques des ribosomes, les protéines « DNA-binding » et les protéines « coldshock » peuvent également être de bons biomarqueurs pour le typage par MALDI-TOF (Croxatto *et al.*, 2012). Pour les espèces sporulantes comme *B. cereus*, les protéines jouant un rôle dans la formation de la spore peuvent permettre d'obtenir de bons indices de discrimination (Lasch *et al.*, 2009). Les spectres obtenus sont comparés avec ceux disponibles dans des bibliothèques de données préalablement construites. Par conséquent, le succès de l'identification reste très dépendant du nombre de spectres bien caractérisés et disponibles dans les bases de données de référence, qui ne sont pas toujours en libre accès (Böhm, 2012). Lasch *et al.*, ont développé une méthode MALDI-TOF pour différencier le groupe *B. cereus* par rapport aux autres espèces du genre *Bacillus* en construisant une base de données de spectres provenant de 374 souches, dont 102 *B. anthracis* et 121 *B. cereus*. La méthode fonctionne parfaitement pour distinguer *B. anthracis*. Cependant, elle ne permet pas de distinguer les autres espèces du groupe (Lasch *et al.*, 2009).

La technique MALDI-TOF a plusieurs limites. Elle ne permet pas d'identifier les espèces du groupe *B. cereus* et sa capacité à différencier finement les souches n'a été démontrée que dans de rares cas (Starostin *et al.*, 2015) ce qui nécessite souvent de mettre en œuvre une autre méthode de typage si une caractérisation plus fine de la souche est souhaitée (PFGE, MLST) (Bizzini and Greub, 2010; Fujinami *et al.*, 2011).

Des études spécifiques par spectrométrie MALDI-TOF sur *B. cereus* montrent que les souches émétiques représentent un groupe homogène, révélé par un spectre spécifique. La méthode pourrait donc différencier les souches émétiques des autres souches du groupe *B. cereus* (Fiedoruk *et al.*, 2016).

Il existe également des méthodes conventionnelles pour la caractérisation et le dénombrement des souches du groupe *B. cereus*. Ce sont des méthodes principalement appliquées dans le cadre du dénombrement de *B. cereus* dans les aliments. Il existe des méthodes normalisées et alternatives.

4. Méthodes de dénombrement des souches du groupe *B. cereus*

La norme NF EN ISO 7932, dont la dernière révision date de juillet 2005, présente une méthode horizontale pour le dénombrement des *B. cereus* présomptifs revivifiables par le comptage de colonies à 30°C. Elle est applicable aux produits pour l'alimentation humaine et animale, et aux échantillons d'environnement pour la production et la distribution des aliments. Cette méthode consiste en l'énumération des colonies sur le milieu MYP (milieu Mossel) et à la confirmation des colonies par le

test de l'hémolyse. Le terme « présomptif » a été introduit de façon à souligner que l'étape de confirmation ne permet pas de faire la différence entre les espèces du groupe *B. cereus*.

La norme NF EN ISO 21871, dont la dernière révision date de juillet 2006, présente une méthode horizontale pour la recherche ou le dénombrement des *B. cereus* présumés viables en petit nombre par la technique du nombre le plus probable (NPP). Cette norme internationale s'applique aux produits destinés à la consommation humaine ou animale, et aux échantillons d'environnement du secteur agroalimentaire. Ce dénombrement peut se faire sur milieu MYP ou PEMBA (PEMBA : Polymyxin Pyruvate Egg Yolk Mannitol Bromothymol Blue Agar).

Les méthodes dites « alternatives » permettent de proposer des protocoles plus simples, plus rapides et/ou parfois plus économiques que les méthodes de référence classiques. Certaines de ces méthodes peuvent être validées selon la norme NF EN ISO 16140 « Protocole pour la validation des méthodes alternatives ».

Les méthodes alternatives validées par rapport à la norme NF EN ISO 7932 sont les méthodes AFNOR AES-10/10-07/10 BACARA® pour *Bacillus cereus* Rapid Agar et AFNOR BKR-23/06-02/10 Compass *Bacillus cereus* agar. Les milieux BACARA® et COMPASS® sont des milieux chromogènes plus sélectifs pour la détection des bactéries du groupe *B. cereus* et qui ne nécessitent pas d'étape de confirmation.

Chapitre 2 : La pathogénicité du groupe *B. cereus*

Quatre membres du groupe *B. cereus* sont connus pour leur pouvoir pathogène vis-à-vis d'hôtes spécifiques : *B. thuringiensis* chez les insectes, *B. anthracis* chez les mammifères, *B. cereus* et *B. cytotoxicus* chez l'Homme. Deux publications soulignent également l'implication de *B. thuringiensis* dans des toxi-infections alimentaires (Jackson *et al.*, 1995; McIntyre *et al.*, 2008). Néanmoins, sa réelle contribution est encore mal connue puisque la différenciation entre les espèces *B. cereus* et *B. thuringiensis* n'est pas réalisée lors des investigations de TIAC (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2016) ou d'infections cliniques.

1. *B. thuringiensis* comme bioinsecticide

B. thuringiensis est un entomopathogène d'insecte utilisé comme bioinsecticide et disponible sur le marché sous la forme de poudre contenant des spores déshydratées et des inclusions cristallines (Ali *et al.*, 2010). *B. thuringiensis* a été utilisé avec succès pour contrôler les insectes nuisibles à l'agriculture (la culture de végétaux, les arbres fruitiers et la culture de fruits à coques), dans la sylviculture et dans la lutte contre les moustiques (Marrone, 1994). Les pulvérisations de *B. thuringiensis* sont choisies dans le cadre d'une agriculture biologique afin de répondre aux directives sur l'utilisation de matériaux non-synthétiques (Sanchis, 2011). Les protéines insecticides dans les corps cristallins peuvent être de deux types: les protéines Cry (pour « crystal ») également connues sous le nom de δ -endotoxines (73 familles de toxines Cry comprenant un total de 732 toxines) et les protéines Cyt (pour cytolitiques) (trois familles de protéines Cyt dont 38 toxines différentes) (Lacey *et al.*, 2015). Les protéines Cry constituent les protéines insecticides majoritairement produites par *B. thuringiensis*, tandis que les protéines Cyt constituent un groupe plus restreint. Les protéines Cry et Cyt ne sont pas liées structurellement. Les protéines Cry sont actives contre des larves d'insectes très diverses et des espèces d'invertébrés (acariens, nématodes). La pathogénèse commence par l'ingestion du cristal de *B. thuringiensis*, qui est solubilisée par le pH alcalin de l'intestin des insectes. Les toxines Cry vont alors former des pores transmembranaires ou des canaux ioniques sur les cellules épithéliales de l'intestin et conduire à une lyse cellulaire osmotique. Les protéines Cyt sont quant à elles actives contre plusieurs types de larves de diptères, en particulier les moustiques et les mouches noires.

L'observation d'un état frais au microscope peut permettre de faire la différence entre *B. thuringiensis* et les autres membres du groupe *B. cereus* en détectant les cristaux produits par *B. thuringiensis* pendant sa sporulation. Les cristaux peuvent avoir une forme pyramidale, de losange ou sphérique et sont situés à proximité de la spore. Cependant, quelques souches de *B. thuringiensis* produisent des cristaux plus petits et peuvent être confondus avec d'autres composants cellulaires (Wang *et al.*, 2013). Cette méthode de discrimination entre les espèces du groupe *B. cereus* et *B. thuringiensis* n'est donc pas totalement fiable et doit toujours être considérée comme une différenciation présumée. Ainsi, le

développement de méthodes permettant cette différenciation de façon fiable et incontestable représente un véritable enjeu économique pour les industriels puisque *B. thuringiensis* est utilisé comme biopesticide en agriculture et est régulièrement retrouvé dans les végétaux crus. Cela permettrait également d'évaluer le risque pour la santé publique de la présence de *B. thuringiensis* dans les aliments puisque de réelles questions se posent sur sa contribution dans les TIAC et le développement d'infections gastro-intestinales chez l'Homme (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2016).

2. *B. anthracis*

B. anthracis est un agent pathogène de classe 3, capable d'engendrer des infections chez les mammifères et en particulier chez l'Homme. Trois types de pathologies y sont associées : intestinales, cutanées et pulmonaires (Dixon *et al.*, 1999). Les infections intestinales et cutanées restent généralement localisées. Ces dernières se traduisent par un œdème et une nécrose de la peau. La forme d'infection inhalatoire est beaucoup plus sévère. C'est l'agent de la maladie du charbon aussi appelée « anthrax » et les quelques décès qui lui ont été imputés sont principalement dus à une défaillance multi-organes (World Health Organization and Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group, 2015). Les spores de *B. anthracis* rejoignent les ganglions lymphatiques, vraisemblablement par l'intermédiaire des macrophages, et germent (Guidi-Rontani *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 2008). La capsule et les toxines sont les facteurs majeurs de la virulence de la bactérie. La capsule peu immunogène, formée d'un polymère d'acide poli- γ -D-glutamique, s'oppose à la phagocytose des cellules végétatives une fois qu'elles sont dans l'organisme. Les bactéries végétatives produisent des toxines spécifiques, dont les gènes sont portés par le plasmide pXO1, qui permettent à l'infection de se propager. La toxémie associée augmente avec le nombre de bactéries jusqu'à un certain seuil à partir duquel les toxines vont causer des dommages au niveau des parois cellulaires, ce qui induit la formation de thrombose et des hémorragies (World Health Organization and Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group, 2015). Le décès de l'hôte résulte d'une septicémie (Goossens, 2009; Hudson *et al.*, 2008).

3. Les infections à *B. cereus* chez l'Homme

3.1. Infections gastro-intestinales

B. cereus, *B. cytotoxicus* et *B. thuringiensis* peuvent être responsables de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) chez l'Homme en provoquant des infections gastro-intestinales. Un foyer de TIAC est défini par l'apparition d'au moins deux cas d'infections similaires présentant une symptomatologie identique, à caractère gastro-intestinale. Il faut qu'au moins deux cas soient rapportés à une même origine alimentaire. En France, les TIAC sont à déclaration obligatoire (DO) (définition légale,

Haeghebaert *et al.*, 2002). Les TIAC confirmées font référence aux foyers dans lequel l'agent pathogène est isolé dans un prélèvement d'origine humaine (sang/selles) ou dans des restes alimentaires ou des repas témoins. Les TIAC suspectées font référence aux foyers dans lequel l'agent pathogène n'a pas été confirmé ; il est alors suspecté à l'aide d'un algorithme d'orientation étiologique prenant en compte les signes cliniques, la durée médiane d'incubation et le type d'aliments consommés (<http://invs.santepubliquefrance.fr>).

Dans ce chapitre, le terme *B. cereus* englobera *B. cereus*, *B. thuringiensis* et *B. cytotoxicus*. Effectivement, la réelle contribution de *B. thuringiensis* dans les TIAC est encore mal connue et n'est pas à exclure.

Les infections gastro-intestinales sont de deux types différents au niveau des symptômes et de leur origine. Le syndrome diarrhéique est causé par une intoxication résultant de la synthèse de toxines par les bactéries végétatives dans l'intestin. Les bactéries sous forme de spores ou de cellules végétatives peuvent être présentes dans des produits laitiers, des purées de légumes, des crudités, ou des plats à base de viande. Elles sont le plus souvent ingérées sous forme de cellules végétatives mais aussi sous la forme de spores (Clavel *et al.*, 2004) qui, une fois dans l'intestin, germent, se multiplient, et produisent des entérotoxines. Les symptômes apparaissent plusieurs heures après ingestion (5 h à 24 h), et se manifestent par des douleurs abdominales et une diarrhée profuse (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Les toxi-infections alimentaires à *B. cereus* sont généralement bénignes avec une rémission spontanée dans les 24 h, sans traitement. Néanmoins, des cas de décès ont été rapportés, résultant par exemple d'entérites nécrotiques (Dierick *et al.*, 2005; Lund *et al.*, 2000; Messelhäusser *et al.*, 2014; Naranjo *et al.*, 2011; Tschiedel *et al.*, 2015).

Le syndrome émétique résulte d'une intoxication. Elle est provoquée par le céréulide, une toxine synthétisée par *B. cereus* et préformée dans les aliments. Cette toxine cause des nausées et des vomissements survenant rapidement (entre 30 minutes et 6 h après ingestion) et a déjà provoqué des décès, notamment à la suite d'insuffisances hépatiques (Dierick *et al.*, 2005; Mahler *et al.*, 1997). Les plats pouvant contenir le céréulide sont généralement à base d'aliments amylicés comme le riz et les pâtes, préparés à l'avance, conservés à température ambiante ou mal réfrigérés, et rapidement réchauffés avant consommation. Les spores de *B. cereus*, toujours présentes dans l'aliment après sa préparation initiale, germent pendant son stockage et produisent la toxine émétique (Ehling-Schulz *et al.*, 2004). Cette toxine est très résistante à la chaleur et n'est pas détruite lors du réchauffage de l'aliment. Elle n'est pas non plus dégradée par le pH acide de l'estomac ni par les enzymes digestives (Alonzo *et al.*, 2015). Il n'a pas été montré que *B. cytotoxicus* et *B. thuringiensis* aient la capacité de synthétiser le céréulide (Hoton *et al.*, 2009; Thorsen *et al.*, 2009).

Cependant, il reste très difficile d'associer rapidement une infection gastro-intestinale à *B. cereus* sur la simple observation des données cliniques et épidémiologiques décrites ci-dessus. En se basant sur les symptômes, la période d'incubation, la durée de la maladie ou la matrice alimentaire incriminée, une TIAC à *B. cereus* peut facilement être confondue avec une TIAC causée par d'autres pathogènes responsables des mêmes symptômes tels que *C. perfringens* ou *S. aureus*. Une étude menée par Bennett *et al.*, aux Etats Unis, entre 1998 et 2008, a montré que les symptômes engendrés par ces trois pathogènes sont très proches. *B. cereus*, *C. perfringens* et *S. aureus* ont respectivement engendré des diarrhées dans 97%, 100% et 89% des TIAC associées à ces trois pathogènes. Les périodes d'incubation ont des valeurs médianes respectives de 5h (interquartiles 2-12h), de 11h (interquartiles 9-12h) et de 4h (interquartiles 3-4h). Enfin, la durée de la maladie est de 21h en moyenne pour *B. cereus*, 24h pour *C. perfringens* et 15h pour *S. aureus*. *B. cereus* reste cependant majoritairement retrouvé dans les produits amylacés par rapport aux deux autres pathogènes qui sont majoritairement retrouvés dans les produits à base de viande (Bennett *et al.*, 2013). Une confirmation microbiologique des échantillons en laboratoire est une étape indispensable dans le cadre des investigations de TIAC.

3.1.1. Déclarations des Toxi-Infections Alimentaires Collectives

En France, une TIAC doit faire l'objet d'une DO de la part des médecins et des responsables d'établissements de restauration collective ou à caractère social auprès de l'administration, représentée soit par les Agences Régionales de Santé (ARS) soit par les Directions Départementales de la Protection des Populations (DDPP) (décret n°86-770 du 10 juin 1986). Des consommateurs ou des personnes qui ont connaissance d'un épisode toxique pouvant être reconnu comme une TIAC peuvent également faire la déclaration. Des investigations conjointes entre les ARS et DDPP sont mises en œuvre pour confirmer la TIAC et identifier son origine afin de mettre en place les mesures préventives et correctives nécessaires pour limiter le nombre de cas. Les ARS remontent les déclarations, investigations et conclusions à l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) (faisant maintenant partie de Santé publique France), et aux DDPP qui remontent à leur tour les informations à la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI). La DGAI a pour missions de veiller à la sécurité et à la qualité des aliments à tous les niveaux de la chaîne alimentaire, ainsi qu'à la santé et à la protection des animaux et des végétaux. Dans cette chaîne, l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) peut être sollicitée par ces autorités afin de mener des analyses complémentaires dans le cadre des investigations de suspicion de TIAC. En effet, l'Anses développe des méthodes de diagnostic, mène des travaux de recherche et conduit des expertises scientifiques d'évaluation des risques sur les produits, procédés et/ou pratiques pouvant apporter une contribution scientifique aux investigations épidémiologiques et microbiologiques.

3.1.2. Incidence des TIAC à *B. cereus*

Les TIAC représentent une véritable préoccupation dans les secteurs agroalimentaires et de santé. Aux Etats Unis, 9,4 millions d'infections liées à l'alimentation sont rapportées chaque année, ce qui représente en moyenne 55 961 hospitalisations et 1 351 décès (Scallan *et al.*, 2011). En 2014, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA: European Food Safety Authority) et le centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC), ont annoncé 5251 TIAC dénombrées dans l'Union Européenne, soit un chiffre stable par rapport aux 5196 TIAC survenues en 2013. En 2014, les données européennes indiquent que les TIAC ont touché 45 665 individus, provoquant 6 438 hospitalisations et 27 décès (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2015).

En France, les données de l'InVS indiquent qu'entre 1996 et 2005, *B. cereus* était la quatrième cause de TIAC (Delmas *et al.*, 2006) lorsque nous additionnons le nombre de TIAC confirmées et le nombre de TIAC suspectées. Entre 2007 et 2014, *B. cereus* est devenu la seconde cause de TIAC en France, après *S. aureus* et devant *C. perfringens*, *Salmonella* et les virus entériques (Figure 3). Entre 2007 et 2014, les TIAC à *B. cereus* représentaient 148 foyers confirmés (2 490 cas dont 99 hospitalisations) ; *B. cereus* a été également suspecté d'avoir été impliqué dans 1 043 autres foyers, soit 9 283 cas dont 460 hospitalisations et 5 décès (InVS, 2016, 2015, 2014, 2013, 2012, 2011, 2010, 2009).

Durant cette même période, dans un rapport paru en 2016, l'EFSA a rapporté, conformément à la directive européenne 2003/99/EC8 sur la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques, 1 127 TIAC confirmées et suspectées à *B. cereus* survenues entre 2007 et 2014 dans l'ensemble des états membres de l'Union Européenne (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2016). Les données de TIAC à *B. cereus* collectées par l'EFSA sur cette période sont en très grande majorité les données rapportées par la France.

D'une façon générale, on considère que l'incidence des infections alimentaires à *B. cereus* est sous-estimée car *B. cereus* n'est pas systématiquement recherché en cas de TIAC dans de nombreux pays, sauf certains comme la France. Ce qui explique par exemple que 89,9% des TIAC confirmées et suspectées à *B. cereus* survenues en Europe soient rapportées par la France (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2016). Une autre cause de sous-estimation des TIAC à *B. cereus* pourrait être l'attribution arbitraire de ces foyers à d'autres bactéries telles que *S. aureus* ou *C. perfringens* engendrant les mêmes symptômes gastro-intestinaux.

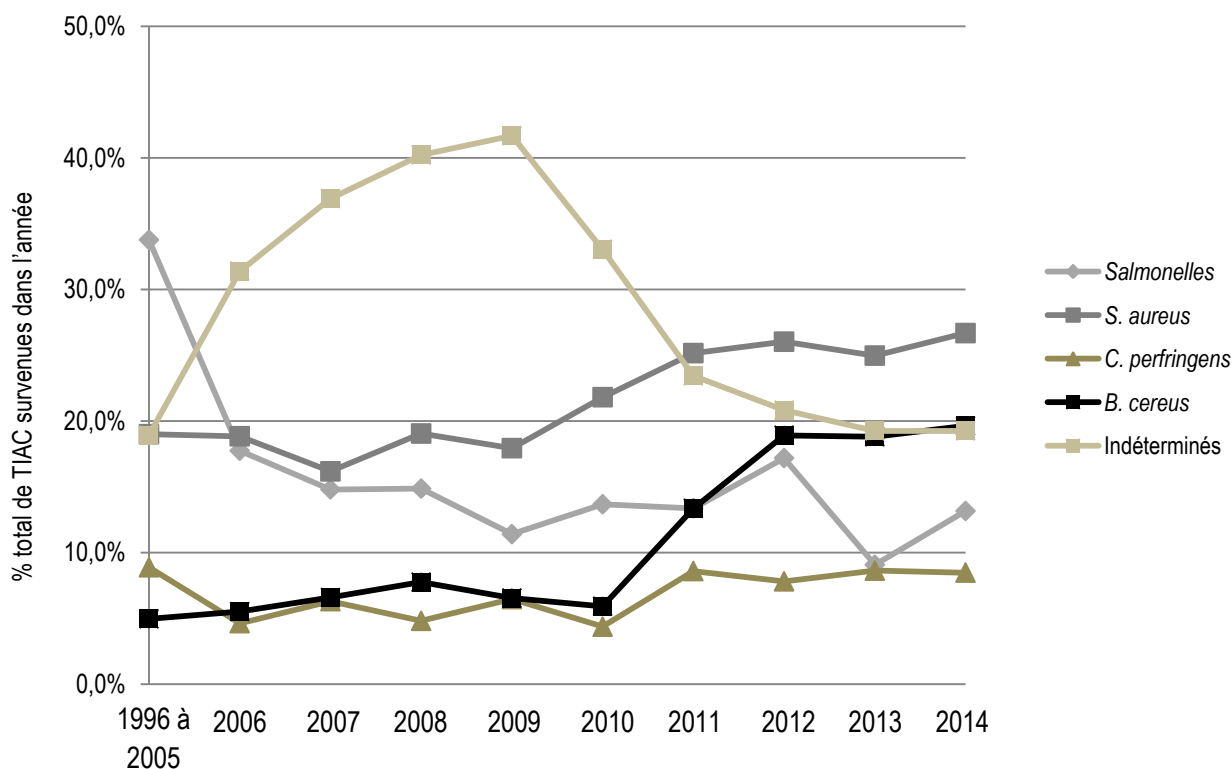


Figure 3 : Evolution du nombre de foyers de TIAC (%) en France par agent pathogène (InVS, 2016, 2015, 2014, 2013, 2012, 2011, 2010, 2009)

3.1.3. Lieu de déclaration des foyers de toxi-infections alimentaires

Les TIAC à *B. cereus* rapportées par l'InVS surviennent préférentiellement en restauration commerciale. En France, entre 2007 à 2014, *B. cereus* était l'agent pathogène à l'origine de 8% des foyers confirmés et suspectés survenus dans le cadre familial, tous pathogènes confondus. En restauration commerciale, 15% des foyers de TIAC ont été associés à *B. cereus*. Enfin, *B. cereus* est à l'origine de 18% des foyers survenus en restauration collective, regroupant les cantines scolaires, les cantines d'entreprises et les instituts médico-sociaux (IMS : maisons de retraite, centre pour personnes handicapées, etc) (InVS 2009 – 2016).

3.1.4. Répartition mensuelle des TIAC

Chaque année, l'InVS rapporte le nombre de TIAC survenues par agent pathogène en fonction des mois. Il n'existe pas un réel effet de saisonnalité sur l'apparition des TIAC à *B. cereus*. Seule une très faible augmentation en été est à noter puisque 30% des foyers de TIAC sont survenus entre les mois de juin et août (InVS, 2016).

3.1.5. Surveillance dans l'alimentation

3.1.5.1. Aliments à considérer

D'après la littérature, *B. cereus* a été détecté dans les catégories d'aliments suivantes : céréales (riz, pâtes), épices, légumes, produits carnés et produits laitiers. Les soupes et champignons déshydratés et les fruits et légumes préemballés, constituent également des produits à risque (Turner *et al.*, 2006). *B. cereus* pose également des problèmes dans l'industrie des produits alimentaires à base d'œuf en tant que bactérie d'altération qui peut détériorer les qualités organoleptiques des aliments (Techer *et al.*, 2014).

En France avant 2013, les données rapportées par l'InVS ne permettaient pas de connaître précisément les matrices alimentaires impliquées dans les TIAC à *B. cereus*. Depuis 2013, les aliments les plus souvent impliqués dans les TIAC à *B. cereus* font essentiellement partie de la catégorie des « autres produits » (52%) regroupant notamment les féculents et les végétaux. Les produits carnés représentaient en 2013 et 2014, 28% des foyers.

A l'échelle européenne, l'EFSA, dans son rapport de 2016, apporte des informations plus précises sur les TIAC confirmées à *B. cereus* entre 2007 et 2014 (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2016). Les « plats composés » représentaient la catégorie la plus fréquemment impliquée dans les TIAC à *B. cereus* avec 28% des foyers, suivis par les produits céréaliers (11% des foyers) et la viande rouge (8%). Les autres matrices alimentaires également impliquées ont été : « la viande de volaille et produits dérivés » (5%), « les légumes et les jus de fruits et autres produits » (5% des foyers) et « les poissons et les produits de la pêche » (3% des foyers). Enfin d'autres produits alimentaires tels que les « crustacés, mollusques et crustacés et mollusques », les « œufs et les produits à base d'œufs », les « produits laitiers », les « herbes et épices », les « produits de boulangerie », les « produits en conserve et boissons » ont représenté moins de 3% des foyers impliqués. Il est à remarquer qu'aucune information sur l'aliment incriminé n'a été renseignée pour 27% des foyers.

3.1.5.2. Risque et actions de maîtrise

L'industrie alimentaire tend de plus en plus à réduire l'intensité des traitements thermiques appliqués afin de mieux respecter les caractéristiques sensorielles, organoleptiques et nutritionnelles des aliments. Cette tendance conduit également à une réduction ou une suppression des ajouts de sels, d'acides organiques ou d'additifs. C'est ce qui s'appelle la démarche « Clean Label ». Ces procédés de transformation peuvent avoir un impact sur la qualité sanitaire des produits. En allant plus loin, ces modifications de procédés peuvent éliminer les formes végétatives des micro-organismes non thermorésistants présents, mais les bactéries capables de sporuler peuvent survivre, ce qui leur confère un net avantage compétitif par rapports aux autres bactéries non sporulantes. La conservation d'un

certain nombre d'aliments à risque repose donc essentiellement sur le maintien de la chaîne du froid. Cependant la réfrigération ainsi appliquée et l'augmentation de la durée de conservation des aliments qui en découle, créent les conditions favorables pour la multiplication de certains germes psychrotrophes et pourraient donc sélectionner les bactéries capables de se multiplier dans ces conditions. Parmi ces bactéries, il existe des bactéries d'altération et des germes pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires comme par exemple *B. weihenstephanensis*, *B. wiedmannii* (Miller *et al.*, 2016; Techer *et al.*, 2014) et *B. cereus*. Le développement de la restauration hors foyer familial, ainsi que la mise sur le marché d'une large gamme d'aliments réfrigérés prêts à l'emploi (produits de 4^{ème} et 5^{ème} gammes), dont font partie les préparations réfrigérées précuites, les repas prêts à consommer (plats cuisinés, desserts) et les produits déshydratés, ont changé les habitudes alimentaires des consommateurs et pourraient contribuer à l'augmentation des TIAC à *B. cereus* (Ehling-Schulz *et al.*, 2004). Dans l'union Européenne, seul un critère réglementaire d'hygiène des procédés pour *B. cereus* a été établi pour les poudres de lait déshydratées destinées aux nouveaux-nés avec une limite tolérée de 50 UFC/g (règlement CE N° 1441/2007 du 5 décembre 2007). En France, le seuil d'alerte est fixé à 10³ UFC/g pour ces produits et à 10⁵ UFC/g pour les autres denrées alimentaires (note de service DGAL/MUS/N2009-8188 du 07/07/2009). L'Irlande, le Royaume Uni et la Belgique ont des critères microbiologiques pour *B. cereus* uniquement dans les plats « ready to eat » avec une limite tolérée de 10³ UFC/g. Le risque *B. cereus* n'est pas maîtrisé de la même manière dans tous les pays européens.

Pour toutes ces raisons et dans un objectif d'évaluation des risques associés à ces produits, il est nécessaire de connaître les actions de contrôle et de maîtrise menées en milieu industriel mais aussi au niveau de la préparation et de la conservation des aliments.

La bactérie sous sa forme végétative est sensible à tous les désinfectants utilisés et autorisés en industrie agroalimentaire (Kerr, 2009). En ce qui concerne les spores de *B. cereus*, les nettoyages à base de soude à chaud peuvent permettre plusieurs réductions logarithmiques des spores adhérant aux surfaces. Des résultats similaires sont observés sur les spores lorsque le nettoyage se fait avec des désinfectants chlorés contenant au moins 100 à 200 mg/L de chlore actif (Young and Setlow, 2003).

L'irradiation, des aliments qui consiste à exposer des aliments à des rayons ionisants permet également de réduire le nombre de spores dans les aliments. La population est réduite d'un logarithme après une exposition à des rayons d'énergie compris entre 1,6 et 2,6 kGy (Setlow, 2006).

La température des procédés de fabrication et les températures de cuisson sont également des facteurs très importants dans la maîtrise des risques des contaminations à *B. cereus*. Cela ne permet pas de garantir l'absence totale de bactéries ou de spores dans les aliments mais peut suffire à détruire les *B. cereus* les plus thermosensibles tandis que les autres seront détruits par les traitements

d'appertisation. Par exemple, les traitements thermiques de 2 minutes à 95°C sur de la viande de porc, de 1 à 8 minutes à 100°C sur une préparation de riz ou de 4 minutes à 120°C pour les huiles de soja vont diminuer d'un logarithme la population de spores initiale (Byrne *et al.*, 2006). Les toxines diarrhéiques seront détruites après un traitement à 56°C pendant 5 minutes. Cependant, la stabilité thermique et chimique du céréulide est remarquable, même à des températures très élevées (121°C pendant 2 h) (Rajkovic *et al.*, 2008). Il est donc important de maîtriser le développement de *B. cereus* que ce soit sous sa forme végétative ou sporulée au cours des processus de fabrication. À de hautes pressions (550 à 600 Mpa), un traitement thermique de 60-70°C inactive les spores de *B. cereus* (Luu-Thi *et al.*, 2014).

Il a été démontré qu'une atmosphère appauvrie en oxygène inhibe la production du céréulide et cela suggère que l'oxygène est un facteur essentiel dans sa production (Jääskeläinen *et al.*, 2004). Effectivement, dans des conditions anaérobies avec moins de 1 – 2% de O₂, la production n'a pas lieu (Rajkovic *et al.*, 2006). Pour quelques *B. weihenstephanensis* psychrotrophes qui ont la capacité de produire le céréulide, il a été montré qu'un niveau d'oxygène restreint (0-2% O₂ et 20% de CO₂) empêche la production de céréulide. Plus les taux d'oxygène et de transfert d'oxygène du matériau d'emballage sont faibles, plus la concentration finale de la toxine émétique dans l'aliment sera faible (Thorsen *et al.*, 2009). Le conditionnement sous atmosphère modifiée peut ainsi contribuer à la maîtrise des risques liés à *B. cereus*. Cependant, l'effet de l'oxygène sur la production du céréulide *in vitro* a été remis en question puisque des résultats contradictoires ont été décrits, et cela notamment en raison de l'agitation variable utilisée d'une étude à l'autre (Shaheen *et al.*, 2006).

Des corrélations ont été rapportées par l'EFSA entre l'apparition de TIAC à *B. cereus* et le manque de maîtrise dans les procédés de fabrication et de préparation des plats en restauration. Ainsi, en 2014, 9% des foyers causés par *B. cereus* étaient dus à un traitement thermique insuffisant, suivis par 7% des foyers en lien avec une contamination croisée manuportée par un opérateur. Une réfrigération insuffisante a été à l'origine de 4% des foyers et une contamination croisée a été signalée comme un facteur contributif dans 3% des foyers (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2015).

Les bonnes pratiques d'hygiène (BPH) sont donc des pré-requis indispensables pour prévenir le développement de *B. cereus* dans les ateliers de fabrication et le personnel doit faire l'objet d'une formation et d'un suivi à ce sujet. Le nettoyage et la désinfection sont des étapes essentielles dans la prévention des contaminations des équipements utilisés pour acheminer et traiter les aliments sur les différents postes de fabrication et/ou transformation.

Tout particulièrement en restauration collective, il est important de refroidir rapidement les aliments cuisinés pour empêcher la germination des spores et la multiplication des cellules végétatives. Les

aliments non consommés immédiatement après préparation et dans lesquels *B. cereus* peut être présent et se développer, doivent être maintenus au-dessus de 63°C ou faire l'objet d'un refroidissement rapide pour passer de plus de 63°C à moins de 10°C en moins de deux heures (d'après l'arrêté du 21 décembre 2009, disponible sur le site internet de la DGAI: Galatéeopro). Cette réglementation en restauration collective a pour objectif de limiter la prolifération des germes pathogènes. Le réchauffage des plats doit être rapide, de 10°C à 63°C en moins d'une heure, selon les mêmes principes. Les plats froids doivent être maintenus à moins de 3°C, avec une tolérance jusqu'à 10°C pendant moins de deux heures avant le service. Les plats préparés à l'avance ont une durée de vie de trois jours maximum.

3.1.5.3. Relation dose-réponse

Les intoxications dues à l'ingestion de spores ou de cellules végétatives à l'origine des maladies diarrhéiques sont souvent associées à une population de *B. cereus* comprise entre 10^5 à 10^8 UFC/g ou spores/g d'aliments consommés (Granum and Lund, 1997). Cependant, une étude a montré que des concentrations inférieures à 10^3 UFC/g ont déjà été à l'origine de TIAC (Cadel Six *et al.*, 2012). De plus, définir la dose minimale infectieuse est difficile parce que le potentiel toxigène des souches diarrhéiques de *B. cereus* est très variable et ne dépend pas uniquement du nombre de cellules bactériennes (Guinebretiere *et al.*, 2002; Jeßberger *et al.*, 2015).

Les intoxications sont dues à l'ingestion d'une dose suffisante de céréulide, de l'ordre de 8 à 10 µg/kg de poids corporel, d'après des études menées sur les animaux (Marxen *et al.*, 2015; Messelhäusser *et al.*, 2014). Cette quantité de céréulide peut être produite par des niveaux de *B. cereus* compris entre 10^5 et 10^6 UFC/g d'aliments (Gilber and Kramer, 1986). Cependant, d'autres recherches sont nécessaires pour définir la dose émétique réelle pour l'homme. Lors de TIAC récentes, des concentrations en céréulide allant de 2 à 6 µg/g d'aliment ont été rapportées (Delbrassinne *et al.*, 2015). D'un point de vue clinique, des prélèvements effectués chez des patients souffrant d'un syndrome émétique ont montré la présence du céréulide dans le liquide gastrique (0,004 µg/mL), le sérum sanguin (0 à 0,004 µg/ml), l'urine (0 à 0,008 pg/ml) et les selles (0,16 à 0,80 mg/g) (Shiota *et al.*, 2010).

3.2. Infections non gastro-intestinales

B. cereus est aussi un pathogène opportuniste émergent ayant un impact de plus en plus reconnu dans les infections non gastro-intestinales. Celles-ci sont plus rares mais aussi plus graves. La présence de *B. cereus* dans l'organisme de l'hôte déclenche une inflammation et induit une réponse immunitaire. Il a

été montré que la bactérie était capable de contourner et résister aux défenses immunitaires de l'hôte (Stretton and Bulman, 1975; Tran and Ramarao, 2013).

3.2.1. Définition

Les infections non gastro-intestinales sont des infections locales ou systémiques qui ne sont pas liées au tractus intestinal. Ces infections à *B. cereus* ne sont pas à déclarations obligatoires. Il est donc difficile de mesurer le risque et l'incidence de *B. cereus* dans les infections non gastro-intestinales en France et dans le monde. Il existe quelques études de cas spécifiques survenus au sein d'un service hospitalier en particulier ou au sein de plusieurs services d'un même hôpital. C'est le cas pour une étude concernant 57 patients infectés par *B. cereus* et ayant développé des bactériémies au centre hospitalier universitaire (CHU) de Nîmes entre 2008 et 2012 (Veysseyre *et al.*, 2015). Ces études sont isolées, dépendantes des hôpitaux, et ne donnent pas d'indication sur l'incidence de ces infections à grande échelle.

3.2.2. Aspects cliniques

Depuis longtemps, *B. cereus* est considéré comme un contaminant lorsqu'il est isolé à partir d'échantillons cliniques d'origines diverses (sang, blessures, expectorations, etc.) mais un grand nombre d'études de cas ont montré la capacité de *B. cereus* à engendrer des infections locales et systémiques ainsi que son implication dans des cas mortels (Kato *et al.*, 2016).

B. cereus est à l'origine d'endophtalmies ou de parodontites qui s'accompagnent de la dégradation de l'os supportant les dents (Helgason *et al.*, 2000; Hemady *et al.*, 1990). L'endophtalmie est une infection oculaire diminuant l'acuité visuelle à la suite d'une infection microbienne traumatique ou systémique de l'intérieur de l'œil (Callegan *et al.*, 1999). La gravité de l'infection peut varier en fonction de l'agent microbien et de la rapidité du traitement. *B. cereus* provoque des endophtalmies malignes qui sont dévastatrices pour l'œil. Elles peuvent être divisées en deux catégories: les endophtalmies exogènes, attribuables à un traumatisme pénétrant dans le globe oculaire, et les endophtalmies endogènes qui sont dues à une infection du segment postérieur de l'œil à partir d'un site distant, souvent par dissémination hématogène. *B. cereus* est aussi impliqué dans des endophtalmies post-traumatiques qui peuvent se produire dans 2 à 7% des blessures oculaires (Alfaro *et al.*, 1996). Ces cas se révèlent très graves puisque 75 à 91% des patients subissent une perte d'acuité visuelle, une éviscération ou une énucléation (Chan *et al.*, 2003).

B. cereus est à l'origine d'infections du système nerveux central et peut provoquer des hémorragies méningées (Kawatani *et al.*, 2009) et des abcès au cerveau (Tanabe *et al.*, 2009). Ces infections

surviennent généralement à la suite de bactériémies ou de chimiothérapies d'induction (Arnaout *et al.*, 1999).

B. cereus peut provoquer d'autres infections systémiques : des infections du cœur (endocardites, péricardites) ou générales (bactériémies) (Akesson *et al.*, 1991; Arnaout *et al.*, 1999; Drobniewski, 2013; Miller *et al.*, 1997; Turnbull *et al.*, 1979). Des études ont montré notamment que les taux de morbidité et de mortalité associés aux endocardites à *B. cereus* sont élevés chez les patients atteints d'une maladie des valves cardiaques (Block *et al.*, 1978; Sliman *et al.*, 1987).

B. cereus est également impliqué dans des infections systémiques et des méningites chez les nouveaux nés et en particulier chez les grands prématurés (Lebessi *et al.*, 2009). Malheureusement, *B. cereus* a fait l'actualité ces dernières semaines suite aux décès de deux nouveaux nés prématurés à l'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (APHP) (Le Monde, 03.09.2016). Il a été question d'une infection qui s'est développée suite à la consommation supposée de lait contaminé par *B. cereus* en provenance du lactarium de l'hôpital Necker. Aucun lien n'a encore été établi entre les souches isolées des patients et celles présentes dans le lait mais le danger engendré par ces contaminations est avéré.

B. cereus est également à l'origine d'infections locales qui surviennent généralement à la suite d'un traumatisme, comme par exemple l'entrée d'un corps étranger dans l'organisme ou des brûlures. C'est en raison de la grande distribution des spores de *B. cereus* dans l'environnement, en particulier dans le sol, que des infections de plaies ouvertes peuvent se produire dans des situations post-opératoires (Akesson *et al.*, 1991) ou post-traumatiques (Krause *et al.*, 1996). La contamination peut avoir lieu au moment du traumatisme initial, en raison de la présence de spores de *B. cereus* dans l'environnement, ou alors comme infection acquise à l'hôpital en tant qu'agent pathogène secondaire. *B. cereus* peut également être isolé sur des plaies d'escarres (nécrose de la peau) ressemblant à ceux provoqués par *B. anthracis* (Marston *et al.*, 2016).

En outre, plusieurs cas d'infections fulminantes à *B. cereus*, similaires à la forme inhalée de la maladie du charbon et touchant des individus en bonne santé, ont été rapportés (Avashia *et al.*, 2007; Hoffmaster *et al.*, 2006). C'est le cas pour deux travailleurs âgés de 41 et 46 ans qui ont développé une pneumonie avec des symptômes proches de ceux provoqués par une infection à *B. anthracis* (Miller *et al.*, 1997). Les souches isolées des patients possédaient le gène de virulence *pagA* porté par le plasmide pXO1 de *B. anthracis*. Le gène *pagA* code l'antigène protecteur PA qui associé au facteur létal LE forment la toxine létale de *B. anthracis*. Il a donc été démontré que des souches de *B. cereus* possédant les gènes codant les facteurs de virulence ou les gènes de biosynthèse de la capsule de la toxine de *B. anthracis* peuvent être à l'origine d'infections pulmonaires sévères (Hoffmaster *et al.*, 2006).

Ces pathologies démontrent que *B. cereus* est un pathogène à part entière qui doit être pris en considération lors de son isolement dans des prélèvements cliniques. Il est capable d'induire une réaction inflammatoire et des travaux ont montré sa capacité à contourner les défenses immunitaires de l'hôte en sécrétant des facteurs de virulence (Tran and Ramarao, 2013).

3.2.3. Mode de contamination

Compte tenu de son caractère ubiquitaire, *B. cereus* peut être retrouvé dans l'environnement hospitalier où il pose un réel problème. De nombreux cas ont été rapportés dans la littérature au sujet d'infections nosocomiales déclarées chez des patients hospitalisés, souvent immunodéprimés. Plusieurs sources ont été identifiées comme réservoirs de *B. cereus* : les équipements de filtration de l'air et de ventilation, le matériel de bronchoscopie, le linge, les gants, les mains du personnel, les cathéters intraveineux, les solutions hydro-alcooliques pour les mains et les ballons de ventilation manuelle dans les services de réanimation (Barrie *et al.*, 1994; Bryce *et al.*, n.d.; Hernaiz *et al.*, 2003; Hsueh *et al.*, 1999; Moyer *et al.*, 2009; Van Der Zwet *et al.*, 2000; York, 1990).

Des cas de bactériémies ou septicémies à *B. cereus* liées à une contamination par les cathéters sont documentées dans la littérature, en particulier chez les patients immunodéprimés (Kuroki *et al.*, 2009). Par sa capacité à former des biofilms (Auger *et al.*, 2009), *B. cereus* peut facilement adhérer à la surface des cathéters et entraîner des infections persistantes jusqu'au retrait du cathéter. Ces situations posent des problèmes thérapeutiques puisque le traitement antibiotique administré sera efficace contre les bactéries planctoniques, détachées du biofilm, alors que les bactéries au sein du biofilm sont protégées de l'action bactéricide (Stewart and Costerton, 2001). La formation de biofilm, en plus de la capacité à sporuler, permet à *B. cereus* d'échapper aux traitements et de persister dans l'environnement hospitalier.

- Matériels d'injection

B. cereus peut contaminer son hôte depuis différentes sources et par différentes voies d'entrée. Des endophthamies ont été causées par *B. cereus* à la suite de transfusions sanguines par voie intraveineuse (Kerkenezov, 1953), par des aiguilles (Grossniklaus *et al.*, 1985; Tuazon *et al.*, 1974) ou par l'administration de médicaments contaminés comme la vitamine B (Bouza *et al.*, 1979) ou l'insuline (Motoi *et al.*, 1997). Des bactériémies à *B. cereus* développées par des toxicomanes sont également liées à des contaminations de l'héroïne et du matériel d'injection (Lee and Ho, 1974; Weller *et al.*, 1979).

La pathogenèse des infections du système nerveux central par *B. cereus* est encore méconnue, bien que plusieurs facteurs de risque soient considérés. Effectivement, un nombre important de patients ont

développé des lésions nécrosantes du cerveau après une chimiothérapie intrathécale (Gaur *et al.*, 2001; Jenson *et al.*, 1989). Il est supposé qu'en plus de promouvoir la neutropénie, cette procédure pourrait introduire des spores de *B. cereus* depuis des sources environnementales.

- Prothèses et chirurgie

Des endocardites à *B. cereus* chez des patients possédant une prothèse valvulaire mitrale (Block *et al.*, 1978), un dispositif intra-vasculaire ou un stimulateur cardiaque ont été décrites (Oster and Kong, 1982; Steen *et al.*, 1992). De la même façon, des infections de l'œil sont survenues à la suite d'interventions chirurgicales (cataracte) (Callegan *et al.*, 1999).

- Tractus gastro-intestinal

Il a été plusieurs fois avancé que le tractus gastro-intestinal pourrait être une source potentielle impliquée dans le développement des infections du système nerveux central par *B. cereus*. Des cas ont été décrits, comme par exemple des patients hospitalisés aux urgences à la suite de troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements ou diarrhée) qui par la suite ont développé une infection au niveau du cerveau (72h après l'hospitalisation) ou bien ont présenté ces symptômes simultanément à l'infection du système nerveux central (Akiyama *et al.*, 1997; Funada *et al.*, 1988; Gaur *et al.*, 2001). L'hypothèse avancée est que l'entrée de *B. cereus* dans l'organisme à partir d'une source exogène, comme la nourriture, l'eau et le lait (Le Monde, 03.09.2016), provoque un envahissement gastrique puis une nécrose de la muqueuse avant de se propager dans le foie et le système nerveux central (Akiyama *et al.*, 1997; Decousser *et al.*, 2013; Funada *et al.*, 1988). Des biopsies effectuées à la suite du décès de ces patients confirment en partie cette hypothèse en mettant en évidence la présence de *B. cereus* dans le foie après des abcès développés au niveau du cerveau. Il existe également des cas où les patients ont développé des bactériémies fatales avec des symptômes cliniques de gastro-entérite aiguë qui ont évolué vers des méningites infectieuses et des abcès au niveau du foie (Funada *et al.*, 1988).

3.2.4. Facteurs de risque

B. cereus peut être considéré comme un pathogène opportuniste. Ainsi, le caractère immunodéprimé des patients peut favoriser le développement d'infections. Les nourrissons et surtout les grands prématurés sont plus sensibles aux infections à *B. cereus*, particulièrement au niveau du système nerveux central (Evreux *et al.*, 2007; Lebessi *et al.*, 2009; Lequin *et al.*, 2005; Manickam *et al.*, 2008). Les patients immunodéprimés (leucémies, diabète, HIV, etc.) dont le système immunitaire est affaibli, par exemple en raison de la chimiothérapie, développent plus facilement des infections à la suite de la

colonisation par *B. cereus* du matériel hospitalier ou du tractus gastro-intestinal (Le Scanff *et al.*, 2006). En dehors de l'immunodépression, il n'existe pas de facteurs de risque connus pour *B. cereus*.

3.2.5. Recommandations des traitements antibiotiques en thérapeutique

Il n'existe pas actuellement de recommandations spécifiques pour l'étude et l'interprétation de l'antibiogramme des *B. cereus* de la part du Comité de l'Antibiogramme (CASFM) ou de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). En revanche, les concentrations critiques pour un nombre restreint d'antibiotiques ont été définies aux États Unis par le Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (Hindler and Richter, 2016). Dans le cadre d'une suspicion d'infection à *B. cereus*, un traitement empirique peut être nécessaire, en attendant les résultats du profil de sensibilité aux antibiotiques. *B. cereus* possède des résistances naturelles aux antibiotiques. Ainsi, la production de β -lactamases est le mécanisme essentiel de *B. cereus* dans sa résistance aux antibiotiques de la famille des pénicillines et des céphalosporines de 3^{ème} génération. L'intérêt de plusieurs autres antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram positif comme le linézolide, l'acide fusidique ou la fosfomycine reste à évaluer même, si une étude a récemment montré leur efficacité sur *B. cereus* (Frenzel *et al.*, 2015; Ikeda *et al.*, 2015). D'autre part, le choix thérapeutique peut être compliqué par l'apparition de résistances à l'érythromycine, à la tétracycline et aux carbapénèmes (Kiyomizu *et al.*, 2008; Savini *et al.*, 2008).

De plus, les spores qui sont des formes dormantes dans lesquelles les antibiotiques ne peuvent ni pénétrer, ni diffuser, sont donc inaccessibles aux traitements antibiotiques.

Chapitre 3 : Toxines et facteurs de virulence

Une bactérie pathogène est définie par sa capacité à infecter un hôte en provoquant chez lui des effets néfastes. Pour cela, la bactérie emploie des stratégies afin de créer des conditions favorables et essayer d'assurer sa survie.

La virulence bactérienne résulte de l'expression de plusieurs facteurs génétiques qui peuvent être subdivisés en trois classes (Wassenaar and Gaastra, 2001) :

- Les gènes de virulence à proprement parler codant des protéines, telles que les toxines, directement impliquées dans l'endommagement des tissus de l'hôte. Ces gènes ne sont pas présents ou exprimés chez les souches hypovirulentes.
- Les gènes impliqués dans la colonisation de l'hôte et/ou dans le contournement du système immunitaire, permettent au pathogène d'établir son cycle infectieux au sein de l'hôte. Font partie de cette catégorie une liste non exhaustive de gènes codant des adhésines, flagellines, invasines, couche S, lipopolysaccharides.
- Les gènes associés à la virulence qui codent l'ensemble des produits nécessaires à l'activité des facteurs de virulence des deux premières classes. Dans cette catégorie, sont recensés les gènes de maturation tels que les méthylases et molécules chaperonnes, les gènes impliqués dans la sécrétion des facteurs de virulence, les gènes impliqués dans l'approvisionnement du pathogène en nutriments et la compétition avec la microflore de l'hôte et les gènes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes de virulence.

Il existe de nombreux facteurs potentiellement impliqués dans la virulence de *B. cereus* dont les gènes sont chromosomiques ou plasmidiques. Parmi ces facteurs de virulences, les plus décrits sont le céréulide, les entérotoxines Nhe et Hbl, les « pore forming toxins » CytK et HlyII, les phospholipases PI-PLC, PC-PLC et SM-PLC, et les protéases InhA1 et NprA.

1. Le céréulide

Le céréulide est la toxine responsable du syndrome émétique de *B. cereus*. C'est un petit polypeptide cyclique de 12 acides aminés (dodécadepsipeptide), liés par des liaisons peptidiques ou esters (Agata *et al.*, 1994). Il est produit par une peptide synthétase non ribosomale (Ehling-Schulz *et al.*, 2004). L'ensemble de la machinerie enzymatique nécessaire à l'assemblage du céréulide est codée par le locus *ces* (24kb). Le gène *ces* est utilisé comme marqueur pour identifier les souches de *B. cereus* productrices de la toxine émétique. Ces souches sont dénommées « souches émétiques ». Le locus est porté par un plasmide de 270 kb, pBCE, présentant des similarités avec pXO1 de *B. anthracis* (Ehling-Schulz *et al.*, 2006; Rasko *et al.*, 2007).

Par sa structure, le céréulide n'est pas affecté par les températures élevées (121°C pendant 15 min), le pH acide jusqu'à pH 2, et les protéases intestinales comme la trypsine et la pepsine (Shinagawa *et al.*, 1996). Il est très faiblement immunogène et peut atteindre l'intestin sans être dégradé.

Le céréulide est un ionophore de potassium et permet son transport à travers les membranes. Par ce transport, il cause le gonflement des mitochondries, inhibant leur activité (Mikkola *et al.*, 1999). Le céréulide induit l'apoptose de plusieurs types cellulaires (Jääskeläinen *et al.*, 2003; Virtanen *et al.*, 2008), en particulier les cellules hépatiques (Yokoyama *et al.*, 1999) et les cellules NK de la réponse immunitaire (Paananen *et al.*, 2002). Les vomissements sont dus à l'activation du nerf vague afférent suite à la fixation du céréulide à des récepteurs spécifiques (Agata *et al.*, 1995).

Les souches productrices du céréulide appartiennent au groupe phylogénétique *panC* III décrit par Guinebretière *et al.* (Guinebretière *et al.*, 2008) et présentent d'autres caractéristiques génétiques et phénotypiques : elles ne possèdent pas les gènes codant l'entérotoxine Hbl, sont peu ou pas hémolytiques, et ne peuvent pas dégrader l'amidon (Ehling-Schulz *et al.*, 2005). Ces souches ne se développent pas à des températures inférieures à 10°C (Carlin *et al.*, 2006). Les cellules eucaryotes HepG2, lignée isolée d'un hépatome humain, sont particulièrement sensibles à la toxicité engendrée par le céréulide et sont un bon indicateur pour évaluer la virulence des *B. cereus* producteurs de cette toxine (Wehrle *et al.*, 2009).

2. Les entérotoxines

L'hémolysine BL (Hbl) a été la première entérotoxine de *B. cereus* identifiée (Beecher and Wong, 1994). Elle est composée de trois protéines, B, L1 et L2 (Beecher and Macmillan, 1991; Thompson *et al.*, 1984). Ces trois sous-unités sont codées respectivement par les gènes *hblA*, *hblD*, et *hblC*, organisés en opéron (Ryan *et al.*, 1997). Hbl est cytotoxique pour les cellules intestinales mais aussi pour les érythrocytes (Beecher and MacMillan, 1990), les cellules épithéliales rénales Vero (Granum and Lund, 1997), le tissu dermique (Thompson *et al.*, 1984) et rétinale (Beecher *et al.*, 1995; Beecher and Wong, 2000a). Les érythrocytes sont lysés par Hbl à la suite d'un mécanisme osmotique dû à l'assemblage des trois sous-unités qui forment un pore transmembranaire. Celui-ci permet le passage d'eau, d'ions et de molécules de faible poids moléculaire (Beecher and Wong, 1997).

L'opéron *hbl* n'est présent que dans certaines souches de *B. cereus*. Sa représentativité varie de 40 à 90% selon les études et les collections de souches testées (Guinebretière *et al.*, 2002; Hansen and Hendriksen, 2001; Ngamwongsatit *et al.*, 2008; Swiecicka and Mahillon, 2006). Certaines souches de *B. cereus* ont été associées à des toxi-infections alimentaires alors qu'elles ne possédaient pas l'entérotoxine Hbl, suggérant ainsi l'existence d'autres entérotoxines (Granum *et al.*, 1996).

La toxine Nhe (Non Haemolytic Enterotoxin) a été isolée d'une souche associée à une toxi-infection alimentaire ne possédant pas les gènes codant l'entérotoxine Hbl (Lund and Granum, 1996). Il s'agit là aussi d'un complexe protéique à trois sous-unités, NheA, NheB, et NheC, dont les gènes sont organisés en opéron (Granum *et al.*, 1999).

Nhe est cytotoxique pour les cellules de l'épithélium rénal (Vero) et colorectal (Caco-2), et les érythrocytes (Fagerlund *et al.*, 2008). Comme dans le cas de Hbl, ces propriétés cytotoxiques sont dues à l'assemblage des trois sous-unités de Nhe en pores transmembranaires qui mènent à la lyse osmotique des cellules. Nhe est reconnue comme la toxine diarrhéique majeure de *B. cereus* en raison de la forte corrélation entre la cytotoxicité des filtrats de culture d'un grand nombre de souches sur cellules Vero et leur concentration en Nhe, indépendamment de celle en Hbl (Moravek *et al.*, 2006).

Depuis, il a été décrit que les gènes codant la toxine Nhe sont présents dans toutes les souches de *B. cereus* (Fagerlund *et al.*, 2007; Moravek *et al.*, 2006; Ngamwongsatit *et al.*, 2008), bien qu'exprimés en quantité plus ou moins élevée. Guinebretière *et al.*, rapportent qu'il y a proportionnellement plus de souches qui expriment fortement Nhe lorsque celles-ci sont impliquées dans des TIAC par rapport à des souches isolées d'aliments n'ayant *a priori* pas engendré de symptômes (Guinebretiere *et al.*, 2002). En outre, il existe des homologies de séquence entre les complexes Hbl et Nhe, et, à l'intérieur de ces complexes, entre leurs composants (Granum *et al.*, 1999). En revanche, les sous-unités de Hbl et Nhe ne sont pas interchangeables et aucune autre similarité n'a été trouvée avec d'autres toxines de *B. cereus* (Fagerlund *et al.*, 2008).

A l'aide de tests immunoenzymatiques, permettant une quantification relative, Moravek *et al.*, ont également montré que le niveau d'expression médian de Nhe et de Hbl est plus élevé chez les souches impliquées dans des toxi-infections alimentaires que chez celles isolées de l'environnement ou d'aliments n'ayant pas été impliqués dans des toxi-infections (Moravek *et al.*, 2006). Deux kits existent dans le commerce : le kit immunologique BCET-RPLA de Oxoid qui permet la détection et la semi-quantification de la sous-unité Hbl-L2 de l'entérotoxine Hbl. C'est une réaction de type « reversed passive latex agglutination » (RPLA) où des billes de latex vont s'agglutiner et former une « lattice structure » en présence de l'entérotoxine. Le kit immunologique BDE VIA™ de Tecra est un test ELISA classique permettant de semi-quantifier les sous-unités NheA et NheB de l'entérotoxine Nhe dans un surnageant de culture (Ceuppens *et al.*, 2012).

Des études ont montré que la toxicité *in vitro* des souches de *B. cereus* serait directement liée à la production des entérotoxines Hbl et Nhe (Jeßberger *et al.*, 2013; Wehrle *et al.*, 2009). Effectivement, 90% de cette toxicité serait due au couple Nhe/Hbl et directement corrélée à la quantité des sous-unités Hbl-L1, Hbl-B et Nhe-B (Jeßberger *et al.*, 2013). Une étude a montré la corrélation qui existe entre le niveau de toxicité des *B. cereus* sur les cellules Caco-2 et leur classification dans un des sept groupes

phylogénétiques *panC*. Les souches appartenant aux groupes III et VII sont fortement cytotoxiques par rapport aux souches du groupe VI (Guinebretiere *et al.*, 2010). Cependant il n'y a pas de corrélation évidente décrite à ce jour entre les niveaux de toxicité *in vitro* des souches impliquées dans des infections gastro-intestinales, ou non-gastro-intestinales et les souches n'ayant pas engendré de pathologies (Jeßberger *et al.*, 2015).

L'entérotoxine FM (EntFM) a été caractérisée pour la première fois par un transfert de protéines de type Western Blot de la souche FM1 de *B. cereus* (Asano *et al.*, 1997). Elle a été identifiée comme étant responsable de perméabilité vasculaire chez le lapin, d'infiltration sur des anses ligaturées de lapins et de toxicité sur les cellules épithéliales Vero (Shinagawa *et al.*, 1991). Tran *et al.*, ont démontré qu'EntFM est une peptidase membranaire impliquée dans la mobilité et la morphologie de *B. cereus*. Cette entérotoxine favorise l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales et participe à la formation de biofilms (Tran *et al.*, 2010). Elle a été renommée CwpFM pour cell wall peptidase FM.

3. Les « pore forming toxins »

La cytotoxine K (CytK) a été identifiée pour la première fois à partir d'une souche de *B. cereus* ayant causé la mort de trois personnes âgées en France (1998) qui avaient ingéré une purée de légumes contaminée (Lund *et al.*, 2000). Les tests immunologiques ont révélé que ni Nhe ni Hbl n'étaient produits par cette souche. CytK a donc été considérée comme une des toxines diarrhéiques supplémentaires de *B. cereus* capable de provoquer des infections gastro-intestinales. CytK est structuralement similaire à la β -toxine de *C. perfringens*. Ces toxines forment, par oligomérisation, un canal ionique transmembranaire entouré de feuilletts. Elles sont responsables d'entérites nécrotiques graves (Hunter *et al.*, 1993; Miclard *et al.*, 2009; Steinthorsdottir *et al.*, 2000) en plus d'être dermonécrotiques par injection intra-cutanée chez le cochon d'Inde, cytotoxiques sur les cellules épithéliales Caco-2, les cellules Vero, et les érythrocytes (Hardy *et al.*, 2001; Lund *et al.*, 2000).

Il existe deux variants de la cytotoxine K : CytK-1 et CytK-2 qui partagent 89% d'identité. Les études ont montré que le variant CytK-2 est cinq fois moins toxique que le variant CytK-1 sur les cellules Caco-2 et Vero (Fagerlund, 2004). La prévalence du gène *cytK-1* est faible et ce gène n'est présent que chez les souches de l'espèce *B. cytotoxicus* (Guinebretiere *et al.*, 2013). Comme pour le gène *hbl*, la prévalence de *cytK-2* varie significativement en fonction des collections étudiées. Des études ont montré qu'il était présent dans 13% des souches testées, alors que d'autres études ont montré sa présence dans 87% des souches testées (Ngamwongsatit *et al.*, 2008; Stenfors and Granum, 2001). Il semblerait tout de même que *cytK-2* soit plus fréquemment retrouvé chez des souches à l'origine de TIAC que chez les souches isolées d'aliments sains (Guinebretiere *et al.*, 2006). Dans l'étude menée dans le cadre de mes

travaux de thèse, il a été montré que le gène *cytK-2* était porté par 42% des souches à l'origine de TIAC (Glasset *et al.*, 2016).

L'hémolysine II (HlyII) forme des pores transmembranaires heptamériques de petite taille (d'un diamètre moyen de 1 à 4 nm) permettant spécifiquement le passage d'anions (Andreeva *et al.*, 2007). Elle présente 39% d'identité avec CytK-2 et 30% d'identité avec la famille des "β-barrel pore forming toxins" à laquelle elle appartient (Lund *et al.*, 2000).

HlyII peut s'insérer dans la membrane de différents types cellulaires ou dans des bicouches lipidiques artificielles et ne semble pas requérir de récepteur spécifique (Andreeva *et al.*, 2006). L'activité cytotoxique de HlyII a ainsi été rapportée sur des érythrocytes, des cellules neuronales (Paju) et épithéliales (Caco-2), des macrophages, des monocytes et cellules dendritiques (Andreeva *et al.*, 2006; Sinev *et al.*, 1993; Tran and Ramarao, 2013) (Figure 4). Des observations *in vitro* et *in vivo* chez l'insecte ont montré que la formation de pores par HlyII dans la membrane des cellules phagocytaires entraîne leur apoptose et permet ainsi à *B. cereus* de contourner les défenses immunitaires de l'hôte (Tran and Ramarao, 2013).

L'importance de HlyII dans le pouvoir pathogène de *B. cereus* a été mise en évidence chez plusieurs modèles, invertébrés et mammifères. La virulence de *B. cereus* par injection chez *Bombyx mori* ou par inoculation intranasale chez la souris est réduite de près de 50% en l'absence de HlyII. L'injection de l'hémolysine II purifiée seule est également très toxique chez la souris (Tran *et al.*, 2011). Une autre étude montre que l'intégration du gène *hlyII* chez l'hétérologue non pathogène *Bacillus subtilis*, administré par voie orale chez le *Daphnia magna* (crustacé planctonique), entraîne la dégradation de son intestin et aboutit à la mort (Sineva *et al.*, 2009). Le gène *hlyII* est présent dans environ un quart des souches de *B. cereus* (Fagerlund, 2004) et celles qui portent ce gène sont décrites comme pathogènes (Cadot *et al.*, 2010).

«La version de diffusion ne comporte pas la totalité des reproductions pour des raisons de droits »

Figure 4 : Modèle du rôle et de l'expression de *hlyII* lors de l'infection. Lorsque le glucose et le fer deviennent rares, l'expression de HlyII est activée. HlyII est alors libéré dans l'environnement et induit la lyse des macrophages et des érythrocytes. Les cellules mortes libèrent leur contenu intracellulaire, donnant accès à des métabolites qui sont essentiels pour la croissance bactérienne (Ramarao and Sanchis, 2013)

4. Les phospholipases

Les phospholipases C jouent des rôles variés dans la virulence des bactéries pathogènes (Titball, 1998). Les phospholipases induisent une lyse cellulaire par l'intermédiaire d'une activité enzymatique et elles peuvent être associées à la dégradation des tissus et à l'altération de la signalisation cellulaire (Drobniowski, 1993). *B. cereus* produit trois phospholipases C : la phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC), la phosphatidylcholine phospholipase C (PC-PLC) qui confère à *B. cereus* son activité lécithinase observable, entre autre, sur le milieu Mossel, et la sphingomyélinase (SM-PLC). Ces deux dernières sont actives séparément mais peuvent également s'associer, donnant naissance à la céréolysine AB, qui a une activité hémolytique (Gilmore *et al.*, 1989). PC-PLC clive les phosphatidylcholines, les phosphatidylsérines et les phosphatidyléthanolamines (Martin *et al.*, 2000) et pourrait contribuer à la virulence de *B. cereus* dans les endophtalmies puisque des tests *in vivo* ont montré que PC-PLC induit la nécrose de la rétine chez la souris (Beecher and Wong, 2000b). Enfin, PI-PLC pourrait affaiblir la réponse immunitaire de l'hôte en inhibant l'activation des cellules dendritiques médiée par les Toll Like Receptors et ainsi réduire l'induction de la voie des MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) ou de la synthèse de TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha). PI-PLC limiterait également la prolifération des lymphocytes T auxiliaires (Zenewicz *et al.*, 2005).

Les gènes *pi-plc*, *pc-plc* et *sph* codant les 3 phospholipases C sont présents dans la grande majorité des souches du groupe *B. cereus* (Kim and Batt, 2008; Martínez-Blanch *et al.*, 2009).

5. Les protéases

Les protéases sont des agents impliqués de façon importante dans la virulence bactérienne. Ces protéases peuvent jouer des rôles très variés tels que l'activation des toxines, la lyse des protéines de structure, la protection contre le système immunitaire et l'interférence avec la signalisation cellulaire (Miyoshi and Shinoda, 2000). *B. cereus* exprime une cinquantaine de protéases. Les deux protéases majeures produites par *B. cereus* en fin de phase stationnaire de croissance sont NprA et InhA1 (Chitlaru *et al.*, 2006).

InhA1 est une métalloprotéase à zinc, sécrétée, qui interfère avec les défenses immunitaires de l'hôte en hydrolysant des peptides antimicrobiens, tels que les attacines et les cécropines (Dalhammar and Steiner, 1984). Des études montrent que cette protéase neutralise l'activité bactéricide de l'hémolymphe de *Hyalophora cecropia* (Edlund *et al.*, 1976). InhA1 est adsorbée à la surface de l'exosporium, l'enveloppe la plus externe de la spore (Charlton *et al.*, 1999) et permet aux spores de *B. cereus* de s'échapper des macrophages après leur internalisation (Ramarao and Lereclus, 2005). InhA1 possède également des propriétés toxiques puisque la protéase purifiée est toxique pour les drosophiles (Sidén *et al.*, 1979); elle a la capacité de dégrader des protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène, et pourrait favoriser la fibrinolyse c'est-à-dire la dissolution des

caillots sanguins (Chung *et al.*, 2006). Ces propriétés pourraient faciliter la pénétration de *B. cereus* dans l'organisme et son accès aux tissus plus profonds (Miyoshi and Shinoda, 2000).

En plus du gène *inhA1*, le génome de *B. cereus* porte deux gènes paralogues, nommés *inhA2* et *inhA3*. La séquence du gène *InhA2* possède 66% d'homologie avec celle d'*InhA1* et présente également un domaine de fixation au zinc. *InhA2* participe directement à la virulence de *B. cereus* lorsque la bactérie est administrée par voie orale chez *Galleria mellonella*. *InhA2* interviendrait dans le passage de la barrière intestinale et pourrait protéger *B. cereus* des peptides antimicrobiens synthétisés par les cellules épithéliales intestinales ou dégrader le collagène de la membrane basale (Fedhila *et al.*, 2006). *InhA3* partage 73% d'identité avec *InhA1* mais son rôle fonctionnel dans la virulence de *B. cereus* est encore méconnu (Guillemet *et al.*, 2010).

NprA pour « Neutral protease A » est aussi une métalloprotéase jouant un rôle dans la virulence de *B. cereus*. C'est une protéase « thermolysin-like » de la famille des peptidase M4 qui contient par exemple la pseudolysine, un des facteurs de virulence majeurs de *Pseudomonas aeruginosa* (Odunuga *et al.*, 2015). NprA pourrait jouer un rôle dans la virulence en clivant des composants tissulaires telles que l'élastine et la fibronectine et des protéines impliquées dans la coagulation sanguine (plasminogène et fibrinogène) (Chung *et al.*, 2006).

6. Autres propriétés supportant le pouvoir pathogène de *B. cereus*

Certaines propriétés de la bactérie peuvent avoir une implication dans le pouvoir pathogène par une action indirecte non dégradative. Il peut s'agir de la mobilité de la bactérie, de sa capacité d'adaptation à l'environnement, de sa capacité à former des spores résistant à de nombreux stress ou à se défendre dans des situations de compétition microbienne.

Par exemple, des études montrent que les flagelles peuvent être associés à la sécrétion des toxines diarrhéiques pendant la phase de croissance bactérienne (Bouillaut *et al.*, 2005). Chez *B. thuringiensis*, le gène *flhA* est essentiel pour l'export de la flagelline et de l'entérotoxine Hbl, lui conférant des capacités hémolytiques, de motilité, d'adhérence et de virulence (Bouillaut *et al.*, 2005; Ghelardi *et al.*, 2002; Heierson *et al.*, 1986; Ramarao and Lereclus, 2006). Le gène *fliY*, codant une protéine flagellaire impliquée dans le contrôle de la motilité et dans la régulation du phénomène de chimiotaxie, est indispensable pour la sécrétion de la sous unité L2 de Hbl chez *B. cereus* (Bischoff and Ordal, 1992; Celandroni *et al.*, 2000; Senesi *et al.*, 2002). Enfin, les entérotoxines Nhe, Hbl et CytK possèdent un peptide signal Sec-type et sont sécrétées par la voie de translocation Sec. Elles sont liées à l'appareil d'exportation flagellaire par des mécanismes de régulation de sécrétion (Fagerlund *et al.*, 2010). Par l'intermédiaire de plusieurs phénomènes, *B. cereus* possède également une capacité d'adhésion qui joue un rôle important dans sa persistance dans l'environnement. L'hydrophobicité des spores et les

flagelles des bactéries végétatives lui permettent d'adhérer aux surfaces inertes (Faille *et al.*, 2002; Tauveron *et al.*, 2006) et aux cellules épithéliales Caco-2 (Andersson *et al.*, 1998; Ramarao and Lereclus, 2006).

Les bactéries sont soumises à des changements rapides d'environnement. Leur capacité à survivre et à persister dépend donc des moyens qu'elles mettent en œuvre pour s'adapter à de nouvelles conditions. Par exemple, la synthèse de la protéine de surface IIsA permet à *B. cereus* de fixer des protéines de l'hôte porteuses de fer et de se l'approprier (Daou *et al.*, 2009; Fedhila *et al.*, 2006). Aussi, le système de régulation ResDE est un facteur clé dans l'adaptation de la physiologie de *B. cereus* aux conditions anaérobies et réductrices rencontrées dans l'intestin (Duport *et al.*, 2006).

Pour les situations de compétition microbienne, *B. cereus* possède des mécanismes d'attaque et de défense en produisant des bactériocines dirigées contre d'autres bactéries (Bizani and Brandelli, 2002) et des facteurs de résistance à leurs propres bactériocines. *B. cereus* possède également des mécanismes pour se défendre contre les peptides antimicrobiens produits par l'hôte ou les autres bactéries. Des études ont montré que l'opéron *dlt* participe à ces mécanismes en remplissant des fonctions cruciales pour *B. cereus* au cours de l'infection ; ainsi, la virulence du mutant Δdlt est très diminuée après injection intrahémocoelique chez l'insecte (Abi Khattar *et al.*, 2009).

Par sa capacité à former des biofilms, les bactéries du biofilm se trouvent protégées vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte et sont également moins sensibles aux agents antimicrobiens (Pan *et al.*, 2006), ce qui pourrait leur conférer une plus grande virulence en colonisant l'intestin de l'hôte (Costerton *et al.*, 1999; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009; Macfarlane and Dillon, 2007). Les souches diarrhéiques ont une forte capacité à former des biofilms (Auger *et al.*, 2009). À l'intérieur des biofilms, les bactéries sont également protégées de l'environnement et des agents utilisés pour décontaminer les équipements et surfaces des industries alimentaires (Peng *et al.*, 2002).

La capacité de *B. cereus* à sporuler lui permet de survivre à plusieurs stress, notamment thermiques, physiques ou chimiques appliqués aux aliments en ateliers de fabrication, ou enzymatiques lors du passage dans l'estomac. Les traitements des aliments comme la pasteurisation ou l'irradiation aux rayons gamma éliminent les bactéries végétatives mais pas les spores (Brown, 2000; Kamat *et al.*, 1989). Non seulement *B. cereus* n'est pas détruit par ces traitements, mais il peut ensuite se multiplier sans compétition microbienne. Sa capacité à sporuler lui confère donc un avantage sélectif.

7. Régulation de l'expression des facteurs de virulence de *B. cereus*

7.1. Facteurs bactériens

7.1.1. PlcR

L'expression de la plupart des facteurs de virulence décrits précédemment est régulée par un régulateur transcriptionnel PlcR (Phospholipase C Regulator). C'est le cas des toxines diarrhéiques Nhe et Hbl, de CytK, des phospholipases PI-PLC, PC-PLC et SM-PLC, des paralogues de NprA (mais pas NprA elle-même), de la métalloprotéase InhA2 (mais pas InhA1 ni InhA3), et de plusieurs bactériocines (Agaisse *et al.*, 1999; Gohar *et al.*, 2008, 2002). PlcR est ainsi reconnu comme le régulateur majeur de la virulence de *B. cereus*. Son régulon compte au total 45 gènes, dispersés sur le chromosome. Leur expression est activée en début de phase stationnaire par la fixation de PlcR à une séquence dans leur région promotrice. C'est une séquence palindromique spécifique et fortement conservée TATGnAnnnnTnCAT(A) nommée boîte PlcR. PlcR permet l'intégration par la bactérie des données de son état physiologique (phase de croissance) et de la densité cellulaire dans son environnement. PlcR fait partie d'un système de quorum sensing de la famille des RNPP (pour Rap, NprR, PlcR et PrgX) (Rocha-Estrada *et al.*, 2010). L'expression de PlcR s'autorégule par l'intermédiaire du peptide PapR (Peptide Activating PlcR ; Slamti and Lereclus, 2002) (Figure 5). Celui-ci est codé par un gène situé juste en aval de *plcR*. La protéine native PapR compte 48 acides aminés et est dotée d'un peptide signal. PapR est exporté dans le milieu extracellulaire, où il est mûri par protéolyse. La forme active de PapR, vraisemblablement son heptamère C-terminal (Bouillaut *et al.*, 2008), est ensuite réimportée *via* l'oligopeptide perméase Opp (Slamti and Lereclus, 2002), soit par la bactérie qui l'a sécrétée, soit par une bactérie adjacente. La liaison de PapR à PlcR lui permet de se fixer aux boîtes PlcR et d'induire l'expression des gènes de son régulon. PlcR active également sa propre transcription, et celle de PapR. L'état physiologique de la bactérie influence également PlcR. L'initiation de l'expression de PlcR au moment de la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance indique qu'il est contrôlé par des régulateurs d'état de transition (Lereclus *et al.*, 1996). Au moment du passage en phase stationnaire de croissance, les facteurs de virulence régulés directement ou indirectement par PlcR représentent plus de 80% de la quantité de protéines extracellulaires de *B. cereus* (Gohar *et al.*, 2002). Environ 2 heures après l'entrée des bactéries en phase stationnaire, la transcription de *plcR* (et donc de son régulon) est réprimée par Spo0A, un régulateur de la sporulation (Lereclus *et al.*, 2000).

Le rôle joué par PlcR dans la virulence de *B. cereus* a été observé avec plusieurs modèles d'infection : gavage chez des larves d'insectes (Fedhila *et al.*, 2006), instillation nasale chez la souris (Salamitou *et al.*, 2000), injection intraoculaire chez le lapin (Callegan *et al.*, 2003), cytotoxicité du filtrat de culture sur les cellules épithéliales Caco-2 et HeLa (Ramarao and Lereclus, 2006), et sur les cellules phagocytaires de l'insecte (Salamitou *et al.*, 2000). Ces expériences montrent par exemple que la toxicité maximale des surnageants de *B. cereus* coïncide avec l'expression maximale des facteurs de virulence contrôlés par PlcR (Gilois *et al.*, 2007) et la cytotoxicité du mutant $\Delta plcR$ est nettement diminuée par rapport à

celle de la souche sauvage. Néanmoins, ce mutant conserve une toxicité élevée sur la lignée cellulaire Raw (cellules de monocytes-macrophages de souris leucémiques isolées à partir de liquide d'ascite) ce qui indique que d'autres facteurs, dont la régulation est indépendante de PlcR, contribuent à la virulence de *B. cereus*.

«La version de diffusion ne comporte pas la totalité des reproductions pour des raisons de droits »

Figure 5 : Modèle du mécanisme de PlcR et de son peptide apparenté PapR. PapR est synthétisé et exporté. Après protéolyse, le peptide mature est réinternalisé via le système Opp. Lorsque la densité cellulaire est importante, PapR se lie à PlcR. Les polymères se lient à l'ADN via les boîtes PlcR et stimulent la transcription du régulon PlcR (Declerck *et al.*, 2007).

7.1.2. NprR

NprR est un autre régulateur de la famille RNPP important chez *B. cereus*. Comme PlcR, son régulon contient de nombreux gènes codant des enzymes dégradatives : protéases, estérases, lipases, chitinases et une chitosanase. Le gène *nprR* est en opéron avec le gène codant son peptide activateur, *nprX* (Perchat *et al.*, 2011). Le système *nprR-nprX* est impliqué dans un système de communication cellulaire qui contrôle, entre autre, la transcription du gène *nprA*. La transcription de l'opéron *nprR-nprX* est activée par PlcR-PapR en fin de phase exponentielle. Sous forme *apo* (non-liée à NprX), NprR est homodimérique, et la liaison de NprX entraîne sa tétramérisation, forme sous laquelle les motifs HTH seraient correctement orientés pour se lier à l'ADN (Zouhir *et al.*, 2013). Plus précisément, le peptide de signalisation NprX est sécrété, mûri et réimporté dans la cellule bactérienne par deux ABC transporteurs de la famille des oligopeptides perméases. Une fois dans la cellule, la forme mature de NprX se lie à NprR et permet la transcription du gène *nprA*. Sur la base de la similarité entre NprR et les protéines Rap de *Bacillus subtilis*, l'effet de NprR sur la sporulation a également été étudié. Les résultats ont montré que l'expression de *nprR* seul (en absence de *nprX*) réduit de cinq fois l'efficacité de la sporulation. La sporulation est restaurée en ajoutant le peptide NprX en début de phase stationnaire (Perchat *et al.*, 2016). En fait, l'homodimère de NprR a également un rôle de régulateur post-traductionnel en empêchant partiellement la phosphorylation de Spo0A et donc la sporulation (Dubois *et al.*, 2012).

7.1.3. Spo0A et AbrB

Spo0A est un régulateur transcriptionnel pléiotrope présent chez toutes les bactéries sporulantes connues (Galperin *et al.*, 2012). Il y est qualifié de régulateur global (« master regulator ») car les

régulons et les différenciations sous son contrôle sont nombreux. Chez *B. subtilis*, il influence la transcription de plus de 500 gènes, dont 121 contrôlés directement par Spo0A (Fawcett *et al.*, 2000; Molle *et al.*, 2003). Spo0A a été découvert par plusieurs groupes de recherche au début des années 1970 comme étant responsable d'une étape précoce de la sporulation chez *B. subtilis* (Piggot and Coote, 1976). En premier lieu, le gène *spo0A* est transcrit et traduit en Spo0A. Spo0A est inactif sous cette forme. Il possède cependant un domaine N-terminal conservé et un résidu d'acide aspartique qui est la cible de la phosphorylation par des protéines de type histidine kinase (KinA, KinB) (Errington, 1993; Sonenshein, 2000). La phosphorylation contrôle l'activité du domaine C-terminal de la protéine Spo0A dans sa liaison à l'ADN et déclenche l'entrée en sporulation (Errington, 2010). Effectivement, lorsque des signaux (densité cellulaire, carences nutritionnelles, etc) activent les kinases, celles-ci déclenchent une cascade de phosphorylations, impliquant les facteurs Spo0B et Spo0F, qui aboutit à la phosphorylation de Spo0A. L'accumulation de Spo0A~P active la transcription d'au moins sept gènes dont *sigF* et *sigE*, codant les facteurs σF et σE , 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). Spo0A~P active et réprime également la transcription de nombreux gènes possédant une « boîte Spo0A » (site de fixation de Spo0A sur l'ADN). Ces gènes, sous le contrôle de Spo0A, peuvent être impliqués dans de nombreux processus comme la motilité, la formation de biofilm et la sporulation (Fujita *et al.*, 2005; Grau *et al.*, 2015; Piggot and Hilbert, 2004). Spo0A est également connu pour agir comme répresseur de la transcription de *plcR* (Lereclus *et al.*, 2000).

AbrB est un régulateur transcriptionnel présent chez les firmicutes et impliqué dans la répression des gènes de phase stationnaire pendant la phase exponentielle (Phillips and Strauch, 2002). Mais lorsque le milieu s'appauvrit en nutriment, Spo0A cible *abrB* dont il réprime la transcription (Strauch *et al.*, 1990) (Figure 4). La répression opérée par le régulon AbrB est alors levée. Chez *B. cereus*, les expressions du céréulide et de InhA1 sont régulées par Spo0A et AbrB, mais indépendamment de PlcR (Lucking *et al.*, 2009).

7.2. Facteurs environnementaux

De nombreux facteurs environnementaux peuvent influencer l'expression des gènes de virulence de *B. cereus* (Figure 6). Il peut s'agir de la température, des conditions environnementales, du pH ou de la disponibilité en nutriment, en acides aminés et en fer dans le milieu. Effectivement, il a été démontré que la température a une influence sur la synthèse du céréulide qui n'est produit qu'à des températures comprises entre 8 et 40°C (Hägglom *et al.*, 2002), et de façon optimale entre 20 et 30°C (Thorsen *et*

al., 2006). Cette production est inhibée lorsque les conditions environnementales s'appauvrissent en oxygène (Jääskeläinen *et al.*, 2004) et elle est totalement nulle dans des conditions anaérobies avec moins de 1 à 2% d'oxygène (Rajkovic *et al.*, 2006). De faibles valeurs de pH inhibent également la synthèse du céréulide (Agata *et al.*, 2002). Inversement, la production des entérotoxines Nhe et Hbl augmente en conditions d'anaérobie, avec une production maximale pendant la phase exponentielle de croissance (Duport *et al.*, 2004; Zigha *et al.*, 2007). L'expression des gènes *nhe* et *hbl* est réprimée par l'oxygène atmosphérique (Duport *et al.*, 2006).

D'autres paramètres ont un impact sur la régulation des facteurs de virulence de *B. cereus*, comme la disponibilité en glucose et en amidon dans le milieu. Les souches émétiques, bien qu'elles soient généralement incapables d'hydrolyser l'amidon, produisent des quantités élevées de céréulide dans de nombreux aliments amylacés comme la purée de pommes de terre, le riz cuit, les pâtes ou les pâtisseries (Agata *et al.*, 2002; Jääskeläinen *et al.*, 2004; Rajkovic *et al.*, 2006). Par ailleurs, cette toxine peut être produite à de plus faibles quantités dans d'autres aliments comme le lait (Agata *et al.*, 2002). Le glucose, à des concentrations faibles ou modérées, est nécessaire pour la production des entérotoxines (Spira and Silverman, 1979) alors que des concentrations élevées l'inhibent sans pour autant affecter la croissance bactérienne (Sutherland and Limond, 1993). De la même façon, la présence d'acides aminés ou de fer dans l'environnement est importante dans les processus de régulation. Les acides aminés L-leucine, L-valine et L-thréonine sont importants pour la croissance des souches émétiques de *B. cereus* (Agata *et al.*, 1999) et la supplémentation dans le milieu de ces trois acides aminés stimule spécifiquement la synthèse du céréulide (Jääskeläinen *et al.*, 2004). Le fer est une ressource cruciale pour la multiplication des bactéries et dans leur capacité à coloniser l'hôte. L'homéostasie du fer est assurée par une régulation fine des systèmes d'acquisition et de métabolisme du fer (Hantke, 2001). Fur (Ferric Uptake Regulator) est l'un des effecteurs de cette régulation. En présence de fer, il se lie à une séquence spécifique, nommée boîte Fur, au niveau de la région promotrice de certains gènes (ceux impliqués dans l'acquisition du fer par exemple) et bloque ainsi leur transcription. Harvie *et al.* ont identifié un orthologue de Fur chez *B. cereus* et ont montré que son rôle est essentiel au pouvoir pathogène de *B. cereus*. Ainsi dans le modèle d'infection par injection dans l'insecte *Manduca sexta*, la virulence du mutant Δfur est significativement atténuée (Harvie, 2005). De plus, le gène *hlyII* possède une boîte Fur dans sa région promotrice qui réprime l'expression de *hlyII* en présence de fer. En absence de fer, l'effecteur Fur ne se lie plus à la boîte Fur et la répression de l'expression de *hlyII* est levée (Guillemet *et al.*, 2013).

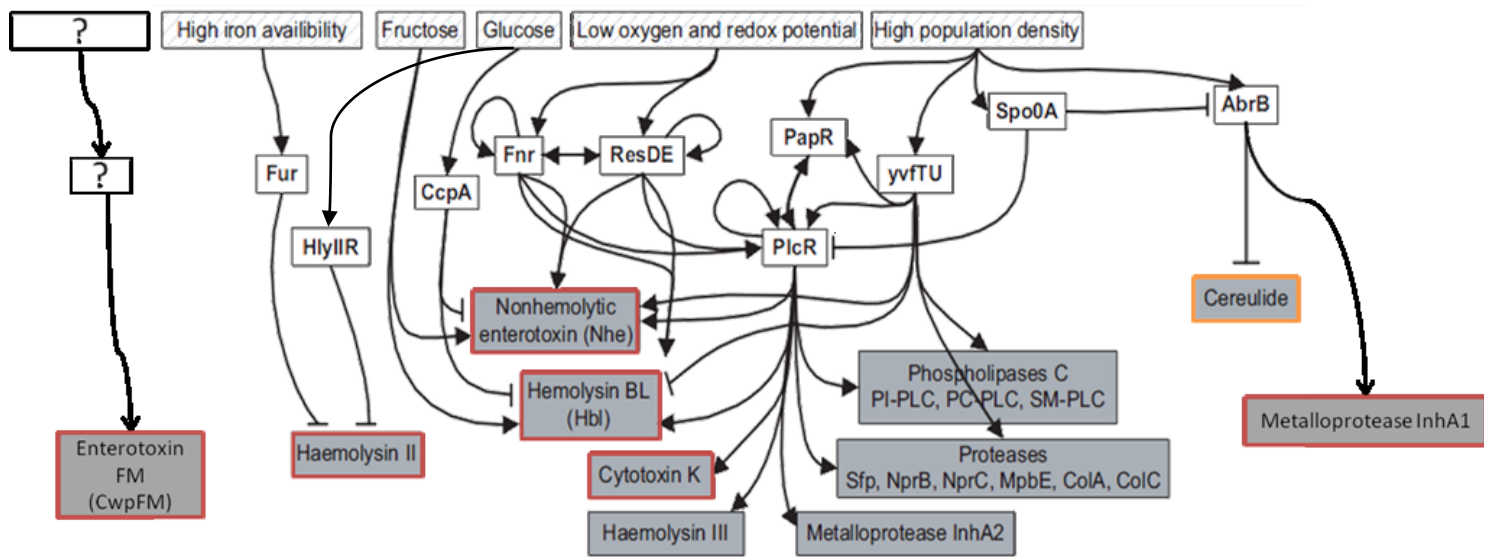


Figure 6 : Régulation des toxines et de la transcription des facteurs de virulence de *B. cereus* (adaptée de Ceuppens *et al.*, 2011)

Enjeux et objectifs

1. Enjeux

B. cereus est une bactérie ubiquitaire, sporulante et capable de former des biofilms. Ces propriétés lui permettent de résister à la plupart des procédés de nettoyage et décontamination. Il est alors possible de retrouver la bactérie à toutes les étapes de fabrication des denrées alimentaires ou dans différents environnements hospitaliers. Pour autant, les souches de *B. cereus* ont des niveaux de pathogénicité très variables. Des souches peuvent être inoffensives pour l'Homme alors que d'autres peuvent engendrer une symptomatologie grave pouvant mener au décès (Lund *et al.*, 2000). En termes de Santé publique, il est nécessaire de connaître le risque que représentent les souches isolées, que ce soit au niveau de l'industrie agroalimentaire ou dans les hôpitaux. Ainsi, il est important de savoir si une souche retrouvée dans leur environnement présente un danger afin de mettre en œuvre les mesures de prévention et de décontamination adaptées. Actuellement, en raison du manque de méthodes analytiques validées et normalisées, seul le dénombrement de *B. cereus* est effectué dans les aliments selon la norme ISO 7932, sans y associer la caractérisation de son potentiel toxigène.

Pourtant, cette connaissance est indispensable pour améliorer la prise de décision. Un médecin pourrait alors prendre en compte la présence de *B. cereus* dans les prélèvements d'un patient pour ajuster ou non la couverture antibiotique et les chances de succès thérapeutique. Un industriel pourrait faire le choix de ne pas jeter un lot contaminé si la souche est inoffensive. Ces décisions ont évidemment un impact sanitaire et économique.

Aux Etats-Unis, le coût annuel des maladies d'origine alimentaire est estimé à 523 millions US\$ et le coût spécifique des TIAC à *B. cereus* est estimé à 166 US\$ par cas (Scharff, 2012). Le coût des maladies non gastro-intestinales à *B. cereus* n'est pas chiffré et l'incidence de ces pathologies est encore mal connue. Cependant, le nombre grandissant de cas répertoriés et l'alerte de la Direction Générale de Santé (DGS) au sujet de deux nouveaux nés prématurés et décédés à la suite d'une infection à *B. cereus* (Le Monde | 03.09.2016) va aider à prendre conscience du danger que représente *B. cereus* en santé publique. À moyen terme, cela pourrait aboutir à la mise en place de protocoles systématiques de détection de *B. cereus* en milieu hospitalier et/ou pour les produits destinés aux nouveaux nés prématurés. Dans cette affaire récente des nouveaux nés décédés à l'AP-HP, le lactarium de Necker a suspendu son approvisionnement de lait maternel, environ 700 litres de lait maternel par mois, avec des conséquences humaines, économiques, médiatiques et de santé publique.

Les professionnels de l'agroalimentaire ont la responsabilité de la sécurité et de la salubrité des produits qu'ils mettent sur le marché. Pour cela, ils doivent contrôler leurs productions en mettant en place des mesures de maîtrise et des méthodes d'analyses pouvant identifier les lots contaminés par des souches dangereuses. La détection de *B. cereus* dans les prélèvements alimentaires ou hospitaliers se limite à la mise en évidence de la bactérie sur milieu spécifique et à son dénombrement.

Cela ne permet pas de déterminer son potentiel pathogène. Deux kits immuno-enzymatiques existent et permettent de mesurer de manière semi-quantitative la présence des deux toxines, Nhe et Hbl dans le surnageant de culture des souches de *B. cereus*. Ces toxines donnent une indication sur le pouvoir toxique des souches à l'origine de TIAC, mais ne sont pas suffisantes pour discriminer les souches à risque des souches inoffensives. En effet, plusieurs études ont montré que la production de Nhe par les souches à risque est variable et que les souches considérées comme non pathogènes peuvent également en produire en grande quantité (Martínez-Blanch *et al.*, 2009; Wehrle *et al.*, 2009). Par ailleurs, ces toxines ne semblent pas être des marqueurs adaptés pour les souches à l'origine d'infections chez les nouveaux nés.

Toutes les études cherchant à identifier des marqueurs communs à l'ensemble des souches pathogènes n'ont pas abouti. Par exemple, certains gènes considérés en tant que facteurs de virulence comme *nhe*, *pi-plc* et *cwpFM* sont présents chez toutes les souches de *B. cereus*, qu'elles soient pathogènes ou non (Guinebretiere *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2011; Martínez-Blanch *et al.*, 2009; Wehrle *et al.*, 2009). Alors qu'à l'inverse, des facteurs de virulence évidents comme *hlyII*, *ces*, *cytk-1* et *hbl* ne sont pas caractéristiques de toutes les souches pathogènes. Il apparaît même que de nombreuses souches à l'origine d'infections n'en possèdent aucun (Cadel Six *et al.*, 2012; Cadot *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). Il n'existe donc pas à l'heure actuelle de biomarqueurs connus, seuls ou en combinaison, permettant de différencier les souches de *B. cereus* pathogènes de celles considérées comme non pathogènes. Il semble indispensable d'en identifier de nouveaux.

2. Objectifs des travaux

L'objectif des travaux de ma thèse a été d'étudier les différences qui caractérisent les souches pathogènes de souches environnementales, considérées comme non pathogènes, afin de les discriminer. Pour cela, je me suis basé sur des souches de *B. cereus* d'origines diverses dans le but de définir et de caractériser trois collections bien distinctes. Ces collections rassemblent des souches à l'origine d'infections gastro-intestinales et isolées lors de TIAC, des souches à l'origine d'infections non gastro-intestinales et isolées chez des patients, et des souches environnementales, isolées d'aliments pour lesquels il n'a pas été rapporté d'infection chez l'Homme ni dans un modèle animal. Ces dernières sont considérées comme des souches non pathogènes. Les collections de souches ont été comparées sous différents aspects. Ce travail a été divisé en cinq étapes qui étaient i) de collecter les souches de *B. cereus* et toutes les données correspondantes (origine, symptomatologie, aliment, ...), ii) d'analyser les données, iii) de caractériser les souches (phénotype et génotype), iv) d'identifier des souches représentatives au sein des trois populations étudiées et v) de les comparer sous des aspects épidémiologiques, phénotypiques, génétiques et transcriptomiques. Cette dernière étape avait pour

objectif de déterminer des marqueurs biologiques de *B. cereus* surexprimés dans les collections de souches à l'origine d'infections par rapport aux souches environnementales. À la suite d'un transfert de connaissance et de méthode, ces marqueurs pourront être utilisés par les laboratoires de terrain en agroalimentaire et les laboratoires d'analyse médicale pour aider à la prise de décision en cas de contamination à *B. cereus*.

Les souches de *B. cereus* ont été isolées dans trois cadres différents (Annexes 1-4) :

- des souches isolées d'aliments et à l'origine de TIAC collectées par l'Anses entre 2007 et 2014, soit au total 564 souches.
- des souches isolées chez des patients présentant des pathologies non gastro-intestinales collectées par l'Inra au sein de plusieurs hôpitaux français : 56 souches de *B. cereus* isolées à partir d'hémocultures ou d'un environnement hospitalier proche du patient entre 2008 et 2014.
- des souches de *B. cereus* isolées de l'environnement (n=3) ou d'aliments n'ayant pas engendré de pathologies après consommation (n=18). Ces 21 souches considérées comme non pathogènes ont fait l'objet de plusieurs publications (Cadot *et al.*, 2010; Guinebretiere *et al.*, 2002; Guinebretière *et al.*, 2008; Kamar *et al.*, 2013).

Etudes expérimentales

1. Etude à grande échelle des toxi-infections alimentaires collectives à *B. cereus* survenues en France entre 2007 et 2014 : Données épidémiologiques et diversité génétique

L'objectif de cette étude était d'analyser les données de toutes les souches de *B. cereus* collectées à l'Anses dans le cadre de TIAC survenues en France entre 2007 et 2014. J'ai répertorié 564 souches isolées de 140 TIAC. C'est la première fois qu'une collection de cette ampleur portant sur des souches à l'origine de TIAC fait l'objet d'une étude épidémiologique, phénotypique et génétique aussi approfondie.

L'étude épidémiologique et les données collectées ont d'abord permis de confirmer de façon certaine que parmi les 140 TIAC, 74 d'entre elles ont été causées par une intoxication à *B. cereus*. Aucun autre pathogène n'a été retrouvé dans les matrices alimentaires incriminées ou dans les plats servis le même jour. J'ai adapté la méthode de typage moléculaire M13-PCR afin d'observer la diversité des différentes souches isolées dans chaque TIAC individuellement. Cette analyse a montré que plusieurs souches avec différents profils M13-PCR peuvent être isolées lors de la même TIAC. Face à cette situation et avec les connaissances actuelles, il était impossible d'identifier la souche parmi celles isolées qui a été réellement à l'origine de l'infection. Un effet synergique entre les souches n'est pas non plus à exclure. Ce cas de figure s'est présenté dans 43% des TIAC confirmées à *B. cereus* et toutes les souches présentant des profils M13-PCR différents ont été inclus dans l'étude, soit 117 souches. En outre, cette analyse a aussi permis de mettre en évidence que 57% des TIAC ont été causées par une souche unique de *B. cereus*, soit 42 souches. La population finale de souches retenues pour l'étude comprend celles identifiées dans les deux cas de figure, soit une collection totale de 159 souches. J'ai caractérisé ces souches en recherchant dix marqueurs présumés comme étant impliqués dans la virulence (*cytK-1*, *cytK-2*, *hlyII*, *ces*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblC*, *hblD*, *hblA*). Par la combinaison des gènes présents ou absents chez les souches, 12 signatures génétiques ont été définies (GS). La signature majoritaire (GS1) est caractérisée par la seule présence des gènes de l'opéron *nhe*. Cependant, la production *in vitro* de l'entérotoxine Nhe peut être très variable d'une souche à l'autre et 11% des souches de la signature GS1 sont non productrices malgré la présence des gènes. La signature génétique GS2 est caractéristique de 17% des souches et a été impliquée dans 1/3 des TIAC confirmées de l'étude. Ces souches sont caractérisées par des niveaux élevés de production de Nhe et Hbl, confirmant les données de la littérature (Yang *et al.*, 2005). La signature GS3 a été associée aux souches possédant le gène *ces* qui est le marqueur des *B. cereus* ayant la capacité de produire le céréulide. Dans les TIAC associées aux souches émétiques GS3, 59% des intoxications ont induit les symptômes émétiques et diarrhéiques simultanément. Ces souches possèdent aussi les gènes de l'opéron *nhe* et il a été montré *in vitro* qu'elles sont fortement productrices de Nhe. La signature GS8 (5% des souches) a été

caractéristique des souches appartenant au groupe phylogénétique VI. Les souches du groupe VI sont décrites comme présentant de faibles risques d'infections gastro-intestinales (Guinebretiere *et al.*, 2010). Certains auteurs les considèrent comme des souches non pathogènes. Pourtant, nous montrons ici que des souches du groupe VI peuvent être à l'origine d'intoxications alimentaires (TIAC n°40 de l'article et associée à deux souches différentes du groupe VI).

Cette étude montre qu'il n'existe pas de corrélation entre les syndromes et les souches dites entérotoxiques ou émétiques. Il est arrivé que des souches porteuses du gène *ces* aient engendré des syndromes diarrhéiques sans engendrer de syndrome émétique. Inversement, des souches entérotoxiques ont engendré des syndromes émétiques sans engendrer de syndrome diarrhéique. Cependant, il existe une différence significative entre le temps d'incubation avant apparition des symptômes induits par les souches porteuses du gène *ces* par rapport aux souches entérotoxiques. Les souches porteuses du gène *ces* ont un temps d'incubation de deux heures en moyenne avant apparition des symptômes contre cinq heures pour les souches entérotoxiques. Les plats incriminés étaient majoritairement à base de végétaux ou de produits amylacés et les intoxications ont essentiellement été déclarées en restauration collective (60 %). Il n'a pas été observé d'effet de saisonnalité. Pour conclure, des profils majoritaires caractérisant les *B. cereus* à l'origine d'intoxications alimentaires ont pu être identifiés. Les souches caractérisées par les GS1 à GS6 représentent 84% de la collection. Sur la base de la caractérisation actuelle et avec ce choix de marqueurs, il a été mis en évidence une diversité importante des souches pouvant être impliquées dans les TIAC avec 12 signatures possibles. Enfin, l'étude a permis de créer un panel de 42 souches pathogènes clairement identifiées et représentatives de la population de souches à l'origine d'infections gastro-intestinales chez l'Homme. Ces souches ont ensuite été comparées à des souches ayant engendré des pathologies différentes et à des souches environnementales n'ayant pas engendré d'infection, considérées comme non pathogènes.

Ce travail a fait l'objet d'un article accepté dans le Journal Eurosurveillance : *Bacillus cereus*-induced foodborne outbreaks, France 2007-2014, epidemiology and genetic characterization (Glasset *et al.*, 2016).

1.1. Article 1: *Bacillus cereus*-induced foodborne outbreaks, France 2007-2014, epidemiology and genetic characterization. Article sous presse dans Eurosurveillance, accepté le 16/07/2016

B Glasset^{1,2}, S Herbin^{1,4}, L Guillier¹, S Cadel-Six¹, M Vignaud¹, J Grout¹, S Pairaud¹, V Michel³, J Hennekinne¹, N Ramarao^{2,4}, A Brisabois^{1,4}

1. Université Paris-Est, ANSES, Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort Cedex, France
2. Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France
3. ACTALIA, La Roche sur Foron, France
4. These authors contributed equally to this work

Correspondence: Anne Brisabois (anne.brisabois@anses.fr)

Citation style for this article:

Glasset B, Herbin S, Guillier L, Cadel-Six S, Vignaud M, Grout J, Pairaud S, Michel V, Hennekinne J, Ramarao N, Brisabois A. *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation. *Euro Surveill*. 2016;21(48):pii=30413. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.48.30413>

Article submitted on 22 December 2015 / accepted on 16 July 2016 / published on 01 December 2016

The aim of this study was to identify and characterise *Bacillus cereus* from a unique national collection of 564 strains associated with 140 strong-evidence food-borne outbreaks (FBOs) occurring in France during 2007 to 2014. Starchy food and vegetables were the most frequent food vehicles identified; 747 of 911 human cases occurred in institutional catering contexts. Incubation period was significantly shorter for emetic strains compared with diarrhoeal strains. A sub-panel of 149 strains strictly associated to 74 FBOs and selected on Coliphage M13-PCR pattern, was studied for detection of the genes encoding cereulide, diarrhoeic toxins (Nhe, Hbl, CytK1 and CytK2) and haemolysin (HlyII), as well as *panC* phylogenetic classification. This clustered the strains into 12 genetic signatures (GSs) highlighting the virulence potential of each strain. GS1 (*nhe* genes only) and GS2 (*nhe*, *hbl* and *cytK2*), were the most prevalent GS and may have a large impact on human health as they were present in 28% and 31% of FBOs, respectively. Our study provides a convenient molecular scheme for characterisation of *B. cereus* strains responsible for FBOs in order to improve the monitoring and investigation of *B. cereus*-induced FBOs, assess emerging clusters and diversity of strains.

Introduction

The *Bacillus cereus* sensu lato group includes the following closely related spore-forming species: *B. cereus* sensu stricto, *B. thuringiensis*, *B. cytotoxicus*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* and *B. anthracis* [1]. The first four species are known to be involved in food poisoning [1]. *B. thuringiensis* is also mainly known as a biopesticide due to production of insecticidal toxins [2]. *B. anthracis* is highly virulent in mammals and is the causative agent of anthrax [3]. *B. cytotoxicus* is a newly identified group of strains that induce severe food poisoning. They are characterised

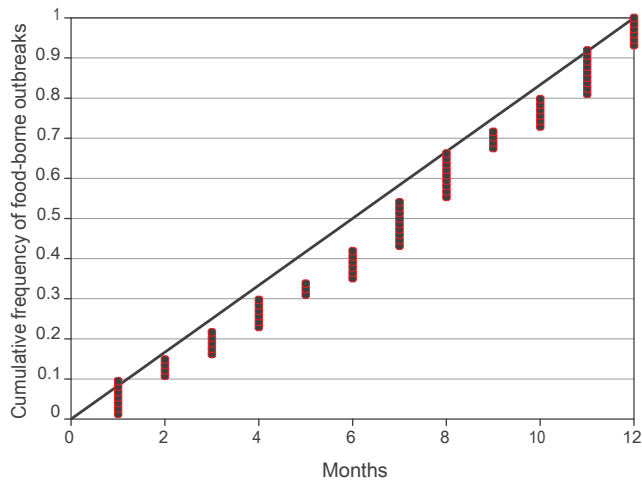
by the production of cytotoxin K-1 (CytK-1) and a relatively high genomic diversity compared with other *B. cereus* strains [1].

B. cereus is currently the second most frequently found causative agent of confirmed and suspected food-borne outbreaks (FBOs) in France after *Staphylococcus aureus* [4]. Depending on the evidence implicating a food vehicle source during epidemiological and microbiological FBO investigations, the outbreaks are referred as a strong-evidence or weak-evidence FBO. Briefly, an FBO is defined as 'strong-evidence' when the following information is known and reported: food vehicle, food source, the link between outbreak cases and the food vehicle, place of exposure, and contributory factors. When several parts of the information are missing, the FBO is considered as 'weak-evidence' FBO [5].

Between 2006 and 2014 in France, *B. cereus* was recorded as the second or third major cause in weak-evidence FBOs. In 2014, *B. cereus* represented the second cause in weak-evidence FBOs, with 1,902 human cases for 224 FBOs, and the second cause of strong-evidence FBOs, with 23 FBOs accounting for 447 human cases and 18 hospitalisations [4]. The increase in *B. cereus*-induced FBOs is partly due to the input of national health and food safety authorities in the epidemiological and microbiological investigations of suspected FBOs. Indeed, *B. cereus* strains isolated from foodstuff suspected of being involved in an FBO are now usually collected by the laboratory for food safety in ANSES. To illustrate this, during 1996 to 2005, only 94 strong-evidence and 196 weak-evidence FBOs were reported, whereas for 2014 alone, 23 and 241 strong- and weak-evidence FBOs were notified, respectively showing the high input of the authorities. Nevertheless, the number of total human *B. cereus* cases is likely to

Figure 1

Distribution of food-borne outbreaks associated to *Bacillus cereus* by month of outbreak compared to a theoretical uniform distribution, France, 2007–2014



For the theoretical uniform distribution, each dot represents a food-borne outbreak.

be underestimated because individuals with gastrointestinal infections rarely seek medical advice and if they do, stools sample are not always asked for by physicians.

B. cereus can induce two types of gastrointestinal disease, leading to emetic or diarrhoeal syndromes. The symptoms associated with *B. cereus* infection are generally mild and self-limiting, but more serious and even fatal cases have been described in France and around the world [6]. The emetic syndrome is characterised by vomiting and nausea, usually 30 minutes to 6 hours after ingestion, and can be confused with FBOs caused by *Staphylococcus aureus*. This syndrome is due to the ingestion of a thermostable toxin known as cereulide, pre-formed in food before ingestion of contaminated foods. The emetic *B. cereus* strains represent a cluster of strains characterised by the presence of the plasmid-located *ces* gene encoding an enzyme involved in cereulide synthesis [7].

Diarrhoeic symptoms are characterised by abdominal cramps and watery diarrhoea within 8 to 16 hours after ingestion of contaminated foods. These diarrhoeal symptoms and incubation periods can be easily confused with those caused by *Clostridium perfringens* food poisoning. More precise information about diarrhoeic strains is thus necessary to discriminate between possible causative agents and allow better diagnosis during FBOs. The diarrhoeal syndrome occurs after ingestion of vegetative cells or spores of diarrhoeic strains. This syndrome is generally attributed to at least three enterotoxins: haemolysin BL (Hbl), which

has three components B, L1 and L2; non-haemolytic enterotoxin (Nhe) with its three components Nhe-A, Nhe-B and Nhe-C, and cytotoxin K (CytK). Two forms of cytotoxin K have been described, CytK-1 and CytK-2, the former being more cytotoxic than the latter [8]. In addition, *B. cereus* produces other toxins such as haemolysin II (HlyII), metalloproteases such as InhA1 and InhA2, and the cell wall peptidase FM (CwpFM), which may also be involved in pathogenicity [9-11]. The pathogenic spectrum of *B. cereus* ranges from strains used as probiotics to strains that are lethal to humans and it remains difficult to predict the pathogenic potential of a strain. Apart from strains encoding *ces* or *cytK-1* genes, which are virulent and well described in the literature [8,12], the pathogenicity of *B. cereus* diarrhoeal strains is not fully understood and there are currently no specific markers to unambiguously differentiate between pathogenic and harmless strains. Indeed, the genetic studies carried out to date have been inconclusive and, regardless of the diseases they cause, all strains seem to carry genes encoding at least one of the known diarrhoeal toxins [13]. However, highly toxic strains do not necessarily overproduce these toxins [14]. The aim of this study was therefore to identify and characterise *B. cereus* strains from a unique national collection of 564 strains strongly related to 140 FBOs that occurred in France during 2007 to 2014 in order to improve the monitoring and investigation of *B. cereus*-induced FBOs, assess the risk of emerging clusters of strains and identify strain variability.

Methods

Epidemiological data

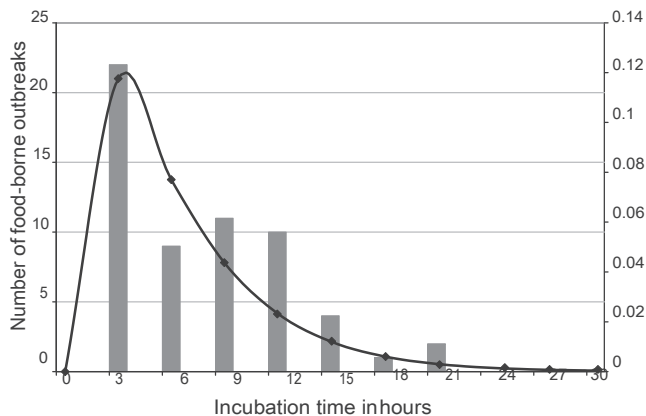
The epidemiological data related to each FBO were mainly collected through interviews or questionnaires by local health authorities. The suspected food in each FBO was traced by the local services of the French Ministry of Agriculture and Food (DDPP, Department for protection of populations). Collected data included a record of the type of suspected food, preparation location and date, type of packaging, number of human cases, symptoms and incubation periods. Then, a database of ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety) was built, gathering epidemiological data as well as analytical results of *B. cereus* enumeration in food, strain characterisation and toxin production.

Strain collection

For each FBO, all bacterial strains from suspected food were isolated by plating leftovers on selective media plates allowing the discrimination of *B. cereus* from other bacterial pathogens (*S. aureus*, *C. perfringens*, etc). Identification and numeration of one to five *B. cereus* strains per FBO were conducted by plating the strains on selective *B. cereus* agar media (MYP agar media: mannitol-phenol red-egg yolk medium (Biokar) according to the International Organization for Standardization (ISO) 7932 standard method or BACARA (BioMérieux), previously certified commercial

Figure 2

Distribution of food-borne outbreaks by incubation periods for the entire *Bacillus cereus* collection, France, 2007–2014



Bars represent the number of food-borne outbreaks for each incubation time.

alternative method (AES 10/10–07/10). All isolates were tested for haemolytic activity on sheep blood agar [15], lecithinase production on MYP agar media and starch hydrolysis on plate count agar (BioMérieux).

DNA extraction

DNA was extracted after overnight incubation of the strains at 30 °C on trypticase soy agar with 0.6% yeast extract (Sigma-Aldrich) using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). DNA was quantified by absorbance at 260 nm on a Nanodrop1000 spectrophotometer (Thermo scientific).

Coliphage M13 sequence-based PCR typing

To study strain diversity and discriminate between strains isolated in samples within the same FBO, *B. cereus* strains were typed using coliphage M13 sequence-based PCR (M13-PCR) derived from an RAPD technique and adapted from [16]. The PCR mix contained 40 ng of DNA template, 0.9 mM dNTP mix (Roche Diagnostics), 4 mM MgCl₂, 2 μM primer (GAGGGTGGCGGCTCT), 2.5 U Goldstar DNA polymerase, and Goldstar buffer (Eurogentec). Thermal cycling using the Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) included a denaturation step at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 40 °C, 8 min at 68 °C and an elongation step at 68 °C for 8 min. The amplified DNA was analysed by SDS-PAGE electrophoresis. The M13-PCR patterns were visualised using ChemiDoc XRS imaging system. Then, DNA profiles were analysed with BioNumerics 7.1 software (Applied Maths).

panC gene sequencing

B. cereus strains were assigned to the seven known phylogenetic groups according to partial sequencing of the *panC* gene [17]. The sequencing was carried out by

a commercial facility (Eurofins MWG Operon). The classification into the phylogenetic groups was performed using the algorithm described in [17]. The two typing methods *panC* gene sequencing and M13-PCR typing were used for separate objectives. This study did not explore the correlation between the two methods.

Virulence gene detection

The presence of potential virulence genes *cytK-1*, *cytK-2*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hlyII* and *ces* [10,13] was evaluated by PCR. As the genetic diversity of *B. cytotoxicus* strains possessing *cytK-1* is substantial, the primers used to detect the other virulence genes were not suitable for those particular strains. The PCR was performed with the Veriti Thermal Cycler. The final reaction mixture (25 μL) contained 200 μM dNTPs, 1X PCR buffer, 1 U FastStart TaqDNA Polymerase (Roche), 200–1,000 nM primers, and 2 μL (ca 10 ng) template DNA. The amplification protocol comprised initial denaturation at 94 °C for 5 min followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 60 s, and 72 °C for 90 s and final extension at 72 °C for 7 min. PCR products were analysed by SDS-PAGE electrophoresis.

Enterotoxin quantification

The production of the enterotoxins Nhe and Hbl was tested using two immunological tests, the BCET-RPLA Toxin detection kit (Oxoid) and Tecra kit (BDE VIA, 3M-Tecra), respectively, after culture in brain heart infusion broth (Biomérieux) for 6 hours at 30 °C with stirring [18].

Database and statistical analysis

Strain characterisation results and epidemiological data were entered into a central database using BioNumerics software. The distribution of mean incubation periods, i.e. the time between ingesting contaminated food and symptom onset, was characterised using R 3.1 software and the ‘fitdistrplus’ package [19]. The log-normal was fitted to data according to maximum-likelihood estimation. To study seasonal variation in the occurrence of FBOs, the distribution of FBO dates was analysed throughout the year according to a previously described method [20].

Results

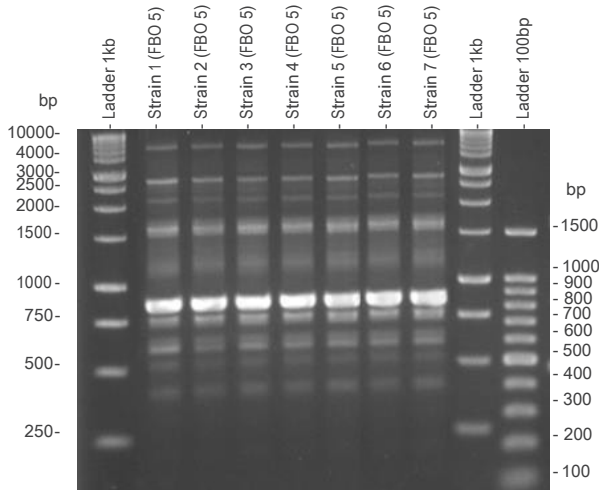
Epidemiological and clinical data

We studied a collection of 564 *B. cereus* strains associated with 140 FBO that occurred in France during 2007 to 2014. In 66 of the FBOs, *B. cereus* was isolated concomitantly with other bacterial species (including *S. aureus* and *C. perfringens*) during microbiological investigations, making it impossible to affirm that *B. cereus* was the cause of these FBOs. Our study therefore focused on 339 *B. cereus* strains isolated from food samples analysed during 74 FBOs where no other pathogenic bacteria were detected in the food during microbiological investigations (Table 1). These 74 FBOs resulted in 911 human cases. Data on sex and age of

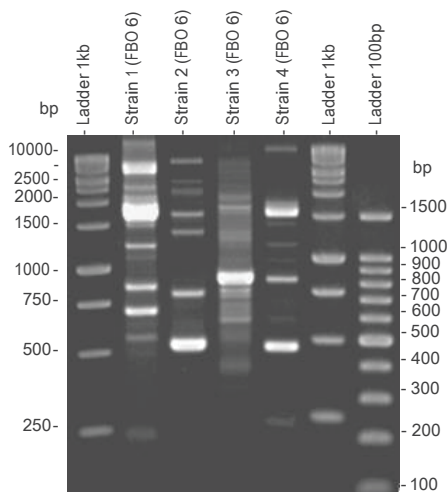
Figure 3

Coliphage M13 sequence-based PCR typing of selected *Bacillus cereus* strains isolated from various samples in two food-borne outbreaks, France, 2007–2014 (n = 11)

A. M13-PCR patterns of *Bacillus cereus* strains isolated from FBO 5



B. M13-PCR patterns of *Bacillus cereus* strains isolated from FBO 6



B: *Bacillus*; FBO: food-borne outbreak.

the cases were not always available and could therefore not be included in the study.

Over the eight years of the survey, the occurrence of FBOs was not subject to any seasonal effect (Figure 1). Emetic and diarrhoeal symptoms of human cases were often present at the same time and were reported for 57% of FBOs (42/74), whereas abdominal pains, diarrhoeic or emetic syndromes alone occurred in 4% (36/911), 12% (109/911) and 13% (118/911) total human cases, respectively.

Between 400 and $10^8 B. cereus$ CFU/g were found in the incriminated foods. Levels lower than 10^5 CFU/g were observed in 48/57 FBOs due to diarrhoeal strains and in 11/17 FBOs due to emetic strains (Table 1). The incubation period (time between ingestion of contaminated food and symptom onset) varied from less than 3 hours to 21 hours (Figure 2). The mean incubation period was 5.7 hours (standard deviation (SD) 1.3) and could vary within the same FBO (Table 1). However, the incubation period was significantly shorter for emetic strains (carrying the *ces* gene) – mean: 2.6 hours (SD: 2.1) – compared with diarrhoeal strains (mean: 6.6 hours (SD: 1.4).

A single food source was incriminated for 57% of FBOs (42/74), of which 14/42 were associated with starchy food, 8/42 and 7/42 FBOs with vegetables and with mixed dishes composed of starchy food or vegetables, respectively (Table 1). Only 14% (10/74) of FBOs were associated with foodstuffs of animal origin.

Furthermore, 60% of FBOs (44/74) occurred in institutional catering, involving 82% (747/911) of the human cases. FBOs were poorly reported in a family context, which represented 13% of the FBOs (10/74) and 7% (64/911) of the human cases (Table 1). The remaining 27% (20/74) of FBOs occurred in a commercial catering context, involving 11% (100/911) of cases.

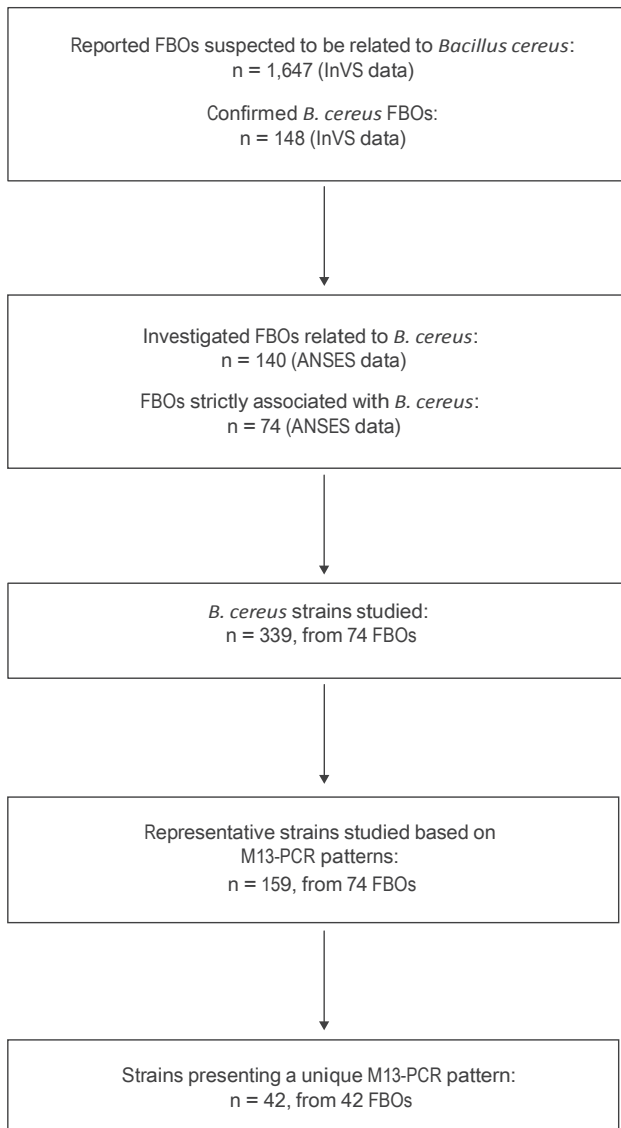
Strain characterisation

Phenotypic analysis of the strains showed that 92% (312/339) of the strains produced lecithinase. Haemolytic activity on sheep blood agar was detected for 87% (295/339). Some 48% (163/339) of strains were able to hydrolyse starch (data not shown). The *panC* gene sequences were used to assign *B. cereus* strains to one of the seven previously described phylogenetic groups I to VII (Table 2). Group I was not represented in the strains analysed. Group III was the most represented (46%; 156/339). Groups IV and II represented 24% (81/339) and 19% (64/339), respectively. The distribution of strains in groups VII, VI and V were 5% (17/339), 4% (14/339) and 2% (7/339), respectively.

M13-PCR typing and genetic characterisation were conducted on all 339 *B. cereus* isolates from the 74 FBOs in order to discriminate different patterns and genetic profiles. Up to five isolates from each FBO were subjected to M13-PCR typing. For 42 FBOs, a unique M13 pattern was identified among all isolates recovered from samples within the same FBO (such as FBO number 5, Figure 3A). In the remaining 32 FBOs, several M13 patterns were observed in samples within the same FBO (such as FBO number 6 with four different M13 patterns, Figure 3B). Thus, a total of 159 representative strains gathering 42 strains from the 42 FBOs of unique M13 pattern and 117 strains representative of the M13 pattern diversity from the remaining 32 FBOs, were selected for further characterisation (Figure 4).

Figure 4

Selection of food-borne outbreaks and panel of *Bacillus cereus* strains studied, France, 2007–2014 (n = 159)



ANSES: French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety; FBO: food-borne outbreak; InVS: French Institute for Public Health surveillance, Santé publique France

The presence of major virulence genes was investigated (Table 2). The *ces* gene was detected in 16% (25/159) of the *B. cereus* strains, meaning they were emetic strains. All the emetic strains belonged to phylogenetic group III. The *cytK-1* gene was detected in 5% (8/159) of strains, strictly associated with group VII and classified as *B. cytotoxicus* strains.

The most frequently distributed genes were those encoding enterotoxin Nhe, namely *nheC*, *nheB* and *nheA* genes detected in respectively 100% (159/159), 99% (157/159) and 96% (153/159) of the tested strains.

The *hblA*, *hblD* and *hblC* genes encoding enterotoxin Hbl were detected in 44% (70/159), 44% (70/159) and 40% (64/159) of the strains, respectively. The *cytK-2* gene was detected in 42% (67/159) of strains and 23% (37/159) of strains carried *hlyII*.

These genetic features allowed to cluster the strains into 12 pathogenicity or ‘genetic signatures’ (GSs), GS1 to GS12 (Table 2). Some 84% (133/159) of the strains belonged to GS1 to GS6. The most frequent GS encountered in the collection was GS1, which accounted for 21% (34/159) of strains. In GS1, only Nhe-encoding genes were detected. The *ces*-positive strains were all placed in GS3 (except a single one in GS11) and possessed *nhe* genes in addition to the *ces* gene. GS11 also displayed the *cytK-2* gene. GS7 contained all the *B. cytotoxicus* strains carrying the *cytK-1* gene. GS8 was characterised by strains carrying *nheB* and *nheC* genes, and *hblA* and *hblD* genes. All the strains in this group belonged to phylogenetic group VI (Table 2). Several GSs defined in this study were associated with a single *panC* phylogenetic group, i.e. GS2 (IV), GS203 (III) GS7 (VII), GS8 (VI), GS11 (III) and GS12 (II).

Discussion

Food-borne infections are a common yet distressing and sometimes life-threatening problem for millions of people throughout the world [21]. *B. cereus* is reported to be the fourth major cause of notified FBOs in the European Union and the second in France [4,5]. However, *B. cereus*-associated outbreaks are likely to be underestimated, as they usually remain undiagnosed and therefore under-reported. If *B. cereus* is suspected, several identification tests can be performed: morphology tests on selective media, resistance to polymyxin B, lecithinase synthesis, haemolytic capacity, mannitol fermentation and starch hydrolysis [22]. These tests do not, however, reveal whether the isolated strains are pathogenic nor their genetic features.

The main strengths of our study are the unique national *B. cereus* strain collection linked to strong-evidence FBOs, the long period covered and an accurate epidemiological and strain characterisation. The study of symptoms does not readily allow the identification of the pathogen causing the FBO because gastroenteritis symptoms are also characteristic of other food-borne pathogens, especially *S. aureus* or *C. perfringens* [22]. However, phenotypic analysis and species discrimination allowed us to collect isolates and epidemiological data from 140 FBOs, of which 74 were strictly associated with *B. cereus* and affected 911 human cases. Considering food safety issues, this provides confirmation that *B. cereus* must be considered an important food-borne pathogen, and underlines the need to improve monitoring.

For 32 of these 74 FBOs, several strain patterns were distinguished from samples of a single FBO and it was not possible to discriminate which strain or which combination of strains was responsible for the outbreak,

Table 1a

Epidemiological and microbiological data of food-borne outbreaks associated solely with *Bacillus cereus*, France, 2007–2014 (74 outbreaks, 339 strains)

FBO	Year	Incriminated food	Human cases n	Incubation period in hours	Symptoms	Strain patterns identified n	Outbreak setting ^a	CFU/g	Genetic signature
1	2007	Semolina	5	0–3	Vomiting	1	Commercial catering	1.20E+07	GS3
2	2007	Shrimp	12	21–24	Vomiting, diarrhoea	1	Commercial catering	6.80E+04	GS1
3	2007	Tomatoes	4	0–3	Vomiting, diarrhoea	1	Commercial catering	7.00E+02	GS4
4	2008	Semolina	40	12–15	Diarrhoea	1	Staff canteen	1.20E+03	GS1
5	2008	Tabbouleh and minced beef	NK	NK	NK	1	Commercial catering	5.00E+03	GS2
6	2008	Mixed salad, goulash mixed beef and mashed potatoes	19	NK	Vomiting, diarrhoea	4	Medico-social institute	6.00E+02	GS1; GS2; GS7; GS12
7	2008	Mashed potatoes and boiled potatoes	28	NK	Vomiting, diarrhoea	2	Medico-social institute	9.20E+05	GS7; GS8
8	2008	Mixed salad (rice and corn)	2	NK	Abdominal pains, vomiting	1	Staff canteen	1.90E+03	GS2
9	2008	Rice salad	13	12–15	Abdominal pains, vomiting, other	1	Medico-social institute	2.00E+03	GS2
10	2008	Semolina	61	3–6	Abdominal pains, vomiting	1	School canteen	1.00E+04	GS7
11	2008	Semolina and lamb	4	0–3	Vomiting	1	Commercial catering	5.50E+04	GS3
12	2008	Mashed potatoes, mashed celery, roast pork, sauce and pasta	5	6–9	Diarrhoea	2	Medico-social institute	1.50E+05	GS4; GS7
13	2008	Cream caramel and smoked salmon	11	9–12	Diarrhoea, other	3	Commercial catering	3.00E+03	GS2; GS8
14	2008	Fruit salad	70	NK	NK	1	Staff canteen	6.30E+03	GS3
15	2008	Tandoori chicken	10	6–9	Vomiting, diarrhoea	2	Commercial catering	4.60E+03	GS6
16	2008	Wheat	3	9–12	Diarrhoea	3	Commercial catering	1.60E+06	GS1; GS4
17	2009	Tiramisu	15	0–3	Vomiting, diarrhoea	1	Company canteen	8.00E+02	GS9
18	2009	Fish in coconut milk	2	0–3	Nausea, other	1	Commercial catering	1.10E+04	GS1
19	2009	Mashed potatoes	24	NK	Vomiting, diarrhoea	1	School canteen	4.00E+02	GS7
20	2009	Cantonese rice	2	0–3	Vomiting, other	1	Family	1.60E+05	GS3
21	2009	Mashed potatoes, roast beef and French beans	7	6–9	Vomiting, diarrhoea	3	Medico-social institute	1.90E+03	GS3; GS5
22	2009	Quenelle of pike	15	0–3	Vomiting, diarrhoea, other	1	Staff canteen	1.20E+03	GS6
23	2009	Sandwich (tomato, carrots, chicken)	7	0–3	Abdominal pains, nausea	4	Commercial catering	5.00E+03	GS1; GS2; GS6; GS10
24	2009	Chicken sauce	15	NK	Vomiting, -	1	Commercial catering	5.00E+02	GS3
25	2009	Squid sauce	3	9–12	Diarrhoea	1	Staff canteen	2.10E+05	GS12
26	2009	Sauteed shrimp	4	0–3	Vomiting, diarrhoea	7	Commercial catering	1.90E+04	GS1; GS4; GS6
27	2009	Semolina and peas	7	3–6	Nausea, diarrhoea, other	5	Staff canteen	2.00E+07	GS2; GS5
28	2010	Salad	44	NK	Vomiting, diarrhoea, other	3	School canteen	1.00E+03	GS2

FBO: food-borne outbreak; NK: not known.

^a Medico-social institutes included centres for disabled people, leisure centres, retirement homes and other community facilities.

Table 1b

Epidemiological and microbiological data of food-borne outbreaks associated solely with *Bacillus cereus*, France, 2007–2014 (74 outbreaks, 339 strains)

FBO	Year	Incriminated food	Human cases n	Incubation period in hours	Symptoms	Strain patterns identified n	Outbreak setting ^a	CFU/g	Genetic signature
29	2010	Pasta gratin	2	0–3	vomiting - diarrhoea	1	Family	1.50E +07	GS3
30	2010	Sausage and rice salad	8	0–3	Vomiting, diarrhoea	1	Family	3.00E +03	GS3
31	2010	Paella	27	6–9	Diarrhoea	1	Medico-social institute	2.80E +04	GS2
32	2010	Samosa and marinated shrimp tail	3	0–3	Diarrhoea	13	Commercial catering	2.90E +05	GS1; GS2; GS4; GS5; GS6; GS10
33	2010	Chicken	8	3–6	Vomiting, diarrhoea	1	Family	6,50E +04	GS3
34	2010	Tabbouleh	11	NK	Abdominal pains, other	1	Medico-social institute	NK	GS2
35	2010	Mashed potatoes and mashed vegetables	19	NK	Vomiting, diarrhoea, other	1	Medico-social institute	1.20E +04	GS1
36	2010	Pasta salad and rice salad	20	0–3	Vomiting, diarrhoea	7	Family	9.60E +07	GS1; GS3; GS4; GS5; GS6
37	2011	Mixed dish, soup, mixed ham, mixed apple and lasagne bolognese	19	6–9	Vomiting, diarrhoea	2	Medico-social institute	3.10E +03	GS3
38	2011	Shrimp	3	0–3	Abdominal pains, vomiting, other	2	Commercial catering	1.90E +03	GS1
39	2011	Moussaka	1	3–6	Abdominal pains	3	Commercial catering	8.20E +04	GS1; GS4; GS5
40	2011	Spaghetti	18	12–15	Vomiting, diarrhoea	2	School canteen	1.00E +03	GS8
41	2011	Couscous, semolina, lamb, vegetable dish	19	9–12	Nausea, diarrhoea	2	Medico-social institute	2.30E +03	GS4; GS11
42	2011	Carrots	3	3–6	Vomiting, diarrhoea, other	1	Commercial catering	5.80E +03	GS2
43	2011	Mashed potatoes	10	NK	Vomiting, diarrhoea	1	School canteen	7.80E +04	GS4
44	2011	Mashed celery	15	12–15	Vomiting, diarrhoea	1	Staff canteen	1.00E +05	GS7
45	2011	Tomatoes and fish	3	12–15	Vomiting, diarrhoea	1	Medico-social institute	5.50E +03	GS2
46	2011	Miso soup	1	NK	NK	1	Family	1.50E +03	GS9
47	2011	Mixed salad	3	0–3	Vomiting, diarrhoea	1	Medico-social institute	2.00E +03	GS2
48	2011	Tomato, corn, courgette dish	9	6–9	Abdominal pains, vomiting	1	School canteen	4.00E +03	GS2
49	2011	Samosa	9	0–3	Nausea, other	1	Commercial catering	1.,00E +09	GS6
50	2011	Rice and shellfish dish and fish	6	3–6	Abdominal pains, nausea	2	Staff canteen	2.70E +03	GS5; GS6
51	2012	Apricot compote, mashed carrots and mashed broccoli	8	9–12	Vomiting	1	School canteen	7.00E +02	GS1
52	2012	Paella	2	0–3	Vomiting, diarrhoea, other	3	Commercial catering	2.10E +04	GS1; GS3; GS10
53	2012	Pasta	60	0–3	Vomiting, diarrhoea	3	School canteen	5.80E +04	GS5
54	2012	Mixed salad	8	18–21	Abdominal pains, vomiting, other	1	Family	4.00E +02	GS2

FBO: food-borne outbreak; NK: not known.

^a Medico-social institutes included centres for disabled people, leisure centres, retirement homes and other community facilities.

Table 1c

Epidemiological and microbiological data of food-borne outbreaks associated solely with *Bacillus cereus*, France, 2007–2014 (74 outbreaks, 339 strains)

FBO	Year	Incriminated food	Human cases n	Incubation period in hours	Symptoms	Strain patterns identified n	Outbreak setting ^a	CFU/g	Genetic signature
55	2012	Chicken	NK	NK	Other	3	Commercial catering	4.00E +03	GS2; GS5
56	2012	Lamb meat	5	6–9	Vomiting, diarrhoea	1	Staff canteen	2.30E +03	GS2
57	2012	Mashed fish	18	9–12	Vomiting, diarrhoea	1	Medico-social institute	4.00E +02	GS7
58	2012	Diced mixed vegetables	14	9–12	Vomiting, diarrhoea	1	Medico-social institute	4.00E +02	GS2
59	2012	Millefeuille pastry	2	3–6	Nausea	1	Commercial catering	2.00E +03	GS2
60	2012	Onion soup	5	9–12	Vomiting	1	School canteen	4.00E +02	GS2
61	2013	Semolina	3	3–6	Vomiting, diarrhoea	2	Family	1.00E +04	GS5; GS10
62	2013	Grilled pork	2	6–9	Vomiting, diarrhoea	2	Family	1.80E +04	GS1; GS9
63	2013	Cheese-topped dish of seafood, pasta	15	6–9	Diarrhoea, other	4	Staff canteen	6.50E +03	GS1; GS3; GS4
64	2013	Mashed potatoes	12	3–6	Vomiting, diarrhoea, other	2	Medico-social institute	2.90E +03	GS1; GS3
65	2013	Pineapple	5	NK	Other	2	School canteen	4.50E +02	GS1; GS9
66	2013	Mashed spinach	13	6–9	Vomiting, diarrhoea	3	Medico-social institute	1.00E +04	GS1; GS4
67	2013	Vegetable soup	10	15–18	Vomiting, diarrhoea	1	Medico-social institute	9,10E +02	GS2
68	2013	Mixed salad	NK	6–9	Abdominal pains	1	School canteen	5.50E +02	GS2
69	2013	Spinach	8	0–3	Vomiting, diarrhoea, other	2	Staff canteen	3.60E +02	GS5; GS10
70	2013	Mixed pie	19	12–15	Vomiting, diarrhoea	1	Medico-social institute	4.00E +02	GS1
71	2014	Mashed parsnips	11	0–3	Vomiting	2	School canteen	4,00E +02	GS3
72	2014	Shrimp	6	0–3	Abdominal pains, vomiting	2	School canteen	7.70E +03	GS1
73	2014	Polenta	25	18–21	Abdominal pains, diarrhoea	1	Medico-social institute	9.00E +03	GS5
74	2014	Semolina and ginger (spice)	11	0–3	Vomiting, diarrhoea	2	Family	1.50E +06	GS3; GS6

FBO: food-borne outbreak; NK: not known.

^a Medico-social institutes included centres for disabled people, leisure centres, retirement homes and other community facilities.

highlighting the need for accurate data on the diversity of the isolated strains during FBO investigation. In contrast, for 42 of the 74 FBOs, a unique strain pattern was identified for each FBO, providing a valuable strain collection for further analysis of the correlation between *B. cereus* genotypic features and associated diseases. Thus, the design of this study strengthens the interpretation of results and avoids bias regarding the bacterial agent causing the FBO.

Our study described 74 FBOs in which only *B. cereus* was recovered. Nevertheless, a limitation of our study is the exhaustivity of the studied FBOs during the

period, as the French institute for public health surveillance (InVS, since 2016 Santé publique France) notified 148 FBOs between 2007 and 2014, in which *B. cereus* was the confirmed causative agent (Figure 4). The number FBOs notified to InVS was slightly higher than that of FBOs for which strains were received in ANSES and could be explained by the absence of microbiological investigation of such FBOs or the absence of isolation or sending *B. cereus* strains for further analysis.

Starchy food and vegetables were the most common food vehicles identified in our study. A previous study in commercial cooked chilled foods containing

Table 2

Genetic signatures of *Bacillus cereus* strains according to gene detection and panC phylogenetic groups, France, 2007–2014 (n = 159)

Genetic signature	Number of strains	Genes detected						panC phylogenetic groups
		cytK-1	cytK-2	ces	hlyII	nheABC	hblCDA	
GS1	34	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	II -III - IV
GS2	28	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	IV
GS3	25	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	III
GS4	18	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	II - III
GS5	18	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	II - III
GS6	10	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	II - IV
GS7	8	Pos	ND	ND	ND	ND	ND	VII
GS8	6	Neg	Neg	Neg	Neg	BC	AD	VI
GS9	4	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	II - III
GS10	5	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	IV - V
GS11	1	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	III
GS12	2	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	II

AD: only *hblA* and *hblD* detected; BC: only *nheB* and *nheC* detected; ND: primers used are unable to detect these genes in GS7 group strains; Neg: negative; Pos: positive.

vegetables had shown high *B. cereus* contamination levels in raw vegetables [23]. Thus, particular attention should be taken during sampling and epidemiological investigation into potential *B. cereus* contamination of vegetables and starchy food. In our study, 60% (44/74) of FBOs occurred in an institutional catering context. In the family context, 40% (26/64) of the cases were caused by emetic strains. Incorrect cooling of food during preparation or the conservation of cooked dishes at room temperature is thought to be the cause of cereulide production [24]. Moreover, the severity of symptoms associated with emetic strains might explain an increased reporting of these strains in the family context, compared with diarrhoeic strains which may remain undiagnosed and therefore under-reported.

Epidemiological and clinical data show that the type of symptom could not be specifically associated with the presence of emetic or diarrhoeic strains. Indeed, 57% (n=42) of the 74 FBOs shared both diarrhoeic and emetic syndromes although they were caused by only one type of strain. This may be partially explained by the fact that the emetic GS3 strains strongly produce Nhe enterotoxin (data not shown). We suspect that emetic strains may be ingested concomitantly with cereulide preformed in food, increasing pathogenicity and causing a mix of symptoms.

A significant difference was observed for the incubation period according to the type of strain. This is in accordance with previous findings showing that rapid onset of an emetic syndrome indicates intoxication by cereulide [25]. In contrast, ingestion of diarrhoeic bacteria can induce pathology via the production of enterotoxins in the small intestine, leading to a longer incubation period [26]. In some FBOs, the strains had short incubation periods (0–3 hours) without involvement of

emetic strains. We hypothesise that those strains might be responsible for rapid vomiting despite absence of the *ces* gene as previously described [27], or alternatively that the emetic toxin was concomitantly ingested with the contaminated food in addition to a *ces*-negative strain, or that unknown factors were responsible for vomiting symptoms.

Diarrhoeal diseases are often associated with *B. cereus* counts of 10^5 to 10^8 cells or spores [28]. In our study, concentrations below 10^3 CFU/g were found in 12 of 57 foods related to diarrhoeal FBOs. This challenges the concept of a minimum infectious dose for *B. cereus* in diarrhoeal FBOs. A mathematical model based on systematic data collection of *B. cereus* concentrations in food implicated in outbreaks could be developed for dose–response assessment, in order to quantify infectivity associated with single cells [29]. Levels of at least 10^5 CFU/g have generally been reported in the incriminated food linked to an emetic syndrome [30]. In our study, levels of as few as 400 CFU/g were implicated. This could be explained by cereulide's strong resistance to various treatments, underlining the importance of quantifying cereulide in foods. We cannot exclude the possibility that the CFUs recovered from leftover food accurately corresponded to the initial ingested CFUs. Indeed, food processing and storage before tests may have injured vegetative bacteria. However, we suspect that the spores, which are resistant to storage, are likely to be responsible for food-borne infections.

The genetic diversity of *B. cereus* strains involved in FBOs was revealed in our study by characterisation of strains based on the detection of the genes encoding cereulide, diarrhoeic toxins (Nhe, Hbl, CytK-1 and CytK-2) and Haemolysin (HlyII) and by phylogenetic classification. A total of 12 pathogenicity signatures based on

genetic features of the strains were identified. Emetic strains were clustered in GS3, and possessed both the *ces* gene and the *nhe* genes. This corroborates with the M13 patterns, showing a high clonality of the GS3 group. Surprisingly, all the GS3 strains were unable to hydrolyse starch, although they were mostly found in starchy foods, as published elsewhere [31]. An atypical *ces*-positive strain was classified in GS11, characterised by the presence of the *cytK-2* gene and the absence of Nhe production, despite detection of *nhe* genes (data not shown). This strain was detected once in the analysis of FBO 41, together with a strain belonging to GS4. Such atypical emetic strains have been described [25].

The diarrhoeic strains were more polymorphic than the emetic strains, displaying nine different genetic signatures, although six accounted for 84% (105/125) of the strains. Genes encoding Nhe were present in all GSs, but had variable Nhe production (data not shown), suggesting that other factors may be involved in pathogenicity. GS1 (*nhe* genes only) and GS2 (*nhe*, *hbl* and *cytK2*) were the most prevalent GSs and may have a large impact on human health: they were present in 28% (20/74) and 31% (23/74) of FBOs, respectively. This is consistent with previous findings showing 28% and 24% of *B. cereus* strains belonging to GS1 and GS2, respectively [13]. Unlike GS1 strains, which were divided into three different phylogenetic groups, all GS2 strains belonged to phylogenetic group IV. These strains produce high concentrations of Hbl, are strongly cytotoxic to Caco2 cells and are more prevalent among strains responsible for food poisoning [12]. These characteristics might partially explain the pathogenic potential of strains of GS2, although a synergistic effect of Hbl and Nhe on pathogenicity was not observed [32].

GS7 contained all the *B. cytotoxicus* strains carrying the *cytK-1* gene, which were related to phylogenetic group VII. Strains carrying *cytK-1* were mainly found in vegetable purees, corroborating results of a study showing that 35% of *B. cereus* strains found in commercial potato products taken on retail level or from catering establishments, possess *cytK-1* [33].

Several studies suggest that the pathogenic potential of group VI strains is very low [12]. In our study, these GS8 strains were involved in two FBOs in association with other strains belonging to GS2 and GS7, (FBO 7 and 13, respectively). Thus, it was not proven that GS8 strains were responsible for the symptoms. However, FBO 40, with 18 human cases, was caused by a unique GS8 strain, suggesting a virulence potential of this group [12].

Taken together, assignation of the strains according to genetic signature showed a high genetic diversity of *B. cereus* strains involved in FBOs and their pathogenic potential. Our results underline that *B. cereus* is a food-borne pathogen with a substantial impact on human health that should be investigated when a FBO is suspected. We propose an approach based on reported

symptoms and incubation period. Particular attention should be given to vegetables and starchy food during the sampling as part of the investigation. We recommend collecting at least five colonies from each food sample potentially contaminated with *B. cereus*, with different morphologies, as several *B. cereus* with different genetic characteristics may be present in the same food product.

Acknowledgements

The authors would like to warmly thank all the district veterinary and food analysis laboratories for carrying out *B. cereus* detection and transmitting isolates together with epidemiological data to the Laboratory for Food Safety. We also address special thanks to Dr Marie Laure De Buyser, who initiated the strain collection and the Central Veterinary Services Laboratory Unit of the Laboratory for Food safety.

Conflict of interest

None declared.

Authors' contributions

BG participated in the design of the study and the draft of all the manuscript, he conducted the microbial analysis of confirmation and characterisation of the strains, as well collected the epidemiological data as part of a PhD work. SH participated in the design and coordination of the study, and the draft of all the manuscript. LG carried out the statistical analysis on the clinical and epidemiological data and took part in the draft of the manuscript. SCS took part in building of the strain collection and molecular characterisation. MLV and JG took part in the confirmation of isolates and PCR gene detection. SP was in charge of the enterotoxins production. VM and JAH participated in the design of the study and took part in the draft of the manuscript. NR participated in the design of the study, data interpretation and the draft of all the manuscript. AB participated in the design and coordination of the study, and the draft of all the manuscript.

References

1. Guinebretière M-H, Auger S, Galleron N, Contzen M, De Sarrau B, De Buyser M-L, et al. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63(Pt 1):31-40. DOI: 10.1099/ijs.0.030627-0 PMID: 22328607
2. Drobniński FA. *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev*. 1993;6(4):324-38. DOI: 10.1128/CMR.6.4.324 PMID: 8269390
3. Mock M, Fouet A. Anthrax. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55(1):647-71. DOI: 10.1146/annurev.micro.55.1.647 PMID: 11544370
4. Santé publique France. Données relatives aux toxi-infections alimentaires collectives déclarées en France en 2013. [Data on collective food-borne outbreaks reported in France in 2013]. Saint-Maurice: Santé publique France. [Accessed Dec 2015]. French. Available from: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Toxi-infections-alimentaires-collectives/Donnees-epidemiologiques>
5. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA, ECDC). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 2015;13(1):3991. doi:DOI: 10.2903/j.efsa.2015.3991,165 pp.
6. Dierick K, Van Coillie E, Swiecicka I, Meyfroidt G, Devlieger H, Meulemans A, et al. Fatal family outbreak of *Bacillus*

- cereus-associated food poisoning. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4277-9. DOI: 10.1128/JCM.43.8.4277-4279.2005 PMID: 16082000
1. Ehling-Schulz M, Vukov N, Schulz A, Shaheen R, Andersson M, Märtlbauer E, et al. Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(1):105-13. DOI: 10.1128/AEM.71.1.105-113.2005 PMID: 15640177
 2. Fagerlund A, Ween O, Lund T, Hardy SP, Granum PE. Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology.* 2004;150(Pt 8):2689-97. DOI: 10.1099/mic.0.26975-0 PMID: 15289565
 3. Ramarao N, Sanchis V. The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review. *Toxins (Basel).* 2013;5(6):1119-39. DOI: 10.3390/toxins5061119 PMID: 23748204
 4. Cadot C, Tran SL, Vignaud ML, De Buyser ML, Kolstø AB, Brisabois A, et al. *InhA1*, *NprA*, and *HlyII* as candidates for markers to differentiate pathogenic from nonpathogenic *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1358-65. DOI: 10.1128/JCM.02123-09 PMID: 20129969
 5. Tran SL, Guillemet E, Gohar M, Lereclus D, Ramarao N. CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence. *J Bacteriol.* 2010;192(10):2638-42. DOI: 10.1128/JB.01315-09 PMID: 20233921
 6. Guinebretière M-H, Velge P, Couvert O, Carlin F, Debuyser M-L, Nguyen-The C. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3388-91. DOI: 10.1128/JCM.00921-10 PMID: 20660215
 7. Yang IC, Shih DY-C, Huang T-P, Huang Y-P, Wang J-Y, Pan T-M. Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. *J Food Prot.* 2005;68(10):2123-30. PMID: 16245717
 8. Jeßberger N, Krey VM, Rademacher C, Böhm M-E, Mohr A-K, Ehling-Schulz M, et al. From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. *Front Microbiol.* 2015;6:560. PMID: 26113843
 9. Beecher DJ, Wong AC. Identification of hemolysin BL-producing *Bacillus cereus* isolates by a discontinuous hemolytic pattern in blood agar. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(5):1646-51. PMID: 8017944
 10. Guinebretière M-H, Nguyen-The C. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol Ecol.* 2003;43(2):207-15. PMID: 19719681
 11. Guinebretière M-H, Thompson FL, Sorokin A, Normand P, Dawyndt P, Ehling-Schulz M, et al. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ Microbiol.* 2008;10(4):851-65. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01495.x PMID: 18036180
 12. Guinebretière M-H, Broussolle V, Nguyen-The C. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol.* 2002;40(8):3053-6. DOI: 10.1128/JCM.40.8.3053-3056.2002 PMID: 12149378
 13. Pouillot R, Delignette-Muller ML. Evaluating variability and uncertainty separately in microbial quantitative risk assessment using two R packages. *Int J Food Microbiol.* 2010;142(3):330-40. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.011 PMID: 20674055
 14. Guillier L, Thébault A, Gauchard F, Pommepuy M, Guignard A, Malle P. A risk-based sampling plan for monitoring of histamine in fish products. *J Food Prot.* 2011;74(2):302-10. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-10-234 PMID: 21333153
 15. World Health Organization (WHO). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases; foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Geneva: WHO; 2015. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf
 16. Cadel Six S, De Buyser M-L, Vignaud ML, Dao TT, Messio S, Pairaud S, et al. Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus* : bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. [Bacillus cereus food poisoning outbreaks: strain characterization results, 2006-2010]. *Bull Epidemiol Hebd.* 2012;(Hors-série):45-9. French. Available from: <https://pro.anses.fr/bulletin-epidemiologique/Documents/BEP-mg-BE50-art14.pdf>
 17. Choma C, Guinebretière MH, Carlin F, Schmitt P, Velge P, Granum PE, et al. Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *J Appl Microbiol.* 2000;88(4):617-25. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00998.x PMID: 10792519
 18. Agata N, Ohta M, Yokoyama K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *Int J Food Microbiol.* 2002;73(1):23-7. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00692-4 PMID: 11883672
 19. Ehling-Schulz M, Guinebretière M-H, Monthán A, Berge O, Fricker M, Svensson B. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;260(2):232-40. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00320.x PMID: 16842349
 20. Ceuppens S, Rajkovic A, Hamelink S, Van de Wiele T, Boon N, Uyttendaele M. Enterotoxin production by *Bacillus cereus* under gastrointestinal conditions and their immunological detection by commercially available kits. *Foodborne Pathog Dis.* 2012;9(12):1130-6. DOI: 10.1089/fpd.2012.1230 PMID: 23237409
 21. Schmid D, Rademacher C, Kanitz EE, Frenzel E, Simons E, Allerberger F, et al. Elucidation of enterotoxigenic *Bacillus cereus* outbreaks in Austria by complementary epidemiological and microbiological investigations, 2013. *Int J Food Microbiol.* 2016;232:80-6. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.011 PMID: 27257745
 22. Granum PE, Lund T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;157(2):223-8. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12776.x PMID: 9435100
 23. Teunis PFM, Kasuga F, Fazil A, Ogden ID, Rotariu O, Strachan NJC. Dose-response modeling of Salmonella using outbreak data. *Int J Food Microbiol.* 2010;144(2):243-9. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.026 PMID: 21036411
 24. Gilber RJ, Kramer JM. *Bacillus cereus* food poisoning. In: Cliver DC, Cochrane BA Editors. *Progress in Food Safety.* (proceeding of symposium) Madison (WI): Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison, Madison; 1986. p. 85-93.
 25. Chon JW, Kim JH, Lee SJ, Hyeon JY, Song KY, Park C, et al. Prevalence, phenotypic traits and molecular characterization of emetic toxin-producing *Bacillus cereus* strains isolated from human stools in Korea. *J Appl Microbiol.* 2012;112(5):1042-9. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05277.x PMID: 22394210
 26. Sastalla I, Fattah R, Coppage N, Nandy P, Crown D, Pomerantsev AP, et al. The *Bacillus cereus* Hbl and Nhe tripartite enterotoxin components assemble sequentially on the surface of target cells and are not interchangeable. *PLoS One.* 2013;8(10):e76955. DOI: 10.1371/journal.pone.0076955 PMID: 24204713
 27. Contzen M, Hailer M, Rau J. Isolation of *Bacillus cytotoxicus* from various commercial potato products. *Int J Food Microbiol.* 2014;174:19-22. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.024 PMID: 24440535

License and copyright

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) Licence. You may share and adapt the material, but must give appropriate credit to the source, provide a link to the licence, and indicate if changes were made.

This article is copyright of the authors, 2016.

1.2. Révision de la fiche *Bacillus cereus* de l'Anses

En parallèle de ce travail, j'ai également participé à la révision de la fiche Anses portant sur *B. cereus*. Cette fiche a pour but d'informer le grand public et principalement les professionnels de la restauration sur le risque engendré par *B. cereus* dans l'alimentation.

Dans cette fiche, j'ai participé à mettre à jour les données relatives aux Toxi-Infections Alimentaires collectives, à proposer le tableau sur les groupes phylogénétiques de *B. cereus sensu lato*, apporter des données plus précises sur l'implication des souches émétiques de *B. cereus* dans les TIAC et proposer de nouvelles recommandations aux utilisateurs.

Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments :

Bacillus cereus

Famille des *Bacillaceae*, genre : *Bacillus* (bactérie)

Caractéristiques et sources de *Bacillus cereus*

Principales caractéristiques microbiologiques

Bacillus cereus est responsable de toxi-infections caractérisées par des symptômes diarrhéiques et d'intoxinations¹ se traduisant par des symptômes émétiques. Il s'agit d'un bâtonnet à coloration de Gram positive, sporulant et aéro-anaérobie facultatif.

Il fait partie d'un groupe de bactéries qui ont été longtemps considérées comme des espèces différentes mais qui, d'après des expérimentations d'hybridation AND/ADN appartiennent à la même espèce. Pour simplifier la description de ce groupe, les noms des anciennes espèces seront ici conservés. Elles sont souvent regroupées dans la littérature sous le terme « *Bacillus cereus sensu lato* » au sein duquel on distingue :

- *Bacillus cereus sensu stricto* ;
- *Bacillus thuringiensis* se différenciant de *B. cereus sensu stricto* par la production d'un cristal parasporal toxique contre les insectes et pouvant être utilisé comme bioinsecticide ;
- *Bacillus anthracis*, sensible à la pénicilline, agent de la maladie du charbon ;
- *Bacillus cytotoxicus* thermotolérant et hautement toxique ;
- *Bacillus weihenstephanensis* correspondant à certaines souches de *B. cereus* psychrotrophes ;
- *Bacillus mycoïdes* et *Bacillus pseudomycoïdes* caractérisés par la formation de colonies à bords filamenteux sur milieux gélosés.

Les 4 premières espèces peuvent être pathogènes pour l'Homme. Au niveau chromosomique, *B. anthracis* et *B. thuringiensis* ne peuvent pas être différenciés sur un plan génétique des autres membres du groupe *B. cereus sensu lato* mais se distinguent par des caractères de virulence portés par des plasmides.

Lors de l'analyse des aliments ou lors de l'investigation de toxi-infections alimentaires collectives, les tests permettant de distinguer *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu stricto*, *B.*

¹ Maladie d'origine alimentaire résultant de l'ingestion d'entérotoxines préformées dans l'aliment.

cytotoxicus et *B. weihenstephanensis* ne sont généralement pas effectués. Les informations dans ce domaine incluent donc de façon indifférenciée *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis* et *B. weihenstephanensis*. Dans la présente fiche, sauf mention du contraire, le terme *B. cereus* englobera donc ces trois espèces.

Afin de mieux différencier les souches de ce groupe, *B. cereus sensu lato* a été récemment subdivisé en sept groupes génétiques, les espèces traditionnelles se répartissant chacune dans un ou plusieurs groupes. Les sept groupes génétiques possèdent des capacités d'adaptation thermique différentes, des plus psychrotrophes aux plus thermotolérants, et différents degrés d'association avec des maladies transmises par les aliments. Le groupe VI est le plus psychrotrophe et n'a encore jamais été associé à des toxi-infections alimentaires. Les groupes II, V, IV sont psychrotrophes à mésophiles et les groupes III et VII sont mésophiles à thermotolérants.

Actuellement, trois entérotoxines majeures (Hbl, Nhe et CytK) ont été décrites chez *B. cereus sensu lato*. Les entérotoxines Hbl (hémolysine BL) et Nhe (entérotoxine non hémolytique) sont chacune composées de trois protéines. La cytotoxine K (CytK) existe sous deux formes, CytK1 et CytK2, la première étant plus cytotoxique que la seconde. Le gène codant Nhe est présent dans quasi toutes les souches mais n'est pas toujours fonctionnel. Les souches impliquées dans les toxi-infections alimentaires produisent en général plus de cette entérotoxine que les autres. En outre, certaines souches de *B. cereus* sont capables de produire une toxine émétique, appelée céréulide (un peptide cyclique). Elles représentent une minorité, généralement 1% ou moins des isolats issus des aliments ou de l'environnement, mais représentent 15% des souches isolées d'aliments ayant causé des troubles gastro-intestinaux. Ces souches appartiennent au groupe phylogénétique III (tableau 1).

Tableau 1 : Groupes phylogénétiques de *B. cereus sensu lato*

Groupes génétiques	Gamme de températures de croissance (°C)	Espèces	Thermo-résistance	Association avec des foyers de toxi-infections alimentaires
I	10-43	<i>B. pseudomycoïdes</i>	Non renseigné	-
II	7-40	<i>B. thuringiensis</i> II ou <i>B. cereus</i> II	++	+
III	15-45	<i>B. thuringiensis</i> III, <i>B. cereus</i> III or <i>B. anthracis</i>	+++	+++
IV	10-45	<i>B. thuringiensis</i> IV or <i>B. cereus</i> IV	++	++
V	10-40	<i>B. thuringiensis</i> V or <i>B. cereus</i> V	++	+
VI	5-37	<i>B. weihenstephanensis</i> , <i>B. mycoïdes</i> or <i>B. thuringiensis</i> VI	+	-
VII	20-50	<i>B. cytotoxicus</i>	+++	+++

Tableau 2 : Caractéristiques de croissance et de toxigenèse de *B. cereus* (données

Paramètres	Croissance (cellule végétative)			Toxine émétique (céréulide)				
				Production			Stabilité	
	Min	Opt	Max	Min	Opt	Max	Min	Max
Température (°C)	7 (pour la majorité des souches émétiques, la température minimale est de 10)	30-37	55	10	20-25	40	/	/
pH	4,6	6-7	9,3	/	/	/	2	9
a_w	0,92	0,99-1	/	/	/	/	/	/
NaCl (%)	0.5	/	10	/	/	5 (très faible production)	/	/

variables en fonction des groupes génétiques)

Une atmosphère modifiée contenant plus de 40 – 50% de CO₂ peut inhiber la croissance de *B. cereus*. L'anaérobiose inhibe la production de céréulide.

Il existe peu de données concernant la production des toxines diarrhéiques dans les conditions environnementales présentées dans le tableau 2. Cependant, ces toxines étant à priori produites dans l'intestin après ingestion de l'aliment contaminé, l'essentiel est d'éliminer les spores de la bactérie ou ses cellules végétatives. .

Sources du danger

Bacillus cereus est retrouvé sous forme de spores dans le sol, à des concentrations de l'ordre de 10⁴ à 10⁵ spores par gramme de sol. Les spores seraient dormantes dans le sol et se développeraient plutôt dans la faune du sol, par exemple dans le tube digestif d'insectes, d'arthropodes et de lombrics. *B. cereus* pourrait être un commensal du tube digestif d'insecte et s'y développerait lorsque son hôte est affaibli. Des spores de *B. cereus* sont aussi présentes dans le tube digestif d'animaux à sang chaud. *Bacillus cereus sensu stricto* peut être responsable, bien que rarement, de mammites chez les bovins et d'avortements chez les bovins et ovins.

Voies de transmission

La principale voie de transmission de cette bactérie à l'homme est alimentaire. En effet, de par son abondance dans le sol et la résistance de ses spores, *B. cereus* peut contaminer pratiquement toutes les matières premières et particulièrement les végétaux. On la retrouve par conséquent dans des aliments très diversifiés.

Des infections non gastro-intestinales à *B. cereus*, différentes de celles transmises par les aliments ont été décrites. Les portes d'entrée de l'infection sont des contaminations de plaie ou de cathéter (souvent d'origine nosocomiale) ou encore via les injections pratiquées par les toxicomanes.

Maladie humaine d'origine alimentaire

Nature de la maladie

B. cereus est responsable d'intoxications se traduisant par des symptômes émétiques (cf. Tableau 3) et de toxi-infections caractérisées par des symptômes diarrhéiques (cf. Tableau 4). Les maladies à symptômes émétiques sont causées par l'ingestion du céréulide, toxine produite dans l'aliment au cours de la croissance de *B. cereus*. Les maladies à symptômes diarrhéiques seraient causées par l'ingestion de cellules et/ou de spores de *B. cereus*, suivie d'une production d'entérotoxines dans l'intestin. Toutefois, *B. cereus* produit plusieurs autres protéines à effet toxique *in vitro* ou sur modèles animaux, et il n'est pas exclu que certaines d'entre elles contribuent aussi aux symptômes diarrhéiques.

Tableau 3 : Caractéristiques des maladies à symptômes émétiques

Durée moyenne d'incubation	Population cible	Principaux symptômes	Durée des symptômes	Durée de la période contagieuse	Complications
30 min - 5 h	Toute la population, toutes classes d'âges confondues	- nausées - vomissements - malaises - diarrhées et douleurs abdominales occasionnelles	Moins de 24 heures	Non transmissible (toxines)	Activité toxique sur plusieurs types de cellules humaines et peut provoquer une dégénérescence, toutefois réversible, du foie. La toxine émétique a été responsable d'au moins 8 cas graves rapportés dans la littérature entre 1997 et 2011 dont 5 décès chez des enfants ou de jeunes adultes avec une défaillance viscérale à différents niveaux (cœur, foie, reins, cerveau).

Tableau 4 : Caractéristiques des maladies à symptômes diarrhéiques

Durée moyenne d'incubation	Population cible	Principaux symptômes	Durée des symptômes	Durée de la période contagieuse	Complications
6 - 24 h	Toute la population, toutes classes d'âge confondues	- diarrhées aqueuses - douleurs abdominales - nausées occasionnelles	24 heures	Non transmissible (toxines)	Les complications des maladies à symptômes diarrhéiques sont exceptionnelles

Population sensible² : Pour les formes gastro-intestinales, il n'y a pas de population sensible identifiable pour les intoxications à *B. cereus*.

Des formes graves d'infections (septicémie, entérocolite nécrosante, hépatite fulminante, encéphalopathie, abcès cérébral) pouvant conduire à des décès ont été décrites chez des prématurés, des nouveau-nés, des jeunes adultes, chez des patients atteints d'une hémopathie maligne, de cirrhose, ou de maladie de Crohn traitée par immunosuppresseurs.

Relations dose-effet³ et dose-réponse⁴

Les toxi-infections diarrhéiques à *B. cereus* sont le plus souvent associées à une consommation d'aliments contenant au moins 10^5 ufc/g, bien que des épidémies associées à des aliments contenant 10^3 ufc/g aient été décrites. Toutes les souches de *B. cereus* n'ont pas la même capacité à provoquer des symptômes diarrhéiques.

La dose de céréulide suffisante pour provoquer des symptômes émétiques serait de l'ordre de 5 à 10 µg/kg de masse corporelle, selon des essais sur primate et d'après l'analyse d'aliments impliqués dans des intoxications alimentaires chez l'homme. Une telle quantité de céréulide peut être retrouvée dans les aliments contenant au moins 10^6 *B. cereus* ufc /g.

² Population sensible : les personnes ayant une probabilité plus forte que la moyenne de développer, après exposition au danger par voie alimentaire [dans le cas des fiches de l'Anses], des symptômes de la maladie, ou des formes graves de la maladie.

³ Relation entre la dose (la quantité de cellules microbiennes ou de toxine ingérées au cours d'un repas) et l'effet chez un individu.

⁴ Pour un effet donné, relation entre la dose et la réponse, c'est-à-dire la probabilité de la manifestation de cet effet, dans la population.

Aucune courbe dose-réponse n'a été établie pour *B. cereus* et pour le céréulide.

Épidémiologie

Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sont des maladies à déclaration obligatoire (DO) en France. En France comme en Europe, les maladies à *B. cereus* sont vraisemblablement sous-déclarées : lors d'épisodes de toxi-infections alimentaires collectives, leur recherche n'était pas souvent effectuée ; par ailleurs, les symptômes des toxi-infections alimentaires diarrhéiques et émétiques à *B. cereus* sont très proches de ceux provoqués respectivement par *Clostridium perfringens* et *Staphylococcus aureus*.

Tableau 4. Données InVS relatives aux toxi-infections alimentaires à *B. cereus* en France.

Nombre de foyers (% des foyers avec un agent confirmé ou un agent suspecté)

	2012		2013		2014	
	Confirmés	Suspectés	Confirmés	Suspectés	Confirmés	Suspectés
Foyers	20 (9.3%)	198 (24.6%)	29 (15%)	224 (25%)	23 (9%)	241 (25%)
Cas	349 (14.8%)	1673 (25.5%)	344 (15%)	1902 (27%)	447 (15%)	2031 (27%)
Hospitalisés	11 (5.8%)	115 (25.7%)	7 (4%)	67 (17%)	18 (7%)	77 (22%)

Rôle des aliments

Principaux aliments à considérer

Les spores de *B. cereus* sont présentes dans quasiment toutes les catégories d'aliments. Des produits secs ou déshydratés, tels que les épices, les herbes aromatiques, certains légumes, les céréales et les farines, sont fréquemment contaminés par *B. cereus*, mais à des niveaux variables. Ces matières premières entrant dans la composition d'un produit fini, sont des sources potentielles de contamination. Par ailleurs, les spores de *B. cereus* possèdent de fortes capacités d'adhésion aux surfaces des équipements qui favorisent ainsi la formation de biofilms. Ces biofilms peuvent ainsi devenir des réservoirs de spores dans les industries, en raison d'une élimination par les traitements de nettoyage plus difficile

Les risques pour le consommateur sont le plus souvent liés à une multiplication de *B. cereus* lors de l'exposition des aliments à des températures inappropriées. Les aliments associés à des toxi-infections à *B. cereus* subissent fréquemment, mais pas exclusivement, une étape de cuisson et/ou ne sont pas refroidis de manière adéquate après leur préparation et avant la consommation. Des intoxications avec symptômes émétiques ont été causées par des produits amylicés (exemple : plats à base de riz ou de pâtes).

Sans être limitatif, les plats cuisinés, les produits agrémentés d'épices, d'herbes ou aromates, les aliments déshydratés reconstitués par addition d'eau chaude (potages en poudre, purées de pommes de terre préparées à partir de flocons, lait en poudre, etc.) ou cuits à l'eau (pâtes, riz, semoule) conservés à une température permettant la croissance de *B. cereus* (températures comprises entre 4°C et 55°C), et avec une consommation différée, sont le plus souvent associés à des toxi-infections alimentaires.

Traitements d'inactivation en milieu industriel

Tableau 5 : traitements d'inactivation de *B. cereus* dans les aliments

Désinfectants	Effets de la température												
<p>Les cellules végétatives sont sensibles à tous les désinfectants autorisés en IAA, sous réserve de suivre les modalités d'utilisation recommandée.</p> <p>Les procédures de nettoyage à base de soude à chaud peuvent permettre plusieurs réductions décimales du nombre de spores adhérentes aux surfaces.</p> <p>De l'ordre de 4 réductions décimales du nombre de spores peuvent être obtenues après 5 minutes de contact avec des désinfectants chlorés contenant au moins 100 à 200 mg/L de chlore actif</p>	<p>La cuisson des aliments ne permet pas de garantir l'absence de spores de <i>B. cereus</i>, mais peut suffire à inactiver les groupes génétiques les plus thermosensibles. <u>Tous les <i>B. cereus</i> sont inactivés</u> par les traitements d'appertisation.</p> <p>Tableau 6 : Valeurs de D⁵ et z⁶ pour les spores</p> <table border="1" data-bbox="539 797 880 981"> <tr> <td>D_{95°C}</td> <td>2 min (porc)</td> </tr> <tr> <td>D_{100°C}</td> <td>1,2-7,5 min (riz)</td> </tr> <tr> <td>z</td> <td>8-12,5°C</td> </tr> </table> <p>Tableau 7 : Valeurs de D_{90°C} pour les spores de <i>B. cereus</i>,</p> <table border="1" data-bbox="1035 797 1409 976"> <tr> <td>Groupe VI</td> <td>1,7 min</td> </tr> <tr> <td>Groupes II, V, IV</td> <td>20-30 min</td> </tr> <tr> <td>Groupes III, VII</td> <td>40-90 min</td> </tr> </table> <p>6 réductions décimales sont obtenues, par exemple, avec un traitement thermique :</p> <ul style="list-style-type: none"> -à 70°C pendant 12 s (sur cellule végétative dans la viande de porc) -à 105°C pendant 36 s (sur spore dans la viande de porc) <p>NB : la thermorésistance des spores est réduite à pH acide (pH < 4,3).</p> <p>La toxine émétique à l'origine de l'intoxication est thermorésistante puisqu'elle ne peut être détruite que par un traitement à 126°C appliqué pendant 90 min. Il a été montré qu'à pH neutre, des traitements à 121°C pendant 120 min ne suffiraient pas à inactiver le céréulide.</p>	D _{95°C}	2 min (porc)	D _{100°C}	1,2-7,5 min (riz)	z	8-12,5°C	Groupe VI	1,7 min	Groupes II, V, IV	20-30 min	Groupes III, VII	40-90 min
D _{95°C}	2 min (porc)												
D _{100°C}	1,2-7,5 min (riz)												
z	8-12,5°C												
Groupe VI	1,7 min												
Groupes II, V, IV	20-30 min												
Groupes III, VII	40-90 min												
Ionisation	Hautes Pressions												
<p>Pour les spores :</p> <p>D₁₀⁷ = 1,6 – 2,6 kGy</p>	<p>Les spores de <i>B. cereus</i> sont très résistantes à la pression. Les spores peuvent seulement être inactivées de façon significative par la combinaison d'un traitement thermique (>60-70°C) et d'un traitement par hautes pressions (550-600 MPa).</p>												

Surveillance dans les aliments

B. cereus ne fait pas l'objet de critères de sécurité des aliments selon la réglementation européenne. Toutefois, le Règlement n°2073/2005 modifié, définit un critère d'hygiène des

⁵ D (temps de réduction décimale) est le temps nécessaire à une température donnée pour diviser par 10 la population du danger microbiologique initialement présente.

⁶ z est la variation de température (°C) correspondant à une variation d'un facteur 10 du temps de réduction décimale D.

⁷ D₁₀ est la dose (en kGy) nécessaire pour réduire une population à 10% de son effectif initial.

procédés applicables à *B. cereus* dans le cas des préparations déshydratées destinées aux enfants de moins de 6 mois.

La norme NF EN ISO 7932 permet l'identification et le dénombrement de *B. cereus* présomptifs revivifiants. La recherche et le dénombrement de *B. cereus* présumés viables en petit nombre peut se faire suivant la norme NF EN ISO 21871. De plus, des méthodes de détection de *B. cereus* par PCR en temps réel ont été récemment développées.

La recherche des toxines diarrhéiques peut être effectuée par plusieurs techniques : test ELISA, agglutination passive reverse (RPLA), immunodiffusion ou encore par immunoélectrophorèse. Etant produites dans les intestins, leur recherche dans les aliments n'est pas un indicateur du risque d'intoxication diarrhéique. Ces tests sont utiles pour caractériser le potentiel toxigène des différentes souches de *B. cereus*.

La détection/quantification du céréulide dans l'aliment peut être réalisée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Le céréulide est très stable et peut subsister dans l'aliment après inactivation de la bactérie, par un traitement thermique par exemple, ou être apporté dans un aliment par un ingrédient dans lequel *B. cereus* se serait développé. Le nombre de *B. cereus* dans un aliment au stade de sa consommation n'est donc pas un indicateur suffisant du risque d'intoxication.

Recommandations aux opérateurs

- Les bonnes pratiques d'hygiène (BPH) et les bonnes pratiques de fabrication (BPF) sont des pré-requis indispensables pour prévenir la contamination par les spores et leur développement. Le nettoyage est une étape essentielle dans la prévention des contaminations des équipements utilisés pour acheminer les aliments sur les différents postes de fabrication.

- Il est nécessaire d'éviter que *B. cereus* n'atteigne un niveau dangereux lors de la consommation, ce qui, suivant la capacité de croissance de *B. cereus* dans l'aliment, peut nécessiter de surveiller le nombre de spores (et de formes végétatives) présentes dans les matières premières, en fin de fabrication et/ou au cours de la vie du produit, mais aussi dans les équipements de fabrication.

- Tout particulièrement en restauration collective, il est important de refroidir rapidement les aliments cuisinés que l'on veut conserver au froid pour empêcher la germination des spores et la multiplication des cellules végétatives. Les aliments non soumis à une réfrigération suffisamment rapide et qui ne sont pas consommés immédiatement après préparation et dans lesquels *B. cereus* peut être présent et se développer, doivent être maintenus au-dessus de 63°C. Le refroidissement des produits doit être rapide et permettre un abaissement de la température de 63°C et au-delà à moins de 10°C en moins de deux heures (d'après l'arrêté du 21 décembre 2009) afin de limiter la germination des spores et la prolifération des cellules végétatives. Le réchauffage des plats doit être rapide, de 10°C à 63°C en moins d'une heure, selon les mêmes principes. Les plats froids doivent être maintenus à moins de 3°C, avec une tolérance jusqu'à 10°C pendant moins de deux heures avant le service. Les plats préparés à l'avance ont une durée de vie de J+3 maximum. L'opérateur peut suivre d'autres procédés pour ces différentes préparations sous réserve d'avoir mené une analyse complète des dangers.

Hygiène domestique

Recommandations aux consommateurs

- Le nettoyage des légumes pour éliminer la terre, le nettoyage des surfaces, du réfrigérateur et des ustensiles de cuisine, réduisent, mais n'éliminent pas la contamination des aliments par des spores de *B. cereus*.

- Les aliments cuits ou les aliments secs réhydratés doivent être refroidis et placés au réfrigérateur dans un délai de deux heures s'ils ne sont pas consommés immédiatement. Des aliments riches en eau (plats cuisinés, salades mélangées, etc.) conservés plusieurs heures à température ambiante (par exemple, restes de pique-nique) doivent être jetés et ne pas être consommés, même après avoir été réchauffés.

Liens

Références générales

Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la demande d'avis complémentaire concernant les références applicables aux denrées alimentaires en tant que critères indicateurs d'hygiène des procédés. 10 avril 2010

Dromigny, 2008. *Bacillus cereus*. Collection "Monographies de microbiologie". Editions Lavoisier Paris

EFSA (European Food Safety Authority) 2005. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp.* in foodstuffs. The EFSA Journal, 175, 1-48

EFSA 2015. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food borne outbreaks in 2014. The EFSA Journal, doi:10.2903/j.efsa.2015.4329

Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives, Données de la déclaration obligatoire, 2014. Institut de Veille Sanitaire, 2014

Guinebretière *et al.* 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. Environ. Microbiol. 10, 851-865

Cadel Six, S., De Buyser, M. L., Vignaud, M. L., Dao, T. T., Messio, S., Pairaud, S., *et al.* (2012). Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus* : bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. Bull. Épidémiol. 50, 57-61

Ramarao, N. *Bacillus cereus* : caractéristiques et pathogénie (2012), EMC Biologie Médicale, Vol 7 n°4.

Liens utiles

Anses : www.anses.fr

EFSA : www.efsa.europa.eu

Institut de veille sanitaire : <http://www.invs.sante.fr/surveillance/tiac>

2. Etude des infections non gastro-intestinales à *B. cereus* en France

L'objectif de cette étude était de caractériser des souches de *B. cereus* à l'origine d'infections non gastro-intestinales. Pour cela, j'ai mené une étude approfondie sur des souches de *B. cereus* isolées chez des patients et dans leurs environnements hospitaliers. Ces souches ont été collectées au sein de neuf hôpitaux français au cours d'une étude de cinq ans. Cette étude donne un aperçu des conséquences, des sources et des profils pathogènes des *B. cereus* à l'origine d'infections cliniques. Jusqu'à aujourd'hui, les études reportées décrivent essentiellement des cas individuels ou survenus dans un service hospitalier unique, mais les informations sur les caractéristiques génétiques et phénotypiques des souches incriminées sont rarement associées.

Les données épidémiologiques et cliniques des échantillons de *B. cereus* isolés de patients ont été collectées rétrospectivement au sein de neuf hôpitaux français volontaires entre 2008 et 2014. Les données comprenaient des informations démographiques de base, les services hospitaliers, le type d'échantillonnage, les sites de l'infection, la date de l'échantillonnage, les données cliniques, le traitement antibiotique administré et l'issue du patient, favorable ou non. En outre, les souches de *B. cereus* obtenues à partir de prélèvements de surface collectés dans l'environnement des cas cliniques ont également été incluses dans l'analyse microbiologique.

J'ai analysé les corrélations entre les symptômes cliniques associés à *B. cereus* et les signatures génétiques, les groupes phylogénétiques, la présence et l'expression des facteurs de virulence et la sensibilité aux antibiotiques.

Cette étude présente donc une enquête épidémiologique sur les infections cliniques à *B. cereus* dans divers hôpitaux combinés avec la caractérisation phénotypique et génétique des souches. J'ai démontré la présence de plusieurs contaminations croisées au sein des hôpitaux. Des souches identiques ont été isolées chez différents patients et/ou sur les surfaces de leur environnement hospitalier. Ces souches identiques ont parfois été isolées à deux ans d'intervalle. Ces cas représentent les premiers événements documentés de souches de *B. cereus* partageant des profils moléculaires identiques et isolées à partir de patients non apparentés, et responsables de contaminations intra- et inter-hospitalières.

Nous proposons un schéma pour la caractérisation de *B. cereus* basée sur des propriétés biochimiques et une identification génétique. En outre, la caractérisation des souches par leur résistance aux antibiotiques a montré des phénotypes de résistances acquises. L'ensemble de ces données devrait permettre d'ajuster rapidement le traitement antibiotique et les soins des patients. Dans l'ensemble, cette étude souligne que *B. cereus* isolé chez un patient, en particulier s'il est immunodéprimé, sur un matériel stérile ou sur des surfaces hospitalières, ne doit pas être négligé dans la couverture thérapeutique ni être seulement considéré comme un contaminant de surface. L'attention

apportée à cet agent pathogène doit être améliorée. Une attention insuffisante pourrait retarder la prise d'un traitement approprié et ainsi augmenter le risque d'infections graves et la mortalité.

Ces travaux ont été rassemblés dans un article soumis dans *Clinical Infectious Diseases* : *Bacillus cereus*, a serious cause of nosocomial infections: epidemiologic and genetic survey. 2016.

2.1. Article 2: Epidemiologic and genetic survey on hospital infections caused by *Bacillus cereus*.

Article soumis à Clinical Infectious Diseases

***Bacillus cereus*, a serious cause of nosocomial infections: epidemiologic and genetic survey**

Benjamin Glasset^{1,2}, Sabine Herbin², Sophie A. Granier², Laurent Cavalié³, Emilie Lafeuille⁴, Cyprien Guérin⁵, Raymond Ruimy⁶, Florence Cassagrande-Magne⁶, Marion Levast⁷, Nathalie Chautemps⁷, Jean-Winoc Decousser⁸, Laure Belotti⁹, Isabelle Pelloux¹⁰, Jérôme Robert⁴, Anne Brisabois² and Nalini Ramarao^{1*}

¹Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

²Université Paris-Est, Anses, Laboratory for Food Safety, 94700 Maisons-Alfort, France

³CHU Toulouse, Service de Bactériologie-Hygiène, IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, UPS, Toulouse, France

⁴Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Inserm, U1135, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), F-75013 Paris, France et Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Hôpitaux Universitaires Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, APHP, Paris, France

⁵MaiAGE, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

⁶CHU Nice, Laboratoire de bactériologie, Nice, France

⁷Hôpital de Chambéry, Laboratoire de Biologie Médicale, Chambéry, France

⁸Hôpitaux Universitaires Paris-Sud Antoine Béclère, Laboratoire Hygiène, Clamart, France

⁹CHU Strasbourg, Laboratoire d'hygiène hospitalière, Strasbourg, France

¹⁰CHU Grenoble, Laboratoire de Bactériologie, Grenoble, France

*Correspondence should be addressed to Nalini Rama Rao, INRA MICALIS-AgroParisTech, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France.

E-mail: nalini.ramarao@inra.fr

Key words: *B. cereus*, molecular characterization, WGS, hospital-cross infections, virulence factors, toxin gene profile, antibiotic therapy.

Abstract

Bacillus cereus is the 2nd bacterial agent responsible for food-borne outbreaks. In addition, local and systemic infections have been reported, mainly describing individual cases or single hospital setting. The real incidence of such infection is unknown and information on genetic and phenotypic characteristics of the incriminated strains is generally scarce.

Our comprehensive analysis of clinical data and characterization of strains isolated from patients during a large-scale survey allowed demonstrating the first documented occurrence of several intra and inter hospital-cross-contaminations. Identical *B. cereus* strains were recovered from different patients and hospital environments for up to 2 years.

In addition, we propose a scheme for the characterization of *B. cereus* based on biochemical properties and genetic identification and highlight that main genetic signatures may carry a high pathogenic potential. Moreover, the characterization of antibiotic resistance shows acquired resistance phenotype and should allow to quickly adjust the antibiotic treatment and care of patients.

Introduction

Bacillus cereus is a spore forming bacteria present in soil, foods and human skin [1, 2]. Beside food poisoning [3, 4], *B. cereus* induces local and systemic infections resulting in the patient death in about 10% of cases [5-13]. In addition, several cases of fulminant infections similar to anthrax, and affecting healthy persons, have also been reported [14-16].

Predisposing factors include intravenous drug use, surgical or traumatic wounds, intravascular catheters and prematurity due to an immature immune response and to the presence of indwelling devices in the intensive care environment of neonates [17-20]. Environmental reservoirs include air filtration/ventilation equipment, linen, medical devices and hands of the staff [9, 21].

Case reports relate mainly individual cases or come from single hospital center and no large survey has been done on *B. cereus* clinical infections. In addition, information on the genetic and phenotypic characteristics of the incriminated strains is generally scarce. An appropriate empirical antibiotic therapy should be started immediately after suspicion of *B. cereus* infection. However, as *B. cereus* is mainly considered as an environmental contaminant, delays in treatments may compromise the clinical outcome of patients.

In our study, we performed a thorough description of clinical cases, together with an accurate phenotypic and genetic characterization of the strains. This should be of major interest to improve treatments of patients with *B. cereus* infections.

Results

Epidemiology

Nine hospitals reported 39 patients with *B. cereus* strains isolated in at least one clinical sample during the five-year study period. For the microbiological analysis, a single *B. cereus* strain was included per patient, except if several strains were isolated in different clinical sites

or over a prolonged time period. It resulted that 45 *B. cereus* strains were further analyzed, in addition to 11 strains isolated from hospital surface samples (Table 1).

A majority of strains (41%) were isolated in newborn neonates, among which 31% were premature infants with low birth weight. Patients over 60 year old represented the second group of patients (26%), followed by middle aged patients (23%). Wards of hospitalization and symptoms recorded were diverse (Table 1, Table 2).

Consistent with previous individual case reports, *B. cereus* infections led to local and systemic infections (Table 2). Local colonization represented 8% of the cases. A total of 28 (72%) patients had a positive blood culture. Among them, 15 had another site displaying *B. cereus* including the lungs (n=7) or the central nervous system (n=5). The gastrointestinal tract represented 18% of the clinical sites. 15% patients had at least three clinical sites positive with *B. cereus*. Death occurred in eight (21%) patients, including four premature babies.

It is noteworthy that, for 62% (n=24) patients, *B. cereus* was considered as the potential cause of infections and usually taken into account by the physicians for the antibiotic therapy. In the remaining cases, *B. cereus* was firstly considered as a contaminant.

Biochemical identification

48% strains presented the ability to hydrolyze starch, 93% had lecithinase activity and 71% were hemolytic (not shown). 25% of the strains were high producers of Nhe and high producers of Hbl, 54% were high producers of Nhe and low or no producers of Hbl, 7% were low producers of Nhe and high producers of Hbl, and 14% were low or no producers of Nhe and Hbl (Figure 1).

Molecular characterization

The presence of six genes suspected to play a role during *B. cereus* pathogenesis was investigated. The combination of these six genes allowed clustering the strains into ten genetic signatures (GS) (Supl 1).

The most frequent GS were GS1 (*nhe* only, 34%), GS2 (*nhe*, *hbl*, *cytk-2*, 23%), GS3 (*nhe*, *ces*, 16%) and GS4 (*nhe*, *cytk-2*, 14%) (Figure 1).

Our clinical strains belonged to only three phylogenetic groups, *panC* II, III and IV representing 23%, 47% and 30% of the strains, respectively (Figure 1).

Finally, the M13 pattern of each strain was assessed. 41 different M13 profiles were identified (Figure 1). The discriminating Simpson's index revealed that M13 PCR allowed a high power of differentiation of the strains (discrimination index 0.983).

Antimicrobial susceptibility

Antimicrobial susceptibility tests revealed five susceptibility patterns (Figure 1-2-Supl2). Natural resistance to beta-lactams was confirmed for ampicillin and cefotaxime, while imipenem appeared active at low concentrations. All strains were categorized as susceptible to vancomycin, gentamicin, tetracyclin, ciprofloxacin, azithromycin and clindamycin. Two strains were resistant to chloramphenicol. One strain was resistant to rifampicin and one to cotrimoxazole (trimethoprim/sulfamethoxazole), respectively.

Principal component analyses

To analyze the potential correlations between the phenotypic and genotypic characterizations of the strains, principal component analyses were performed for each characteristic.

There were no obvious correlations between GS and/or symptoms, hospital wards and patient age.

Strains highly producing Hbl were weak producers of Nhe (Figure 3). Oppositely, strains highly producing Nhe were weak producers of Hbl and infected middle age or elderly patients (>34 year old).

The most striking results was the correlation between the low age of the patient (<6.5 year old) and no or weak production of Hbl and Nhe.

Molecular epidemiology

Intra-hospital contaminations

Strains with identical M13 pattern, *panC* sequencing (over the entire gene), GS, toxin production and antibiotic susceptibility/resistance pattern were grouped in a single molecular profile (Figure 1, 4). Strains with identical molecular profiles were recovered from different patients and hospitals strongly suggesting the occurrence of eight hospital cross-contaminations.

At hospital (A), a *B. cereus* strain was isolated from the umbilicus of a newborn (patient 5). The patient received a combination of cefotaxime, amoxicillin and amikacin and had a favorable outcome. A *B. cereus* strain with identical profile was isolated one week later from two clinical samples (blood culture and cerebrospinal fluid) from another neonate (patient 1). Patient 1 was a premature newborn (gestational age 26 weeks) who died at day 6 following a sepsis, and multiple-site infection with no antibiotherapy. The strains of patients 1 and 5 were characterized by the M13-1 profile, GS1, *panC* group III, 100% identity over the *panC* gene sequence, a medium Nhe and low Hbl production and the antibiotic profile a. All these similarities, and especially the M13 pattern, strongly suggested that the two strains were identical and/or may descend from a same recent ancestor. To confirm these findings, the three genomes of the strains were entirely sequenced (WGS). The three genomes showed 100% identity (Figure 4). Indeed, pairwise divergences between samples, calculated as the proportion of variable positions along the genome, were comprised between 2.9e-07 and 8.7e-07 and thus assigned as 0.00% (supplementary data 3).

Therefore, the WGS data confirmed that identical strains were recovered from two unrelated patients within the same hospital. In addition, the data indicate that the genomic characterization coupled with M13 typing allowed identifying and discriminating between strains.

At the same hospital (A), a *B. cereus* strain was isolated from a newborn (patient 4) diagnosed with a neonatal *B. cereus* infection and treated with vancomycin. A few weeks later, a *B. cereus* strain with a similar profile was isolated from another premature newborn with clinical sepsis (patient 3, gestational age 26 weeks) and treated with vancomycin. They both had a favorable outcome. This strain was characterized by the molecular M13-3, GS1, *panC* group I, antibiotic profile a, and was low Nhe and low Hbl producer, constituting a second strain cluster.

Similarly, at the same hospital (A), a *B. cereus* strain was isolated from a premature newborn (gestational age 27 weeks) with a clinical sepsis and brain abscesses (patient 2). The patient was treated with vancomycin and cefotaxime and had a favorable outcome. The same strain was isolated later twice from the hospital environment (environment 2 and 4). This strain had the M13-4, GS2, *panC* group IV, antibiotic profile a, and a medium Nhe and high Hbl production, constituting a third cluster.

At hospital (B), a *B. cereus* strain was isolated from three newborns (patients 6, 8 and 9) and from an environmental sample (environment 5) during the same month. Patient 6 had local *B. cereus* colonization at the point of entry of catheter. The patient was treated with ceftriaxone and the catheter was removed. Patient 8 had a contaminated gastric acid and patient 9 had a bacteremia. They both received antibiotics including vancomycin and had favorable outcomes. The recovered strain had the M13-2, GS1, *panC* group III, antibiotic profile a, and a medium Nhe and low Hbl production.

At hospital (E), a unique strain was recovered from two patients over one year time interval and at different hospital wards (oncology and neurology). Patient 23 was 66-year old and diagnosed with colorectal cancer and sepsis. *B. cereus* was isolated from a blood culture,

displaying also a coagulase-negative Staphylococcus. *B. cereus* was therefore neglected. However, one year later, a newborn (patient 21) had a *B. cereus* infection with the same strain leading to kidney and urinary infections. This strain was characterized by a M13-5, GS1, *panC* group II, antibiotic profile a, and was a low Nhe and Hbl producer.

At the same hospital (E), a *B. cereus* strain assigned to M13-6, *panC* group III, antibiotic profile a, high Nhe and low Hbl producer, was recovered from three different patients over a 2-year period. The three patients were hospitalized in different wards: hematology, nephrology and gastroenterology. Patient 16, 65 year old had a positive blood culture and died without antibiotic treatment. Patient 17, age 54 had a bacteremia at the point of entry of the catheter. He had a favorable outcome after several antibiotic courses for 21 days. Patient 18, age 63, had three positive blood cultures yielding the same *B. cereus* strain during three months. He had a favorable outcome following three consecutive antibiotic courses.

More recently, at hospital (F), a *B. cereus* strain with M13-7 profile, GS3, *panC* III, antibiotic profile a, high Nhe and low Hbl producer was isolated from two patients over a one-year period. Patient 33 was 24 year-old admitted at the emergency ward with abdominal pain, shivering, vomiting, fever and diarrhea. A blood culture was positive for this *B. cereus* strain. Patient 31, 48-year old, was admitted in cardiology almost one year later with clinical sepsis and acute respiratory distress. A blood culture was positive with the same *B. cereus* and the patient received a combined antibiotic course with a favorable outcome. The two patients do not seem to have links in anyways and were admitted at the hospital 10 months apart.

These data reveal the capacity of a given *B. cereus* strain to persist in the hospital and to infect several patients over a long period of time (over 2 years) and at different hospital localizations.

Inter hospital contaminations

A case of inter-hospitals contamination was identified within the hospitals (A) and (B). A newborn of hospital (B) (patient 7) had a *B. cereus* strain that presented identical GS3, *panC* III group and very similar M13-9 pattern as a strain isolated the same month from the neonatal hospital environment (environment 1) of hospital (A). As these data may reveal the first inter hospital contamination ever described, we decided to confirm them as well by WGS. The identity between the two strains was confirmed, and the strains showed 0.00% divergence. No direct link has been identified between the patient 7 and hospital (A).

A second case of inter-hospitals contamination was identified within the same hospitals (A) and (B). At hospital (B), a *B. cereus* strain was isolated from three premature newborns (patients 6, 8 and 9) and from an environmental sample (environment 5) during the same month. Surprisingly, a *B. cereus* strain with very similar profile was isolated two months earlier from two newborns (patient 1 and 5) at hospital (A). These data were again confirmed by WGS and the strains showed 0.01% divergence over their genomes.

Patients 1 and 5 from hospital (A) were the first newborns of this series. During the same period, patient 6 was first admitted in hospital (A) and then transferred to hospital (B), located 15 km apart. The identical *B. cereus* strain was then isolated in hospital (B) from patient 6, 8 and 9. Thus, patient 6 was likely contaminated during his stay in hospital (A) and transmitted the strain to other patients in hospital (B).

These situations are the first examples of confirmed inter- hospital cross-contaminations with *B. cereus* strains.

Discussion

B. cereus is notoriously associated with food poisoning and eye infections. However, its appreciation for the multitude of other serious infections such as fulminant sepsis and

devastating central nervous system infections is lacking. At hospital, *B. cereus* is usually regarded as an environmental contaminant. Thus, despite positive blood samples, *B. cereus* is seldom considered as the cause of infection. Consequently, the antibiotic treatment is sometimes inadequate because of the difficulty of clinical and bacteriological diagnosis of *B. cereus* infections [22].

The aim of our study was to gain a better knowledge on the consequences, sources and pathogenic strain patterns in *B. cereus* clinical infections. We analyzed the correlations between epidemiology, clinical, phenotypical and molecular data in order to alert clinicians regarding the emerging threat that represents *B. cereus* in hospital settings.

Among the 39 patients, eight (21%) died following *B. cereus* systemic infections. The number of cases is likely underestimated as clinical laboratories do not necessarily complete species identification considering *Bacillus* species as environmental contaminants.

Consistent with previous findings [20], our study confirms that the majority of patients were premature newborns, followed by elderly people. It is suspected that *B. cereus* from the hospital environment enter the infant bodies due to the presence of indwelling devices such as catheters. However, to our knowledge, no studies could demonstrate so far that the same *B. cereus* strain could be recovered from a patient and its hospital environment. The comprehensive molecular characterization of the strains from our collection allowed identifying several hospital clusters. Identical strains were isolated from different patients and/or environment samples over long periods of time up to two years and from different hospital settings. This clearly suggests that the same *B. cereus* strain is able to persist in the hospital environment despite routine cleaning procedures and may remain a source of infection for inpatients. In addition, we reveal the identification of strain clusters between two hospitals demonstrating the first documented cases of inter-hospital cross-contaminations. It is interesting to note that *B. cereus* does not constitute a clonal population. As an example,

compared to the available reference sequenced genomes Bc407 and ATCC10987, our strains showed 91.56% and 94.87% similarity, respectively. In this situation, our WGS data showing 99.99% and 100% identity between the hospital strains are robust enough to ascertain the strain identities.

In two cases, identical *B. cereus* strains were isolated from two newborns with different pathologies. In both cases, the first infant had a localized colonization and the second had a systemic infection, suggesting that the severity of symptoms probably depends on the site of infection and/or the immune status of the patient.

The genetic features leading to *B. cereus* virulence are mostly unknown. *B. cereus* gastrointestinal pathogenesis are considered to be mainly due to the production of toxins such as Hbl, Nhe, CytK or the cereulide [23-26]. The virulence factors associated with clinical non-gastrointestinal diseases are unknown, although HlyII has been shown to allow *B. cereus* to counteract the host immune system [27-29]. Our genetic characterization allowed clustering the strains into ten different genetic signature (GS) among the 720 possibilities (presence/absence of six genes) showing the low diversity of the clinical and environmental strains studied. 34% of the strains belonged to GS1 where only *nhe* genes were detected. Nevertheless, the production of the Nhe toxin was highly variable and ranged from high to very low, suggesting that other factors may play a role during *B. cereus* non-gastro intestinal infections. Thus, it appears necessary to identify other unknown virulence determinants to get further insights in the pathogenic potential of *B. cereus*.

High production of one toxin Nhe or Hbl was correlated with low production of the other one. Indeed, 54% of the strains were high Nhe producers and low Hbl producers, and only 25% of the strains were high producers of both Nhe and Hbl, suggesting that the two toxins may have redundant functions.

Interestingly, we observed that strains isolated from low age population were in average low toxin-producers. This suggests that newborn may be particularly sensitive to *B. cereus* strains, even those with low toxin production, or that other unknown factors may be responsible for newborn infections.

There is no specific recommendation for the study and interpretation of *B. cereus* antibiotic susceptibility in Europe. The choice of antibiotic is guided by therapeutic considerations and the search for alternatives to the treatments used for prophylaxis. Our data show homogeneity of antibiotic susceptibility pattern in the strain population, which is in favor of empiric therapy as soon as *B. cereus* infection is identified. The data revealed the efficacy of the association of glycopeptide and aminoglycoside or imipenem and ciprofloxacin. On the opposite, due to the natural resistance of *B. cereus* to most beta-lactams [22] and as confirmed by our study, penicillins and third generation cephalosporins are not recommend for treating *B. cereus* infections.

Of interest, patient 18 had three blood samples positive for *B. cereus*. The initial strains were susceptible to rifampicin and the last strain displayed resistance to rifampicin. This case strongly suggests acquired rifampicin resistance over time, and that, similarly to *S. aureus*, rifampicin should be used with caution to treat *B. cereus* infections.

Taken together, such study gathering epidemiological and clinical data together with phenotypic and molecular characterization has, to the best of our knowledge, never been done. This study demonstrates the high persistence capacity of *B. cereus* strains in the hospital environment, leading to the reemergence of strains two years after the first isolation. Strains spread within the same hospital but also between different hospitals. The antibiotic resistance profiles should allow quickly adapting treatment and care of patients. In conclusion, our study highlights that *B. cereus* isolated from clinical sterile body site or from patients especially if

immunosuppressed, should not be systematically disregarded as a contaminant and its clinical significance should be raised. Inadequate attention could delay appropriate therapy and increase the risk of severe infections and poor outcome.

Acknowledgements

We wish to thank Joel Grout, Sylvie Pairaud, Muriel Marault and Sabine Messio for excellent technical assistance. We thank Stéphane Aymerich for his kind support. We thank Pierre Nicolas, Jacques Croizé and Jacqueline Tous for helpful discussion. We are grateful to the INRA MIGALE bioinformatics platform (<http://migale.jouy.inra.fr>) for providing computational resources.

References

1. Auger S, Ramarao N, Faille C, Fouet A, Aymerich S, Gohar M. Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and non pathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *App Environ Microbiol* **2009**; 75: 6616-8.
2. Tran SL, Guillemet E, Gohar M, Lereclus D, Ramarao N. CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation and virulence. *J Bacteriol* **2010**; 192: 2638-42.
3. Glasset B, Herbin S, Guiller L, *et al.* Large-scale survey of *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks: epidemiologic and genetic characterization *EuroSurveillance* **2016**; 21(48).
4. INVS. Collective Food Poisoning INVS **2016**.
5. Veyseyre F, Fourcade C, Lavigne JP, Sotto A. *Bacillus cereus* infection: 57 case patients and a literature review. *Med Mal Infect* **2015**; 45(11-12): 436-40.
6. Ramarao N. *Bacillus cereus*: caractéristiques et pathogénicité. *EMC Biologie Médicale* **2012**; 7: 1-11.
7. Kato K, Matsumura Y, Yamamoto M, *et al.* Erratum to: Seasonal trend and clinical presentation of *Bacillus cereus* bloodstream infection: association with summer and indwelling catheter. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2016**; 35(5): 875-83.
8. Frankard J, Li R, Taccone F, Struelens M, J, Jacobs F, Kentos A. *Bacillus cereus* pneumonia in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2004**; 23: 725-8.
9. Bottone EJ. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev* **2010**; 23(2): 382-98.
10. Gaur AH, Patrick CC, McCullers JA, *et al.* *Bacillus cereus* bacteremia and meningitis in immunocompromised children. *Clinic Infect dis* **2001**; 32: 1456-62.
11. Arnaout M, Tamburro R, Bodner S, Sandlund J, Rivera G, Pui C. *Bacillus cereus* causing fulminant sepsis and hemolysis in two patients with acute leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* **1999**; 21: 431-5.

12. Wright WF. Central Venous Access Device-related *Bacillus cereus* Endocarditis: A Case Report and Review of the Literature. Clin Med Res **2016**.
13. Shah M, Patnaik S, Wongrakpanich S, Alhamshari Y, Alnabelsi T. Infective endocarditis due to *Bacillus cereus* in a pregnant female: A case report and literature review. IDCases **2015**; 2(4): 120-3.
14. Miller JM, Hair JG, Hebert M, Hebert L, Roberts FJ, Weyant RS. Fulminating bacteremia and pneumonia due to *Bacillus cereus*. J Clin Microbiol **1997**; 35(2): 504-7.
15. Hoffmaster A, Rave IJ, Rasko D, Chapman GD CM, Marston CK, De BK, Sacchi CT, Fitzgerald C, Mayer LW, Maiden MC, Priest FG, Barker M, Jiang L, Cer RZ, Rilstone J, Peterson SN, Weyant RS, Galloway DR, Read TD, Popovic T, Fraser CM. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. Proc Natl Acad Sci **2004**; 101: 8449-54.
16. Marston CK, Ibrahim H, Lee P, *et al.* Anthrax Toxin-Expressing *Bacillus cereus* Isolated from an Anthrax-Like Eschar. PLoS ONE **2016**; 11(6): e0156987.
17. Benusic MA, Press NM, Hoang LM, Romney MG. A cluster of *Bacillus cereus* bacteremia cases among injection drug users. Can J Infect Dis Med Microbiol **2015**; 26(2): 103-4.
18. Decousser J, Ramarao N, Duport C, *et al.* *Bacillus cereus* and severe intestinal infections in preterm neonates: putative role of the pooled breast milk. Am Journal of Infection Control **2013**; 41: 918-21.
19. Hilliard NJ, Schelonka RL, Waites KB. *Bacillus cereus* bacteremia in a preterm neonate. J Clin Microbiol **2003**; 41(7): 3441-44.
20. Ramarao N, Belotti L, Deboscker S, *et al.* Two unrelated episodes of *Bacillus cereus* bacteremia in a neonatal intensive care unit. Am J Infect Control **2014**; 42(6): 694-5.
21. Sasahara T, Hayashi S, Morisawa Y, Sakihama T, Yoshimura A, Hirai Y. *Bacillus cereus* bacteremia outbreak due to contaminated hospital linens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **2011**; 30(2): 219-26.
22. Ikeda M, Yagihara Y, Tatsuno K, Okazaki M, Okugawa S, Moriya K. Clinical characteristics and antimicrobial susceptibility of *Bacillus cereus* blood stream infections. Ann Clin Microbiol Antimicrob **2015**; 14: 43.
23. Ramarao N, Sanchis V. The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review. Toxins **2013**; 5: 1119-39.
24. Stenfors Arnesen L, Fagerlund A, Granum P. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol Rev **2008**; 32: 579-606.
25. Guinebretière MH, Broussolle V, Nguyen-The C. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. J Clin Microbiol **2002**; 40(8): 3053-6.
26. Ehling-Schulz M, Guinebretière MH, Monthan A, Berge O, Fricker M, Svensson B. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol Lett **2006**; 260: 232-40.
27. Tran SL, Guillemet E, Ngo-Camus M, *et al.* Hemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages. Cell Microbiol **2011**; 13: 92-108.
28. Tran SL, Puhar A, Ngo-Camus M, Ramarao N. Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin HlyII of *Bacillus cereus*. PLoS ONE **2011**; 6(9): e22876.
29. Guillemet E, Tran S, Cadot C, Rognan D, Lereclus D, Ramarao N. Glucose 6P binds and activates HlyIIR to repress *Bacillus cereus* haemolysin hlyII gene expression. PLoS ONE **2013**; 8: e55085.

Table 1: Epidemiological and clinical data of patients and samplings

Hospitals, n	9
Strains, n	56
Patients, n	39
Environment sample, n	11
Male patients, n (%)	23 (59%)
Immunocompromised, n (%)	23 (59%)
Death, n (%)	8 (21%)
Age, n (%)	
Premature newborn	12 (31%)
Newborn	4 (10%)
1-25	3 (8%)
26-59	9 (23%)
60 +	10 (26%)
Unknown	1 (2%)
Ward, n (%)	
Neonatology	13 (33%)
Intensive care unit	6 (15%)
Medical	5 (13%)
Hematology and Oncology	5 (13%)
Surgery	4 (10%)
Emergency room	2 (5%)
Bacteriology laboratory	2 (5%)
Mortuary	1 (3%)
Unknown	1 (3%)
Environmental sampling, n (%)	
Surface of neonatology ward	6 (55%)
Incubator heater	3 (27%)
Milk on gastric feeding tube	1 (9%)
Catheter for sonogram	1 (9%)

The collection contains 56 strains from nine hospitals, 45 strains isolated from 39 patients and 11 strains collected on surface samples.

Table 2: Characteristics of patients or hospital environment displaying *B. cereus* positive samples

Sampling	Hospital	Date of sampling	Hospital ward	Age of patients	Type of sampling	Symptoms	Antibiotic treatment	Outcomes
Patient 1	Hospital A	28/07/2009	neonatology	Premature newborn	blood culture	meningitis, infection in the liver, both lungs		death
Patient 1	Hospital A	28/07/2009	neonatology	Premature newborn	cerebrospinal fluid	meningitis, infection in the liver, both lungs		death
Patient 2	Hospital A	16/06/2009	neonatology	Premature newborn	blood culture	brain abscess	VAN, CTX	recovery
Patient 3	Hospital A	05/07/2009	neonatology	Premature newborn	blood culture	bacteremia	VAN	recovery
Patient 4	Hospital A	30/06/2009	neonatology	newborn	neonatal gastric liquid	bacteremia	VAN	recovery
Patient 5	Hospital A	21/07/2009	neonatology	newborn	Umbilical	local colonization	CTX, AMX, AMK	recovery
Hospital environment 1	Hospital A	23/07/2009	neonatology		Surface of neonatology ward (Window sill)			
Hospital environment 2	Hospital A	23/07/2009	neonatology		Surface of neonatology ward (Window sill)			
Hospital environment 3	Hospital A	30/07/2009	neonatology		Surface of neonatology ward (Delivery room)			
Hospital environment 4	Hospital A	04/08/2009	neonatology		Surface of neonatology ward (air vent)			
Patient 6	Hospital B	03/09/2009	neonatology	newborn	axilla later feces	skin infection	CRO	recovery
Patient 7	Hospital B	17/09/2009	neonatology	premature newborn	stomach tube feeding	premature birth	CTX, AMK, AMX (3 days)	recovery
Patient 8	Hospital B	20/09/2009	neonatology	premature newborn	gastric acid	neonatal infection	VAN (7days)	recovery
Patient 9	Hospital B	21/09/2009	neonatology	premature newborn	central venous catheter	bacteremia	AMX, AMK (3 days), then VAN (18 days)	recovery
Hospital environment	Hospital B	22/09/2009	neonatology		Surface of neonatology			

5					ward			
Patient 10	Hospital C	02/08/2011	neonatology	premature newborn	blood culture	refractory hypoxemia, chronic bronchial dysplasia, stage-ii intraventricular hemorrhage, sepsis	CTX, VAN, AMK (10 days)	recovery
Patient 11	Hospital C	08/2011	neonatology	premature newborn	blood culture	apnea, bradycardia, and gray complexion. after that, sepsis, organ failure and pulmonary and cerebral abscesses [20]		Death
Hospital environment 6	Hospital D		neonatology		milk on stomach tube feeding			
Patient 12	Hospital D	06/2009	emergency	80	Thoracentesis	pulmonary infection	AMX	
Patient 13	Hospital D	12/2010	neonatology	premature newborn	stomach tube feeding	abdominal distension followed by severe enterocolitis and biological abnormalities [18]	VAN, CTX, MTZ	recovery
Patient 14	Hospital D	12/2010	neonatology	premature newborn	stomach tube feeding	abdominal distension appeared three days after birth associated with radiologic, clinical, and biologic signs of enterocolitis	VAN, CTX, MTZ	recovery
Patient 15	Hospital E	18/09/2011	intensive care unit of Tropical and Infectious Diseases	30	blood culture	endocarditis associated to MSSA in a intravenous drug abuser, and cerebral mycotic aneurysms	GEN, OXA (4 days)	death
Patient 16	Hospital E	02/11/2009	hematology	65	blood culture	sepsis causing death in a very pejorative context (leukocytes 0.3, platelets 20)		death
Patient 17	Hospital E	12/09/2011	nephrology	54	blood culture	sepsis and undernourishment	VAN, CRO, then VAN, CIP (21 days)	recovery
Patient 18	Hospital E	03/03/2010	gastroenterology	63	blood culture	bacteremia and central venous catheter-linked infection	AMX, then CIP (21 days), then GEN (3days), IPM (18days), then CIP, VAN (10	recovery

							days)	
Patient 18	Hospital E	26/03/2010	gastroenterology	63	blood culture	bacteremia and central venous catheter-linked infection	AMX, then CIP (21 days), then GEN (3days), IPM (18days), then CIP, VAN (10 days)	recovery
Patient 18	Hospital E	27/05/2010	gastroenterology	63	blood culture	bacteremia and central venous catheter-linked infection	AMX, then CIP (21 days), then GEN (3days), IPM (18days), then CIP, VAN (10 days)	recovery
Patient 19	Hospital E	01/12/2010	hematology	61	blood culture	sepsis (patient with an acute myeloid leukemia)	PIP, AMK, VAN (7 days), then CIP, GEN	recovery
Patient 19	Hospital E	07/12/2010	hematology	61	blood culture	sepsis (patient with an acute myeloid leukemia)	PIP, AMK, VAN (7 days), then CIP, GEN	recovery
Patient 20	Hospital E	03/06/2008	surgery	34	blood culture	bacteremia (drug addict patient with axillary abscess)		recovery
Patient 21	Hospital E	27/11/2010	neurology	newborn	blood culture	kidneys and urinary infections	CRO, GEN	recovery
Patient 22	Hospital E	15/06/2008	neurology	43	blood culture	bacteremia		recovery
Patient 23	Hospital E	06/10/2009	oncology	66	blood culture	bacteremia (patient with a colorectal cancer)		recovery
Patient 24	Hospital E	24/09/2010	hematology	24	blood culture+ skin infection	sepsis and aplastic anemia caused by drugs	PIP, AMK	recovery
Patient 25	Hospital E	12/08/2009	gynecological surgery	77	blood culture	bacteremia (patient with breast cancer)	CIP	recovery
Patient 26	Hospital E	16/07/2010	cardiac surgery	60	blood culture	sternum abscess, absent fever		Sequela of osteitis
Patient 27	Hospital E	20/06/2008	hematology	40	blood culture	bacteremia (immunocompromised patient)		recovery

Patient 28	Hospital F	07/2011	orthopedic surgery	31	Prosthesis from tibia	no clinical sign of infection	AMX	recovery
Patient 29	Hospital F	10/2011	intensive care unit	76	blood culture	community acquired pneumonia	CTX, SPI then CTX	recovery
Patient 30	Hospital F	09/2012	intensive care unit	46	catheter culture without an blood positive culture	heart failure and multiple infectious episodes	VAN, CLO, GEN then AMX then PIP then IPM then IPM, CAZ, CIP	recovery
Patient 31	Hospital F	09/2012	intensive care unit	48	blood culture	acute respiratory distress syndrome	CRO, GEN then CAZ, then PIP then CAZ, VAN, AMK	recovery
Patient 32	Hospital F	06/2011	intensive care unit	86	blood culture from catheter	heart failure, ventilator-associated pneumonia, ischemic stroke	AMK, IPM then IPM	recovery
Patient 33	Hospital F	10/2011	emergency	24	blood culture	abdominal pain, shivering, vomiting, fever, diarrhea	none	recovery
Patient 34	Hospital F	10/2012	intensive care unit	56	blood culture from catheter	bronchogenic carcinoma, pneumonia	CTX then PIP then AMK, IPM	death
Patient 35	Hospital F	09/2012	gastroenterology	85	Liver abscess	sepsis, hepatitis c and liver abscess, abdominal pain, diarrhea	GEN, CTX, then CTX, CIP, then SXT, OFX, CTX	recovery
Patient 36	Hospital G	09/2013		?	blood culture	nausea, abdominal pain and vomiting		?
Hospital environment 7	Hospital H		clinical laboratory		babies environment			
Hospital environment 8	Hospital H		clinical laboratory		environment of incubator heater			
Hospital environment 9	Hospital H		clinical laboratory		Incubator environment			
Hospital environment 10	Hospital H		clinical laboratory		Catheter for sonogram			
Hospital environment 11	Hospital H		clinical laboratory		Incubator environment			

Patient 37	Hospital H	12/2013	clinical laboratory	Premature newborn	Blood culture from umbilical venous catheter	septic shock, multiple organ failure, pulmonary and cerebral abscesses	VAN	death
Patient 37	Hospital H	12/2013	clinical laboratory	Premature newborn	blood culture from peripheral veins	septic shock, multiple organ failure, pulmonary and cerebral abscesses	VAN	death
Patient 38	Hospital H	12/2013	clinical laboratory	Premature newborn	Bronchial aspiration (lung)	septic shock and pneumonia pulmonary necrotic abscesses, recurrent pneumothorax	VAN	death
Patient 39	Hospital I	2014		?	Biopsy (kidney)	vomiting and diarrhea		death
Patient 39	Hospital I	2014		?	Biopsy (spleen)	vomiting and diarrhea		death

Data included hospital wards, date of sampling, patient age, type of sample, infection sites, clinical data, antibiotic therapy and outcome.

CTX : cefotaxime, VAN : vancomycin ; AMK : amikacin ; AMX : amoxicillin ; MTZ : metronidazole ; OXA : oxacillin ; CRO : ceftriaxone ; CIP : ciprofloxacin ; IPM : imipenem ; PIP : piperacillin ; CAZ : ceftazidime ; CLO : cloxacillin ; SXT : cotrimoxazole ; OFX : ofloxacin ; GEN : gentamicin ; SPI : spiramycin

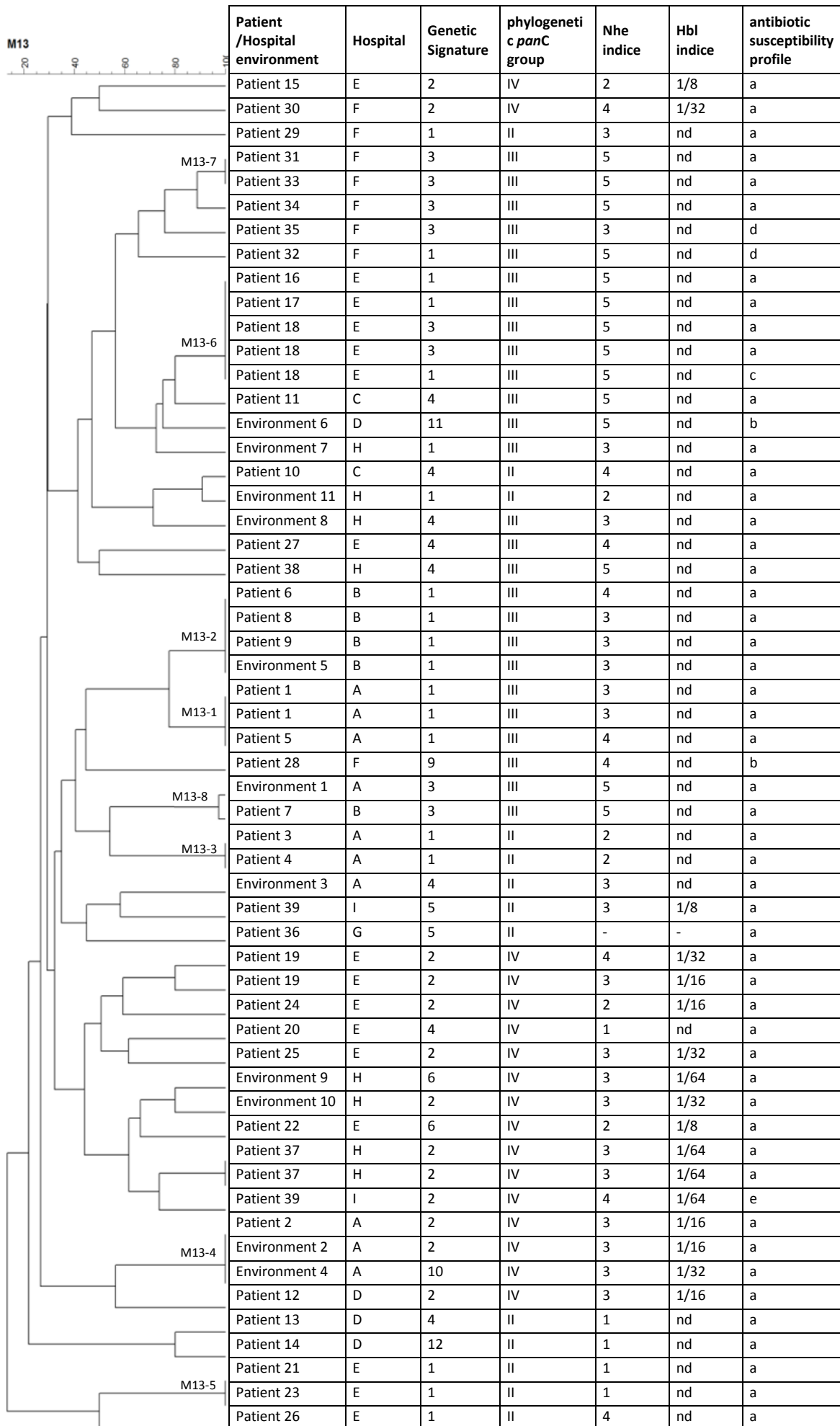


Figure 1: left panel, dendrogram obtained by cluster analysis of M13-PCR fingerprint patterns of the 56 strains. The UPGMA was used to build a dendrogram from a pair wise similarity matrix. Seven clusters were obtained with strains sharing 100% of homology. Right panel, data include for each strain the corresponding patient and hospital, genetic signature, phylogenetic *panC* group, Nhe and Hbl indice, and the antibiotic susceptibility profile.

nd: not detected

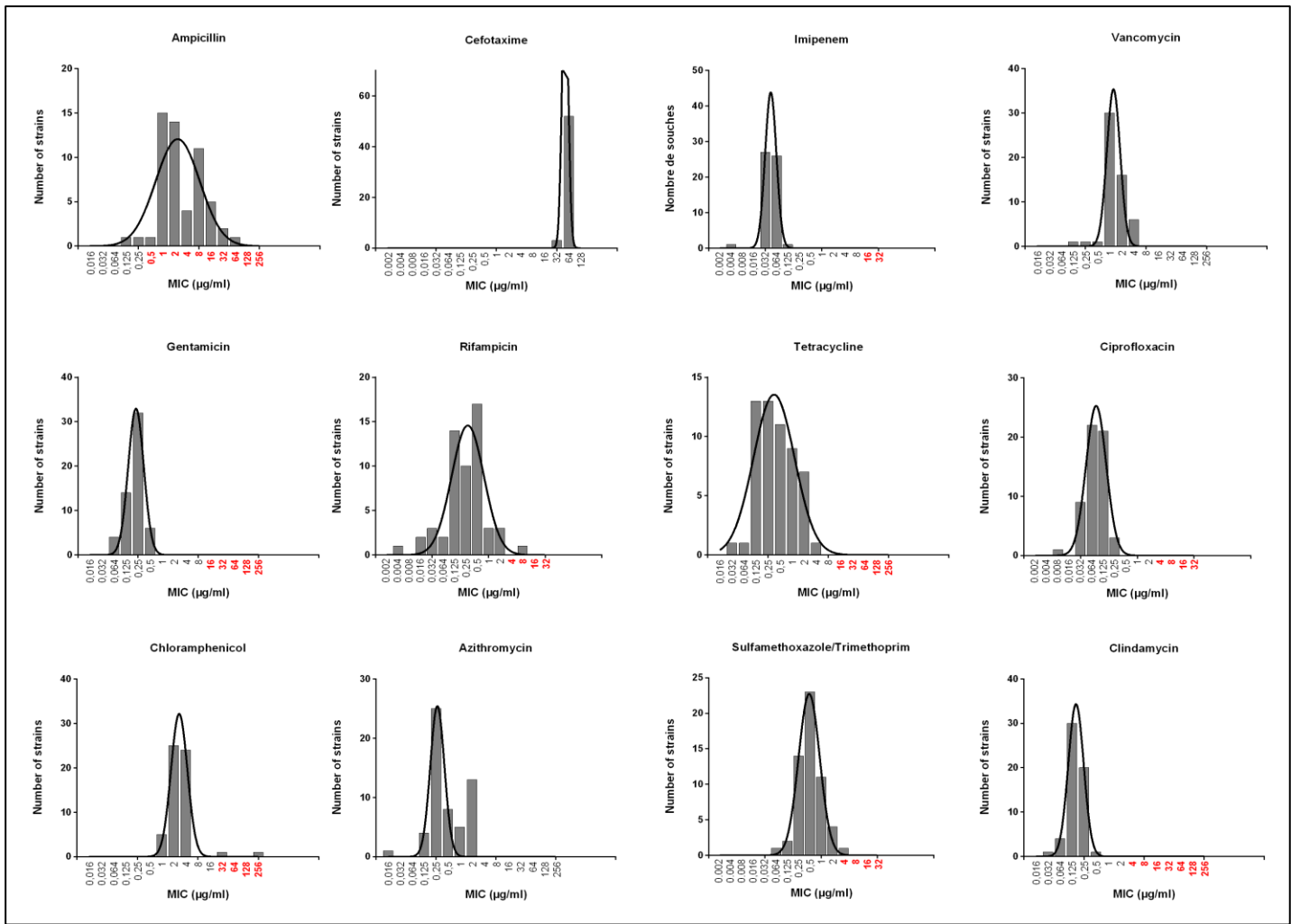


Figure 2: MIC results (Etest method) for the 56 *B. cereus* strains. Black lines: population distribution.

Concentrations indicated in red are classified as clinically resistant.

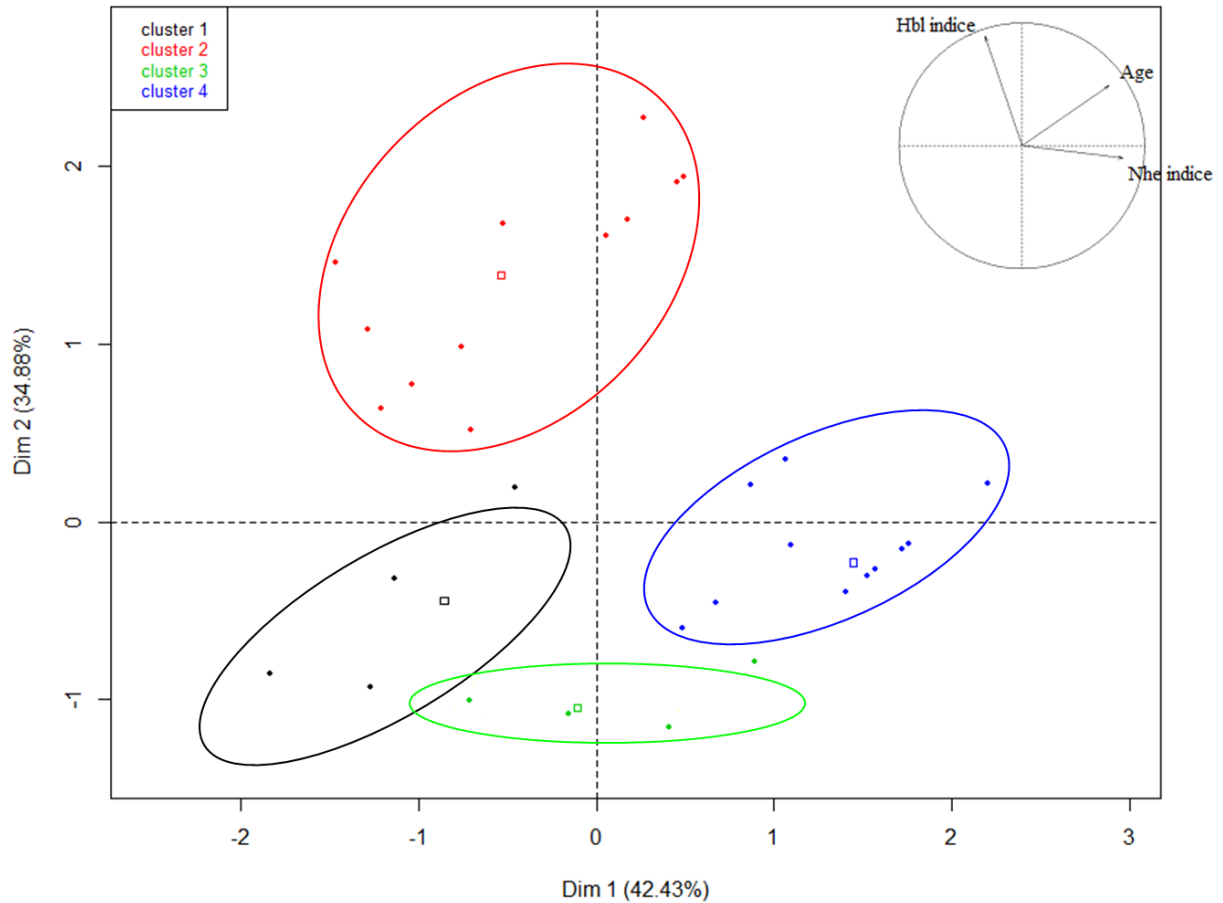


Figure 3: Correlation clusters of the quantitative variables characterizing each *B. cereus* strain isolated from patients. The percentages of variation explained by the principal components (PC1 and PC2) are indicated in brackets. The factors involved in PC1 (Dim1: age of patients and Nhe indice) and PC2 (Dim2: Hbl indice) are indicated in the variable factor map at the top left of the figure. The strains located inside a colored circle belong to the same cluster, as determined by the hierarchical cluster analysis performed after PCA.

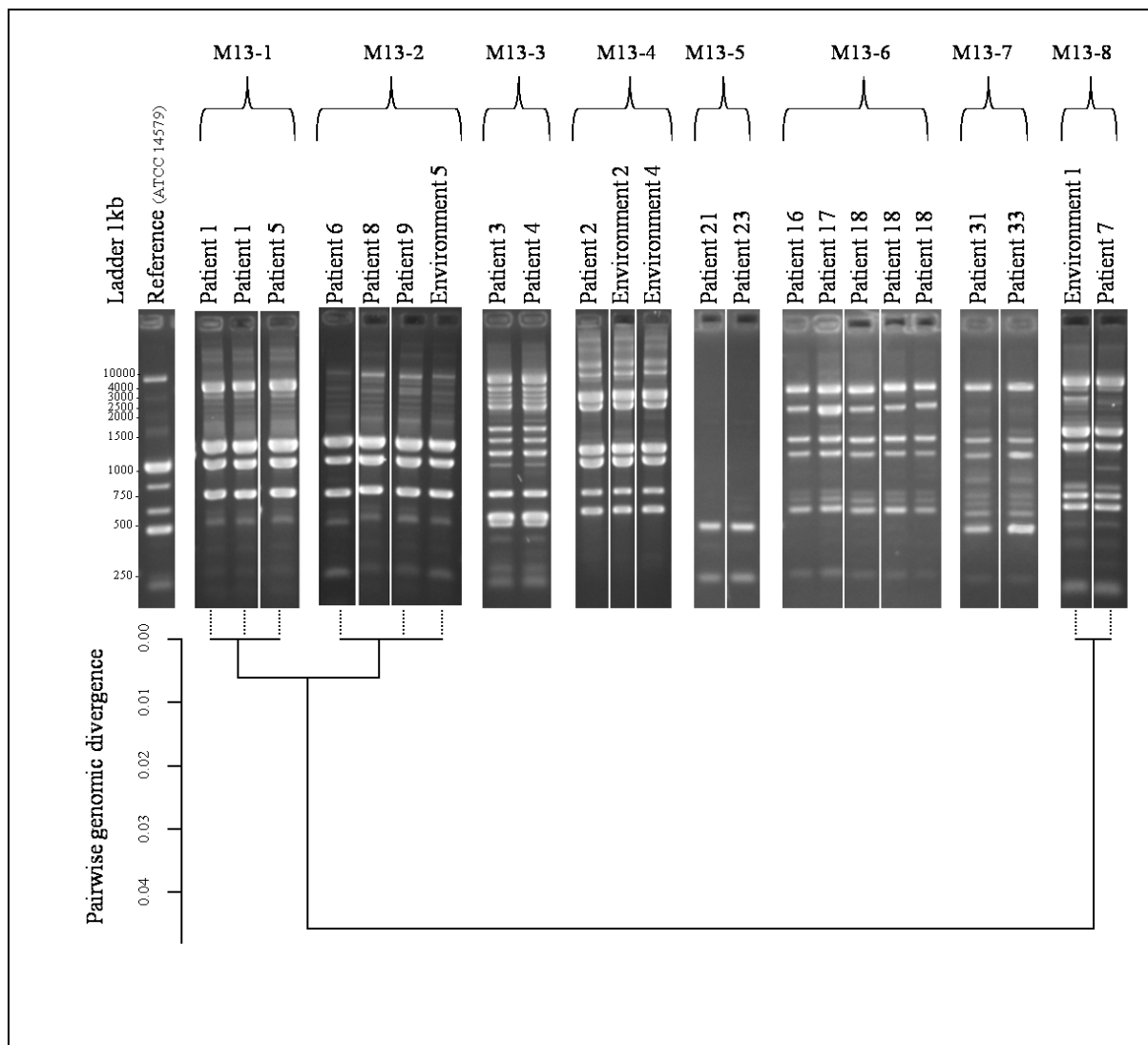


Figure 4: top: M13-PCR fingerprint patterns of *B. cereus* strains showing eight possible cross contaminations between patients/patients or patients/environment. Lane 1: 1kb DNA ladder. Lane 2: reference strain *B. cereus* ATCC14579. Lane 2 to 23: *B. cereus* strains. Bottom: divergence tree between eight samples obtained by hierarchical clustering based on the matrix of pairwise divergences.

Methods

Data collection

Epidemiological and clinical data on *B. cereus* samples isolated from patients were retrospectively collected from French voluntary hospitals between 2008 and 2012. *B. cereus* strains were locally identified by plating on specific agar media and confirmed by using 16S rDNA sequencing. Data

included basic demographic data, hospital wards, type of clinical sample, date of sampling, clinical data, antibiotic therapy and outcome.

In addition, *B. cereus* strains obtained from surface samples around clinical cases were also included in the microbiological analysis.

Biochemical analysis

All strains were tested for their capacity to hydrolyze starch on Plate Count Agar, their hemolytic activity on blood sheep agar plates and their lecithinase activity on Mossel medium as previously described¹⁻³.

Molecular analysis

M13 sequence-based polymerase chain reaction (M13-PCR) is derived from an RAPD technique that allows differentiating between various strain patterns. M13 typing was performed as described⁴. The DNA profiles were analyzed with BioNumerics 7.1 software (Applied Maths).

The toxin gene profiles were identified by assessing the presence of the *cytK-1*, *cytK-2*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hlyII* and *ces* genes by PCR using specific primers⁴. The strains were then clustered into genetic signatures (GS) according to their different combinations of presence/absence of the six virulence genes.

The strains were affiliated to the seven known phylogenetic groups according to the partial sequencing of the *panC* gene⁵.

Genomic divergence estimation

Eight DNA samples were sequenced using Illumina NextSeq500 paired-end 100 bp sequencing technology with 12.5 millions reads per sample. For the purpose of SNP calling, *B. cereus* ATCC 10987 (NC_003909.8) was selected as a reference after computing Average Nucleotide Identity (ANI) (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>) between preliminary de novo assemblies for the eight samples and several complete genomes available in the public databases (~95% ANI between NC_003909.8 and our samples, which is comparable to the divergence between our samples). Sequencing adaptors

were removed from the reads using *Cutadapt* (version 1.8.3; with options *-n 5 -O 3 -m 0* options). Low quality sequence data were trimmed using *Sickle* (<https://github.com/najoshi/sickle>) (*-n -q 20 -l 20*). Read mapping on the reference was performed using *Bwa mem* (<http://bio-bwa.sourceforge.net/bwa.shtml>) (v0.7.12-r1039; default options). Mapping depth excluding multiple mapped reads was extracted using *Samtools* (v1.2) *depth (-Q 1)* and the core genome was defined as positions with mapping depth ≥ 10 in the eight samples (which represented 3463800 bp). Indel and SNP calling was performed using *Samtools mpileup* and *Bcftools call (-vmO v)* and variants with a quality above 250 were selected. Pairwise divergence between samples was calculated as the proportion of variable positions along the core genome. A tree depicting the relationships between our eight samples was obtained by hierarchical clustering based on the matrix of pairwise divergences using R (<http://www.R-project.org/>) function *hclust*.

Toxin production

The production of the enterotoxins Nhe and Hbl was tested with the immunological tests BCET-RPLA Toxin Detection (Oxoïd) and Tecra (BDE VIA, 3M-Tecra) kits, respectively ⁶. The production of Nhe enterotoxin was semi-quantitatively assessed and scored as highly (4-5), or medium/weak producer (2-3) or not detectable (0-1). The production of Hbl enterotoxin was quantitatively assessed and scored according to the dilution showing an activity as highly producer (1/64-1/32-1/16) or medium/weak producer (1/8-1/2).

Antibiotic susceptibility

The Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of selected antimicrobial agents were measured by using concentration gradient strips (Etest®, BioMerieux). Briefly, inoculum was adjusted to 0.5 McFarland before being swabbed on an MH agar plate (Bio-Rad). Incubation was performed at 35°C for 16-18 hours. The following agents were tested: ampicillin[§], cefotaxime, imipenem[§], vancomycin[§], gentamicin[§], rifampicin[§], tetracycline[§], ciprofloxacin[§], chloramphenicol[§], azithromycin, sulfamethoxazole/trimethoprim[§] and clindamycin[§]. Due to scarce availability of interpretative criteria in the literature, clinical breakpoints were used when available ([§]) ⁷.

Molecular typing and statistical analysis

For each strain, all results were entered into a central database using BioNumerics (BN) software. A phylogenetic tree and a dendrogram from pair wise similarity matrixes were build based on *panC* sequence alignments and M13-PCR molecular typing, respectively using UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

Data were analyzed by the FactoMineR package of the R 2.13.0 software (<http://www.agrocampus-ouest.fr/math/>). Principal Component Analysis (PCA) transforms a set of putative correlated variables into new variables, which are mutually orthogonal (uncorrelated) linear combinations of the original variables. These new variables are called principal components (PC). Each PC is defined by the coefficients in the linear combination of the original variables. For PCA, quantitative values were used for toxin production and age of patients. Each patient's isolate was represented by a point whose coordinates corresponded to the scores contributing to the PC. The variable corresponding to the different Genetic Signatures was considered as qualitative variable. A hierarchical clustering was performed on the PC (HCPC function of FactoMineR package), in order to identify subsets of objects that corresponded to clusters having similar characteristics within the whole collection.

Simpson index of discrimination (D) was calculated according to the following equation:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

N represents the total number of strains (N=56) and n_j represents the number of strains belonging to each typing sub-group⁸.

References

- 1 Beecher, D. J. & Wong, A. C. Identification of hemolysin BL-producing *Bacillus cereus* isolates by a discontinuous hemolytic pattern in blood agar. *Appl Environ Microbiol* **60**, 1646-1651 (1994).
- 2 Tran, S. L., Guillemet, E., Gohar, M., Lereclus, D. & Ramarao, N. CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation and virulence. *J Bacteriol* **192**, 2638-2642 (2010).

- 3 Bouillaut, L. *et al.* FlhA influences *Bacillus thuringiensis* PlcR-regulated gene transcription, protein production, and virulence. *Appl Environ Microbiol* **71**, 8903-8910, (2005).
- 4 Gasset, B. *et al.* Large-scale survey of *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks: epidemiologic and genetic characterization *EuroSurveillance* **in press** (2016).
- 5 Guinebretière, M. H. *et al.* Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ Microbiol* **10**, 851-865 (2008).
- 6 Guinebretière, M. H., Broussolle, V. & Nguyen-The, C. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol* **40**, 3053-3056 (2002).
- 7 Wayne. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline. *CLSI 2nd edition*, M45A42E (2010).
- 8 Hunter, P. R. & Gaston, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* **26**, 2465-2466 (1988).

Supplementary 1: Toxin gene profiles called Genetic Signatures (GS)

GS / toxigenic profiles	<i>cytK-2</i>	<i>ces</i>	<i>hlyII</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>
<u>GS1</u>	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<u>GS2</u>	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<u>GS3</u>	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<u>GS4</u>	+	-	-	+	+	+	-	-	-
<u>GS5</u>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<u>GS6</u>	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<u>GS9</u>	+	-	+	+	+	+	-	-	-
<u>GS10</u>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<u>GS11</u>	+	+	-	+	+	+	-	-	-
<u>GS12</u>	-	-	+	+	+	+	-	-	-

The toxin gene profiling was performed according to the presence or absence of six genes associated with *B. cereus* pathogenesis.

Supplementary 2: *In vitro* antibiotic susceptibility profiles

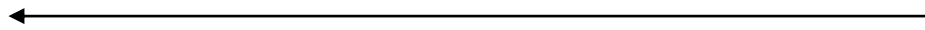
Antibiotic susceptibility profile	Ampicillin	Cefotaxime	Imipenem	Vancomycin	Gentamicin	Rifampicin	Tetracycline	Ciprofloxacin	Chloramphenicol	Azithromycin	Sulfamethoxazole /Trimethoprim	Clindamycin
a	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
b	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
c	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
d	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
e	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S

Five profiles were defined from the 56 *B. cereus* isolated from patients or from hospital environment
S : susceptible R : resistant

Supplementary 3: SNP calling and pairwise divergence between samples

	Patient 1	Patient 1	Patient 5	Patient 6	Patient 9	Hospital environment 5	Patient 7	Hospital environment 1
Patient 1	0	8,66E-07	5,77E-07	6,12E-03	6,13E-03	6,13E-03	4,58E-02	4,58E-02
Patient 1	3	0	2,89E-07	6,11E-03	6,13E-03	6,13E-03	4,58E-02	4,58E-02
Patient 5	2	1	0	6,12E-03	6,13E-03	6,13E-03	4,58E-02	4,58E-02
Patient 6	21182	21181	21182	0	1,39E-05	1,41E-05	4,55E-02	4,55E-02
Patient 9	21222	21219	21220	48	0	2,89E-07	4,55E-02	4,55E-02
Hospital environment 5	21223	21220	21221	49	1	0	4,55E-02	4,55E-02
Patient 7	158558	158557	158558	157572	157606	157605	0	5,77E-06
Hospital environment 1	158565	158564	158565	157572	157606	157605	20	0

Pairwise genomic divergence



SNP calling

3. De la toxicité au transcriptome : une approche combinatoire pour différencier les souches pathogènes et environnementales de *B. cereus*

3.1. Introduction

La virulence des souches de *B. cereus* est très variable et la recherche de nouveaux marqueurs spécifiques des souches dangereuses est un enjeu majeur pour les industries agroalimentaires et les acteurs de santé publique. La recherche de ces marqueurs nécessite d'abord une caractérisation approfondie des souches et l'identification de leurs différences. Cela peut passer par des approches de caractérisation phénotypique et génétique (Kamar *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2005), des tests de toxicité (Jeßberger *et al.*, 2013) et des analyses plus fines de génomique et transcriptomique (den Besten *et al.*, 2009; Jeßberger *et al.*, 2015). Le séquençage de génome complet (WGS) et l'étude des variants nucléotidiques (SNP) ont ainsi permis de mettre en place une reconstruction phylogénétique très précise de la population de *B. anthracis* isolée en France. Cela permet aujourd'hui de déterminer et de tracer très efficacement l'origine géographique d'une souche (Girault *et al.*, 2014). En complément du WGS, le séquençage de l'ARN (RNASeq) est en train de révolutionner l'étude du transcriptome. C'est un outil hautement sensible et précis qui permet de mesurer l'expression des gènes à travers le transcriptome. Il permet d'observer en détail les changements qui se produisent dans la cellule en réponse à des stress, des traitements thérapeutiques ou à différentes conditions environnementales. Le RNASeq permet de détecter des isoformes de transcription, des fusions de gènes, des SNP, l'expression d'un gène spécifique et permet d'obtenir d'autres informations par une approche exploratoire et sans a priori (Conesa *et al.*, 2016). De cette façon, le RNAseq peut être utilisé pour identifier des biomarqueurs spécifiquement exprimés dans le cas de pathologies graves. Ainsi, une étude médicale a permis d'identifier des marqueurs biologiques caractéristiques du carcinome à cellules claires du rein (ccRCC). En plus d'identifier des gènes déjà associés au diagnostic du ccRCC, plusieurs nouveaux biomarqueurs potentiels ont été détectés parmi les gènes qui régulent la croissance cellulaire, le métabolisme et le transport de solutés organiques (Seyednasrollah *et al.*, 2016). Enfin les résultats obtenus par une analyse RNAseq sont très dépendants des conditions de culture dans lesquelles ont été préparés les échantillons (Li *et al.*, 2013). Ce choix doit être guidé par le phénomène biologique à observer.

L'approche basée sur le RNAseq a été choisie pour déterminer les marqueurs permettant de différencier les souches pathogènes et environnementales de *B. cereus*. En effet, par le principe de « top-down », c'est-à-dire en partant du phénotype pathogène par rapport au phénotype environnemental, il serait possible de définir les marqueurs moléculaires spécifiques, exprimés ou surexprimés chez les souches pathogènes.

L'objectif de ce travail a été d'étudier les deux collections de souches de *B. cereus* isolées d'aliments à l'origine de TIAC et isolées de patients atteints d'infections non gastro-intestinales afin de les comparer avec une collection de souches isolées d'aliments n'ayant pas engendré d'infections. Les marqueurs surexprimés ou sous-exprimés dans les différentes populations étudiées seront de bons candidats permettant cette différenciation. Les souches déjà caractérisées par certains aspects phénotypiques et génotypiques ont été étudiées en transcriptomique différentielle (RNAseq). Cette caractérisation a permis de comparer les souches de chaque collection en fonction de i) leur potentiel toxique sur des cellules eucaryotes, ii) par leur signature génétique (GS) et iii) par l'étude différentielle du transcriptome dans une condition de culture définie.

3.2. Matériels et méthodes

3.2.1. Souches bactériennes

J'ai étudié et caractérisé trois populations de souches de *B. cereus* ayant été isolées dans des contextes différents. La première collection se composait de souches isolées des 42 TIAC survenues en France entre 2007 et 2014 et décrites dans l'article 1 de ce manuscrit. Une description plus détaillée des souches est disponible dans l'annexe 1. Les souches de *B. cereus* isolées dans ce contexte ont été sans équivoque à l'origine de foyers de TIAC. La deuxième collection était constituée des 45 souches isolées chez 39 patients, présentée dans l'article 2 et l'annexe 2. La dernière collection était composée de souches isolées d'aliments n'ayant pas engendré d'infection après leur consommation (n=21). Elles ont déjà été décrites dans la littérature et sont caractérisées par des valeurs moyennes faibles de motilité, d'adhésion, de cytotoxicité et de virulence (annexes n°2 et n°3) (Cadot *et al.*, 2010; Guinebretiere *et al.*, 2002; Guinebretière *et al.*, 2008; Kamar *et al.*, 2013). Ainsi, l'étude a porté au total sur un panel de 108 souches représentatives des trois contextes d'isolement différents.

3.2.2. Mesure de la cytotoxicité

L'étude de la cytotoxicité a consisté à évaluer la viabilité cellulaire par la mise en contact de cellules eucaryotes avec des surnageants de cultures bactériennes de *B. cereus*. Les tests ont été réalisés sur les lignées cellulaires HeLa, Raw et Caco-2 qui sont respectivement des cellules épithéliales de l'utérus, des macrophages de souris et des cellules épithéliales de l'intestin. La mise en évidence de la viabilité cellulaire a été réalisée par mesure de l'activité enzymatique par l'utilisation du sel de tétrazolium (MTS : (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)). C'est un composé chimique permettant de quantifier l'activité mitochondriale et donc la viabilité cellulaire. Les surnageants ont été collectés lorsque la culture bactérienne atteignait une densité optique à 600nm comprise entre 1,3 et 1,7. Ces densités optiques correspondent au milieu de la phase

exponentielle de croissance. Les cellules eucaryotes ont été préparées en plaque 96 puits et incubées jusqu'à confluence pour les cellules HeLa et Raw, ou pendant 21 jours pour les cellules Caco-2 afin qu'elles se polarisent. La culture a été faite à 37°C + 5% CO₂ (HeLa : RPMI + 10 % SVF +2% pénicilline/streptavidine, Raw et Caco2 : DMEM + 10 % SVF +2% pénicilline/streptavidine). Les surnageants ont été mis en contact avec les cellules après avoir été dilués au 1/10^{ème} pour les cellules HeLa et Raw, et au 1/5^{ème} pour les cellules Caco-2. Les échantillons ont été incubés 1 h pour les cellules HeLa et Raw, 24 h pour les cellules Caco-2. Ensuite, 20µl de MTS a été ajouté et la lecture de la densité optique a été faite au TECAN à 490nm après 20-60min d'incubation à 37°C + 5% CO₂.

3.2.3. Signature génétique

La présence des dix gènes de virulence potentiels *cytK-1*, *cytK-2*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hlyII* et *ces* a été évaluée par PCR permettant d'attribuer les signatures génétiques (GS) telles que décrites dans l'article 1 et 2 (Glasset *et al.*, 2016). Toutes les souches de *B. cereus* ont été affiliées à un des sept groupes phylogénétiques d'après le séquençage partiel du gène *panC* (Guinebretiere *et al.*, 2002). L'attribution aux groupes phylogénétiques a été réalisée en utilisant l'algorithme disponible en libre accès sur la plateforme informatique de Sym'Previus : <https://www.tools.symprevius.org/Bcereus/english.php>.

3.2.4. Préparation des ARNm

Afin de tester les conditions optimales d'expression, plusieurs conditions de cultures ont été testées pour deux souches de *B. cereus*. Les conditions ont été choisies en fonction de deux paramètres, le niveau d'oxygène et le pH. Deux niveaux d'oxygène ont été choisis, en aérobiose sous agitation qui est la condition standard utilisée en laboratoire pour étudier la production d'entérotoxines de *B. cereus*, et en microaérophilie qui correspond au niveau d'oxygène du tractus gastro-intestinal (He *et al.*, 1999). Deux conditions de pH ont été testées, pH 7 correspondant au pH de l'intestin grêle entre le jéjunum et l'iléon (parties centrales et terminales de l'intestin grêle), et à pH 5 correspondant au pH retrouvé entre l'estomac et le duodénum de l'intestin grêle (Fallingborg, 1999). Les entérotoxines de *B. cereus* peuvent être produites entre pH 5 et 7 (Ceuppens *et al.*, 2012). Pour l'analyse en RNAseq, les souches sélectionnées ont été cultivées uniquement en microaérophilie à pH 7.

Pour chacune des conditions d'aérophilie et de pH, les bactéries ont été cultivées pendant une nuit en BHI (Brain-heart infusion medium) à 30°C. Puis les cultures ont été diluées 1/100^{ème} et mises en culture dans leur condition respective pendant 105 min à 30°C, durée déterminée pour que toutes les souches soient en phase exponentielle de croissance. Les cultures synchronisées ont alors été inoculées à une densité optique égale à 0,02 et incubées dans les mêmes conditions pendant 6 h à 30°C. Les

échantillons ont été centrifugés à 12 000 g pendant 3 min à 4°C et placés immédiatement à -80°C avant de procéder à l'étape d'extraction des ARN. Les culots bactériens ont subi une lyse enzymatique avec 200 µl de Tris à pH 8 et à 10 mM et 4 µl de lysozyme à 50 mg/ml à 37°C. Les ARN ont été extraits avec le kit HPRNA (High Pure RNA Isolation Kit ; Roche) selon les instructions du fabricant. Les traces restantes d'ADN ont été éliminées par deux étapes de traitement à la DNase (kit TURBO-DNase Free; Ambion). L'intégrité des ARN a été déterminée par la valeur du RIN (RNA Integrity Number) (kit RNA 6000 nano ; Agilent) obtenue à l'aide d'une électrophorèse capillaire réalisée avec le Bioanalyser® Agilent 2100 (Agilent). À ce jour, la plupart des études appliquent un seuil de qualité de l'ARN arbitraire, typiquement basée sur le score RIN (Romero *et al.*, 2014). Il faut cependant être uniforme dans les RIN des échantillons pour que les analyses ne soient pas biaisées par la dégradation partielle des ARN d'un des échantillons. J'ai choisi une valeur de RIN>7. Cette valeur correspond à une dégradation d'ARN acceptable pour du séquençage. Les ARNm ont ensuite été purifiés avec le Kit RiboZero (Illumina) selon les instructions du fabricant.

3.2.5. qRT-PCR

L'expression des gènes cibles a été mesurée par qRT-PCR. Les gènes cibles : *cwpFM*, *nheB* et *inhA1* ont été choisis sur la base de plusieurs critères : i) ils sont présents dans le génome de toutes les souches de *B. cereus* séquencées, ii) la régulation de leur expression dépend de mécanismes différents et indépendants et iii) ils jouent un rôle potentiel dans la virulence de *B. cereus* (Guinebretiere *et al.*, 2002 ; Cadot *et al.*, 2010 ; Tran *et al.*, 2010). Le gène contrôle utilisé est *rpoA*, gène codant la sous unité alpha de l'ARN polymérase. Les niveaux d'expression des gènes ont été calculés selon la méthode décrite par Pfaffl en utilisant comme calibrateur l'ADN de la souche à analyser (Pfaffl, 2011) (Figure 7). Le ratio d'expression R correspond au ratio obtenu entre le seuil de détection de fluorescence du gène cible par rapport au seuil de détection du gène de ménage *rpoA*. Procéder ainsi permet d'homogénéiser et de comparer les résultats d'expression entre les différents échantillons, sans remettre en cause les rendements d'extraction. À partir des échantillons d'ARN, les ADNc ont été synthétisés avec le kit Transcriptor First Stand cDNA Synthesis (Roche). La qRT-PCR a été effectuée avec les dilutions au 1/10^{ème} des ADNc et des ADN calibrateurs, en utilisant le kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green (Agilent). Les réactions ont été réalisées dans les thermocycleurs LightCycler 480 (Roche) ou StepOnePlus (Applied Biosystem). La spécificité de chaque réaction d'amplification a été vérifiée avec le profil des courbes de fusion: un seul pic produit par échantillon. Les expériences de qRT-PCR ont été effectuées en triplicats biologiques.

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{Ptarget}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{Pref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

Figure 7 : modèle mathématique pour la quantification relative de la qRT-PCR (Pfaffl, 2011)

R : ratio d'expression

E_{target} : efficacité de l'amorce du gène cible

E_{ref} : Efficacité de l'amorce du gène de référence (RpoA)

ΔC_{Ptarget} control : Cycle seuil de détection de fluorescence de l'ADN calibrateur obtenu par qPCR

ΔC_{Ptarget} sample: Cycle seuil de détection de fluorescence de l'ADNc cible obtenu par qRT-PCR

(Pfaffl, 2001)

3.2.6. RNAseq

Le RNAseq est une analyse qui permet d'étudier le transcriptome d'un organisme en séquençant tous ses ARNm messagers produits à un moment donné dans une condition de culture donnée. Le séquençage des ARNm a été réalisé par l'équipe Imagif de la plateforme I2BC du Centre national de la recherche scientifique (CNRS) de Gif-sur-Yvette. Comme pour la qRT-PCR, le RNAseq nécessite une rétro-transcription de l'ARN en ADNc. Ensuite, le second brin d'ADN est synthétisé avec la ligation des adaptateurs. Le séquençage a été orienté et paillé de 2 x 40 pb avec la technologie Nextseq de Illumina. Un séquençage paillé signifie que les deux brins d'ADN sont séquencés. Le kit scriptseq de Illumina a été utilisé avec les adaptateurs suivant :

- Adaptateur brin 1 : AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC
- Adaptateur brin 2 : AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGTAGA

Ainsi, le brin 1 correspond à la molécule d'ARN, le brin 2 est donc le complément inverse de la molécule d'ARN séquencée (Figure 8).

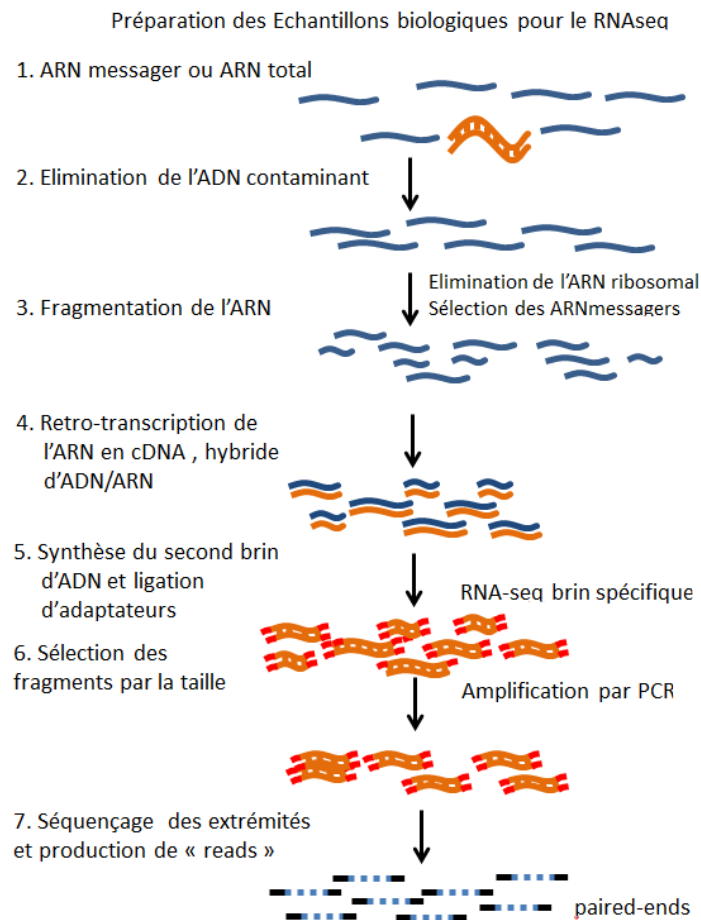


Figure 8 : Schéma de la procédure pour le séquençage des ARNm (adapté de Martin and Wang, 2011)

3.2.7. Analyses bioinformatiques

Les données brutes de séquençage ont été analysées par un ordonnancement de tâches informatiques : cutadapt/sickle/bowtie2/HTSeq-count/edgeR. Cutadapt est un outil qui permet de supprimer la séquence des adaptateurs de chacun des reads obtenus (Martin and Wang, 2011). Sickle rogne les bases nucléotidiques qui possèdent un score de séquençage de mauvaise qualité (observable avec le rapport qualité fastQC) (Del Fabbro *et al.*, 2013). Bowtie2 permet de cartographier les reads obtenus sur un génome de référence (Langmead and Salzberg, 2012). Les génomes des 15 souches de *B. cereus* (Tableau 2) n'ont pas été séquencés et ne sont pas connus. Pour optimiser l'alignement des reads, j'ai construit un multigénome théorique constitué de 91 génomes de référence appartenant au groupe *B. cereus*. L'objectif était de créer une banque de gènes pour couvrir le mieux possible la population de gènes retrouvée dans les espèces du groupe *B. cereus* et ainsi obtenir le meilleur rendement d'alignement possible, ce qui signifie d'avoir le plus de reads possibles alignés et identifiés à l'aide du multigénome. Une fois les gènes alignés, HTSeq-count a été utilisé pour compter les reads exprimés pour chacun des gènes (Anders *et al.*, 2015). Le niveau d'expression de chaque

gène a été normalisé par la méthode des RPKM (RPKM : Read Per Kb per Million reads mapped) et a été exprimé en $\log_2(\text{RPKM})$ (Mortazavi *et al.*, 2008) (Figure 9). Cette normalisation a consisté à prendre en compte la longueur du gène et le nombre de lecture de reads correspondant à ce gène et le nombre total de reads séquencés, puisqu'à un même niveau d'expression, les gènes de grande taille auront plus de reads que les gènes de petite taille. Donc l'expression différentielle aurait pu être biaisée en surévaluant la quantité de transcrits d'un gène de grande taille. La méthode des RPKM a permis d'éliminer ce biais. Enfin, l'outil edgeR fait une estimation de l'expression différentielle entre deux échantillons, ou deux populations d'échantillons en se basant sur un modèle qui utilise la distribution binomiale négative (Seyednasrollah *et al.*, 2013).

$$RPKM = \frac{\text{reads alignés sur gène d'intérêt}}{\text{nombre total de reads alignés} \times \text{longueur du transcrit (kb)}}$$

Figure 9 : équation mathématique du calcul des RPKM

3.3. Résultats et Discussion

3.3.1. Cytotoxicité des souches

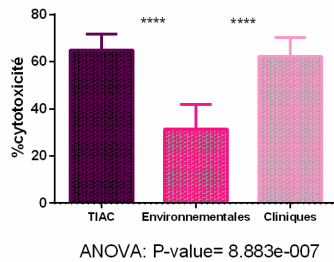
L'activité dégradative des toxines bactériennes sur les cellules eucaryotes de l'hôte est un élément essentiel pour apprécier la virulence des agents pathogènes. Cela permet aux bactéries de gagner et de coloniser des tissus plus profonds. La majorité des toxines de *B. cereus* sont sécrétées dans le milieu extra bactérien. J'ai testé la capacité du surnageant des souches des collections à induire la mort de cellules eucaryotes.

La cytotoxicité des 108 souches, représentant les trois collections, a été testée *in vitro* sur trois lignées cellulaires eucaryotes différentes, HeLa, Raw et Caco-2. Des tests statistiques de type ANOVA et Tukey ont permis de calculer les différences significatives des niveaux de toxicité de chaque collection par rapport à chaque lignée cellulaire (Figure 10). Une différence de toxicité significative a été observée sur les cellules HeLa entre les souches pathogènes (TIAC et cliniques) par rapport aux souches environnementales (pvalue <0.0001). Les tests de toxicité menés sur la ligné cellulaire Raw ont confirmé les résultats observés sur les cellules HeLa (pvalue <0.0001 entre les souches TIAC et environnementales ; pvalue=0.023 entre les souches cliniques et environnementales). Le niveau de toxicité des souches environnementales sur Caco-2 était en moyenne 50% plus élevé que sur les autres lignées cellulaires. Les tests menés sur Caco-2 n'ont pas montré une bonne répétabilité. Une

différence de toxicité significative a tout de même été observée entre les souches TIAC et environnementales (pvalue=0.029).

En conclusion, sur au moins deux lignées cellulaires, la collection de souches environnementales présente *in vitro* une toxicité significativement plus faible que les collections de souches à l'origine d'infections chez l'Homme.

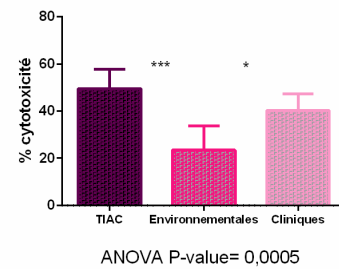
Etude de la cytotoxicité de souches de *B. cereus* sur cellules HeLa



A.

P-value (TIAC / Environnementales)=1.604e-006
P-value (cliniques / Environnementales) =1.088e-005
P-value (TIAC / cliniques) = 0.8711

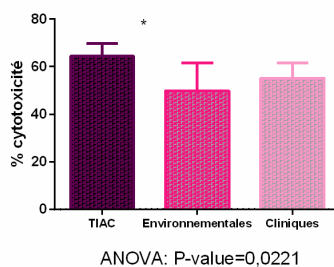
Etude de la cytotoxicité de souches de *B. cereus* sur cellules Raw



B.

P-value (TIAC / Environnementales) = 7.864
P-value (cliniques / Environnementales) = 0.02349
P-value (TIAC / cliniques) = 0.1956

Etude de la cytotoxicité de souches de *B. cereus* sur cellules Caco-2



C.

P-value (TIAC / Environnementales) = 0.02908
P-value (cliniques / Environnementales) = 0.6213
P-value (TIAC / cliniques) = 0.1086

Figure 10 : Résultats de la toxicité des surnageants de culture des souches de *B. cereus* appartenant aux collections « TIAC », « Clinique » et « Environnementale ». Le pourcentage de cytotoxicité correspond au pourcentage de cellules mortes dans l'échantillon par rapport au contrôle. A. : résultats de toxicité des surnageants sur la lignée cellulaire HeLa. B. : résultats de toxicité des surnageants sur la lignée cellulaire Raw. C. : résultats de toxicité des surnageants sur la lignée cellulaire Caco-2.

3.3.2. Présence de gènes de virulence

La présence de dix gènes codant des facteurs présumés de virulence a été recherchée par PCR sur les trois collections de souches et a permis de les classer selon les 12 signatures génétiques (GS) décrites

dans l'article 1. Les GS n'étaient pas distribuées uniformément dans toutes les collections (Tableau 1). Six signatures génétiques (GS1, 3, 6, 7, 9, 11) étaient présentes dans les collections pathogènes (« TIAC » et « Clinique ») et absentes de la collection environnementale. À l'inverse, la signature GS8 était présente dans la collection environnementale et absente des deux collections de souches pathogènes. Cette caractérisation est une première étape de différenciation au niveau génétique.

Quatre signatures étaient présentes dans toutes les collections (GS2, 4, 5 et 12). La classification des souches dans une de ces quatre signatures ne permet donc pas de différencier les souches pathogènes des souches environnementales.

Dans la collection de souches cliniques, la GS1 était la signature génétique la plus fréquemment retrouvée (33,9%). La signature GS2 était la plus représentée dans la collection TIAC (38,1%). Enfin, 52,4% des souches de la collection environnementale étaient caractérisées par la GS8.

Tableau 1 : Distribution des signatures génétiques (GS) au sein des trois collections de souches.

Signatures	% total	TIAC (n=42)	Clinique (n=45)	Environnementales (n=21)
		En %	En %	En %
GS1	21,0	14,3	33,9	-
GS2	26,9	38,1	21,4	19,0
GS3	13,4	19,0	14,3	-
GS4	10,1	4,8	16,1	4,8
GS5	3,4	2,4	3,6	4,8
GS6	3,4	4,8	3,6	-
GS7	3,4	9,5	-	-
GS8	9,2	-	-	52,4
GS9	2,5	4,8	1,8	-
GS10	3,4	-	1,8	14,3
GS11	0,8	-	1,8	-
GS12	2,5	2,4	1,8	4,8

En gras : les signatures communes aux trois collections

3.3.3. Expression des gènes de virulence

- Conditions de croissance bactérienne et identification des conditions d'étude en transcriptomique

Les signatures génétiques ont apporté des indications sur des combinaisons de gènes en fonction de la pathogénie des souches, mais elles n'ont cependant pas permis de différencier toutes les souches à l'origine d'infections et toutes les souches environnementales. Il était donc important de trouver d'autres marqueurs biologiques discriminants. Il m'est apparu qu'une étude plus exhaustive sur l'ensemble du génome pourrait apporter des éléments complémentaires. Par ailleurs, j'ai choisi une approche d'expression des gènes plutôt que l'analyse de leur simple présence dans le génome. Je suis parti de l'hypothèse que les différences entre les souches pathogènes et environnementales pourraient se situer au niveau de l'expression des gènes de virulence, qu'ils soient connus ou non (Fagerlund *et al.*, 2007; Ramarao and Sanchis, 2013).

Dans l'objectif de définir les conditions de culture optimales permettant l'expression des gènes, une étude préliminaire a été menée pour tester les niveaux d'expression de trois gènes de virulence potentiels (*inhA1*, *cwpFM* et *nheB*) dans quatre conditions de cultures différentes. Cette pré-étude a été effectuée sur deux souches portant la même signature génétique GS2 : l'une issue de la collection environnementale, isolée à partir d'un aliment amylacé n'ayant pas engendré d'infection, et l'autre issue de la collection TIAC, isolée d'un plat de crevettes marinées servi en restauration commerciale.

L'expression du gène *cwpFM* a été identique entre les deux souches quelles que soient les conditions de culture. L'expression de *nheB* a été significativement différente entre les deux souches en microaérophilie à pH 5 et 7 et en aérobie à pH 7. L'expression du gène *inhA1* a quant à elle été différente entre les deux souches seulement en condition de microaérophilie à pH 7. En conclusion, mes résultats ont montré une différence significative d'expression pour les gènes *nheB* et *inhA1* (pvalue<0.0001 et pvalue=0.0465) en microaérophilie à pH 7 entre la souche pathogène et la souche environnementale (Figure 11). De façon générale, le gène *nheB* était mille fois plus exprimé à pH 7 qu'à pH 5 quelque soit le niveau d'oxygène.

Bien que cette pré-étude soit limitée car basée uniquement sur deux souches et trois gènes, elle m'a permis de sélectionner les conditions de croissance en microaérophilie à pH 7 et 30°C pour la préparation des échantillons analysés en RNAseq.

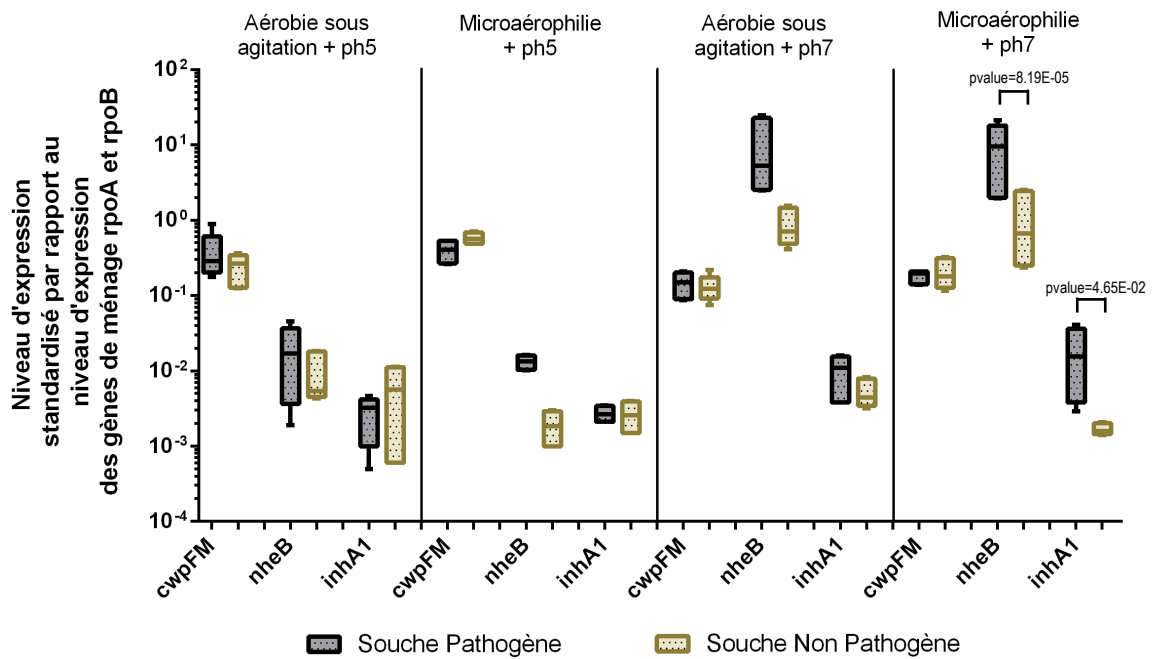


Figure 11 : Résultats de l'expression des gènes *cwpFM*, *nheB* et *inhA1* chez une souche pathogène et une souche environnementale. Ces deux souches sont caractérisées par la signature génétique GS2.

L'expresion de ces gènes a été étudiée dans les conditions de culture de croissance en aérobie en agitation à pH 5 et 7 et en microaérophilie sans agitation à pH 5 et 7.

- Etude du transcriptome par analyse RNAseq

L'étude du transcriptome par RNAseq a été menée sur 15 souches représentatives des trois collections (Tableau 2). Elles ont été sélectionnées sur des critères épidémiologiques (nombre de patients touchés, symptômes, pathologies engendrées) et en fonction de leur signature génétique. Pour chacune des collections, la représentativité des signatures génétiques a été respectée dans le choix des cinq souches sélectionnées par collection.

Tableau 2 : Descriptif des souches représentatives des trois collections sélectionnées pour l'étude par RNAseq.

Choix des souches		Prélèvement	Symptômes (nombre de cas)	GS	indice Nhe	Indice Hbl	groupe panC	toxicité sur cellules Hela	toxicité sur cellules Raw	toxicité sur cellules Caco-2
TIAC	08CEB116BAC	Semoule	Diarrhée (40)	GS1	1	nd	II	7%	8%	24%
	10CEB13BAC	Paella	Diarrhée (27)	GS2	3	1/16	IV	77%	44%	85%
	12CEB01BAC	Compote d'abricot	Vomissement (8)	GS1	5	nd	III	77%	21%	76%
	14SBCL102	Jambon	Diarrhée et vomissement (5)	GS2	4	1/64	IV	89%	86%	64%
	14SBCL369	Soupe de légumes	Diarrhée et vomissement (10)	GS2	3	1/64	IV	76%	84%	82%
Clinique	09CEB13BAC	Hémoculture	Septicémie (1)	GS2	3	1/16	IV	77%	47%	73%
	09CEB14BAC	Hémoculture	Septicémie (1)	GS1	2	nd	II	88%	40%	53%
	09CEB33BAC	Prélèvement cutané	Infection cutanée (1)	GS1	4	nd	III	25%	12%	21%
	12CEB31BAC	Hémoculture	Infection pulmonaire évoluée en septicémie (1)	GS4	5	nd	III	100%	48%	89%
	13CEB06BAC	Hémoculture	Septicémie (1)	GS1	5	nd	III	11%	7%	39%
Environnementales	INRA PF	Poudre de lait	-	GS10	3-4	1/64	III	57%	16%	93%
	I13	Riz cuit	-	GS2	3	1/64	IV	6%	0%	14%
	INRA 5	Purée de zucchini pasteurisée	-	GS8	2	1/4	VI	11%	5%	24%
	INRAC64	Légumes pasteurisés	-	GS8	2-3	1/16	VI	20%	2%	22%
	ADRIA I3	Aliments cuits	-	GS8	2	1	VI	7%	2%	10%

Dans l'analyse des données de séquençage, j'ai réuni les souches des collections TIAC et Clinique que j'ai traitées en tant que population de souches pathogènes. Les données brutes de séquençage ont été traitées par l'ordonnancement de tâches informatiques décrit dans le paragraphe matériel et méthode avec les outils cités (cutadapt/sickle/bowtie2/HTSeq-count/edgeR) (Annexe 6). Ce traitement bioinformatique a permis de créer une table de comptage qui a référencé le niveau d'expression de la totalité des gènes de chaque échantillon. La table de comptage a référencé également les valeurs statistiques du différentiel d'expressions calculé entre les populations de souches pathogènes par rapport aux souches environnementales. Une représentation cartographique (« heatmap ») de la table de comptage (Figure 12) indique les niveaux d'expression des différents groupes de gènes dans les différents échantillons (représentés en colonne). Les gènes ont été regroupés en fonction de leur co-expression dans les différents échantillons. Le niveau d'expression de chaque gène a été normalisé par la méthode des RPKM et exprimé en $\log_2(\text{RPKM})$. La figure 13, représente en deux dimensions la diversité d'expression des échantillons. Les couleurs correspondent aux souches pathogènes en rouge et environnementales en vert : deux échantillons se superposent lorsqu'ils expriment exactement les mêmes gènes et plus deux points sont éloignés, plus les échantillons expriment des gènes différents.

La figure 13 montre une corrélation entre les signatures génétiques et la diversité des gènes exprimés. Dans l'ensemble, les souches environnementales ont exprimé des gènes différents des souches environnementales. Cependant, il n'a pas été démontré de gènes spécifiquement exprimés chez toutes les souches pathogènes par rapport aux souches environnementales. Aussi par l'intermédiaire de cette figure, bien que les souches pathogènes GS2 et la souche environnementale GS2 soient caractérisées par la même signature génétique, il apparaît que ces souches possèdent des gènes différents.

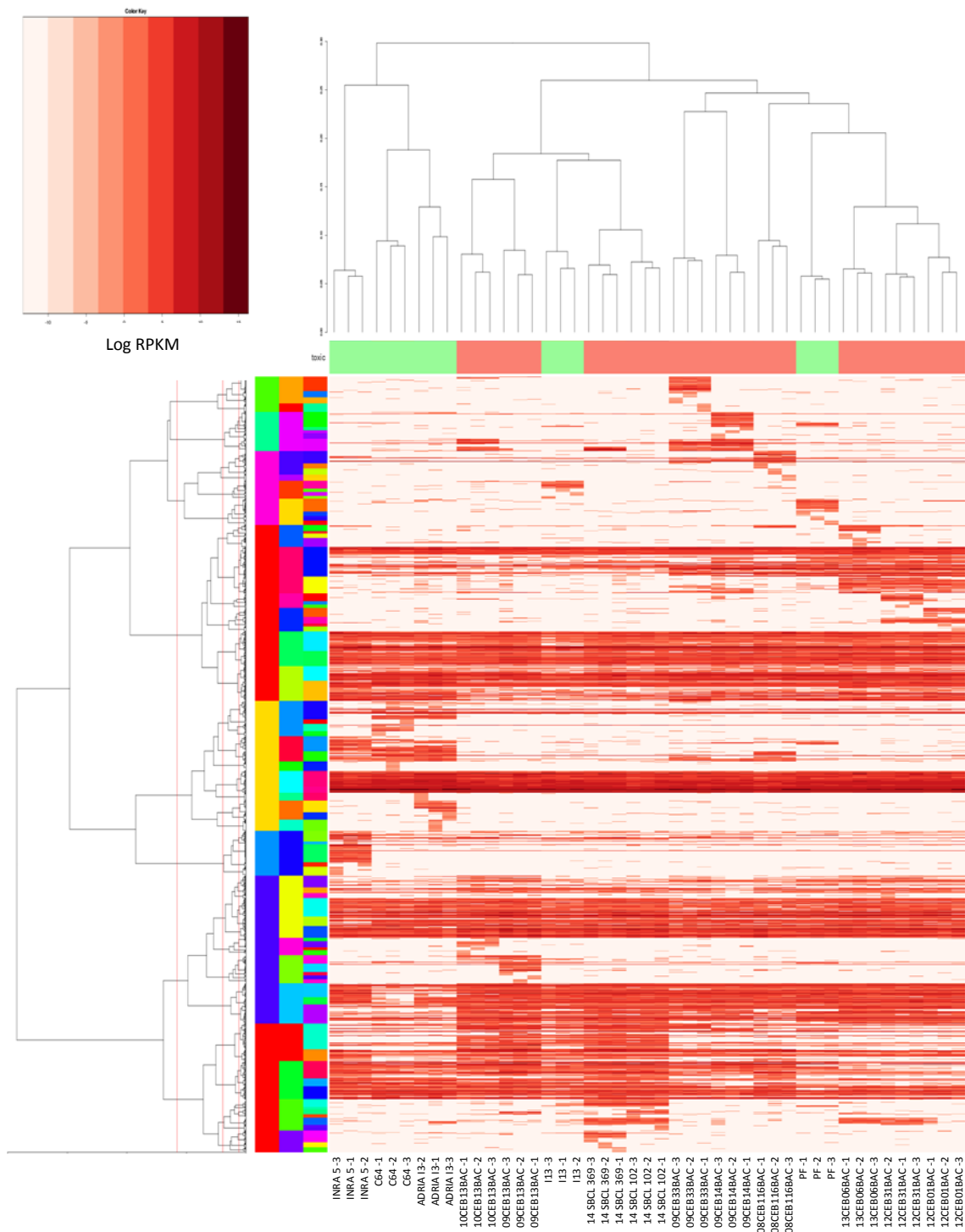


Figure 12 : Représentation cartographique des niveaux d'expression des différents clusters de gènes (lignes) dans les différents échantillons (colonnes). Les gènes sont regroupés en fonction de la corrélation entre leurs niveaux d'expression dans les différents échantillons. Les couleurs des niveaux d'expressions suivent l'échelle en haut à gauche et sont exprimés en $\log_2(\text{RPKM})$ (blanc : non exprimé ; rouge foncée : très fortement exprimé). Dans la classification hiérarchique de gauche, deux niveaux dans l'arbre d'agrégation des gènes ont été définis pour faire deux niveaux de groupes de gènes qui co-expriment entre les échantillons.

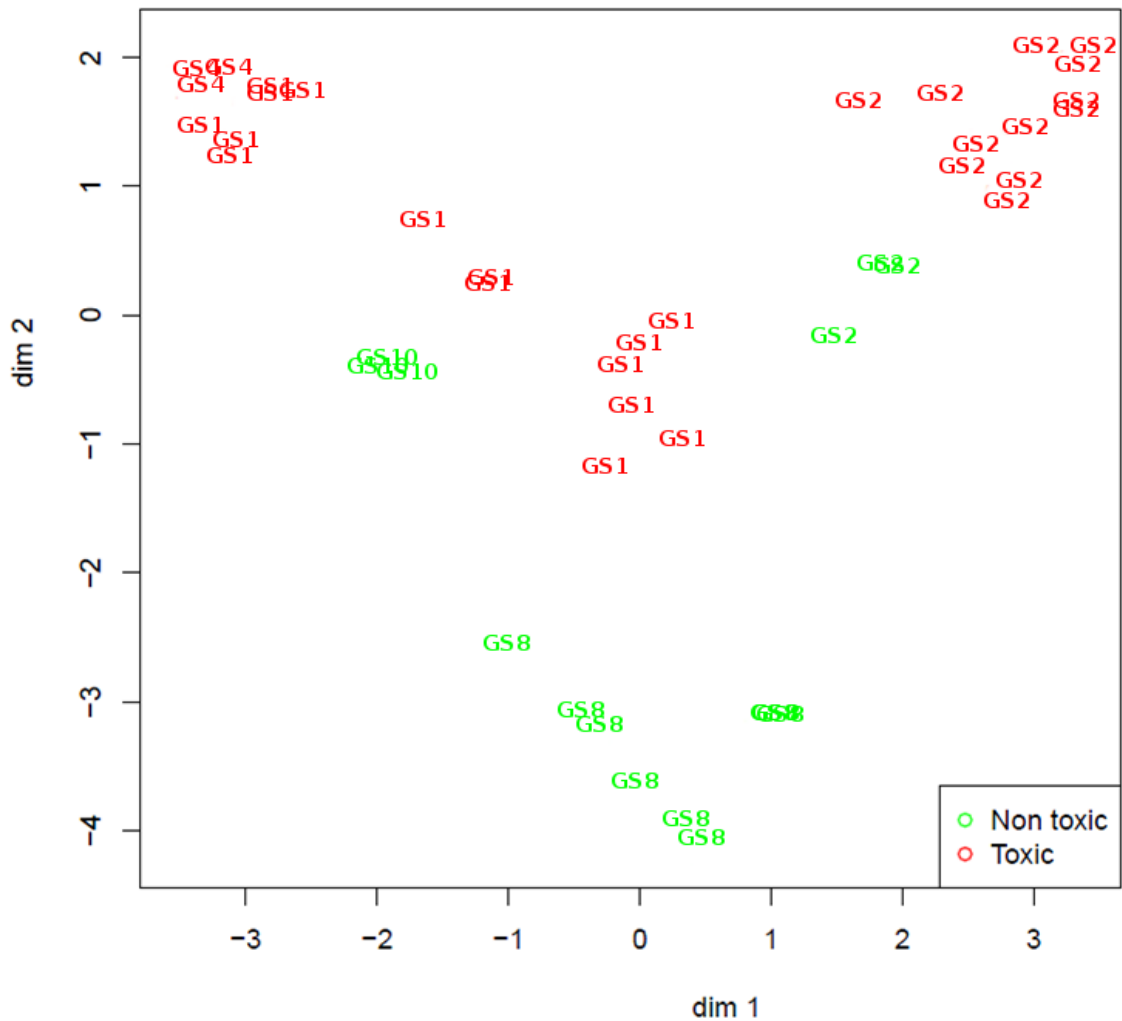


Figure 13 : Représentation en deux dimensions de la diversité d'expression des échantillons. C'est une analyse en composante principale représentant graphiquement les résultats de la table de comptage. Les dimensions 1 et 2 sont les dimensions dans lesquelles les échantillons sont le plus corrélés. Les souches des collections pathogènes (TIAC et Clinique) sont représentées en rouge. Les souches de la collection environnementale sont représentées en vert. Deux échantillons qui se superposent expriment exactement les mêmes gènes.

L'exploitation des résultats par l'étude détaillée de la table de comptage a consisté en trois niveaux d'analyses différents :

- L'analyse (A) des groupes de gènes exclusivement exprimés dans une souche donnée.

- L'analyse (B) des groupes de gènes spécifiquement exprimés dans plusieurs souches du phénotype pathogène (en rouge sur la troisième ligne de la figure 12) ou du phénotype environnemental (en vert sur la troisième ligne de la figure 12).
- L'analyse (C) au sein du « core-transcriptome » (gènes exprimés dans toutes les souches) ceux qui sont surexprimés chez les souches du phénotype pathogène ou environnementales.

L'analyse (A) a permis d'identifier 93 gènes spécifiquement exprimés dans une souche donnée. L'analyse (B) a permis d'identifier 493 gènes spécifiquement exprimés dans plusieurs souches pathogènes mais aucun gène n'a été identifié comme spécifique à toutes les souches pathogènes. Inversement, l'analyse B a permis d'identifier 328 gènes spécifiquement exprimés dans certaines souches environnementales. Mais aucun d'entre eux n'était spécifique aux cinq souches. Enfin l'utilisation du test statistique sur les rangs Mann and Whitney a permis d'identifier dans l'étude C, 187 gènes surexprimés chez les souches pathogènes ou environnementales avec des p-values inférieures à 0.01. Au total, il a été possible d'identifier 1101 gènes candidats dont une étude plus approfondie permettra de définir s'ils sont de bons marqueurs de différenciation. Parmi eux, 36 marqueurs ont été sélectionnés et sont en cours de tests. Neuf des marqueurs correspondent à l'analyse (A), 12 correspondent à l'analyse (B) et 15 correspondent à l'analyse (C). Ce choix a été guidé en priorité par le rôle biologique joué par ces marqueurs (ex : transporteur ABC) bien que 36% (13/36) aient des fonctions inconnues. Pour 14% des marqueurs, il a été attribué un rôle fonctionnel lié à la transcription. Seules 13 des 23 catégories fonctionnelles proposées pour les clusters de groupes orthologues (COG) sont représentées (Figure 14). Utiliser les bases de données COG, générées en comparant les protéines prédites et connues dans tous les génomes complètement séquencés afin d'en déduire des groupes orthologues, permet de faire l'annotation fonctionnelle d'un gène ou d'une protéine en se basant sur un domaine probable conservé d'un ancêtre commun. Il est ainsi possible de prédire le rôle d'une protéine lorsque celle-ci est inconnue dans la bactérie étudiée.

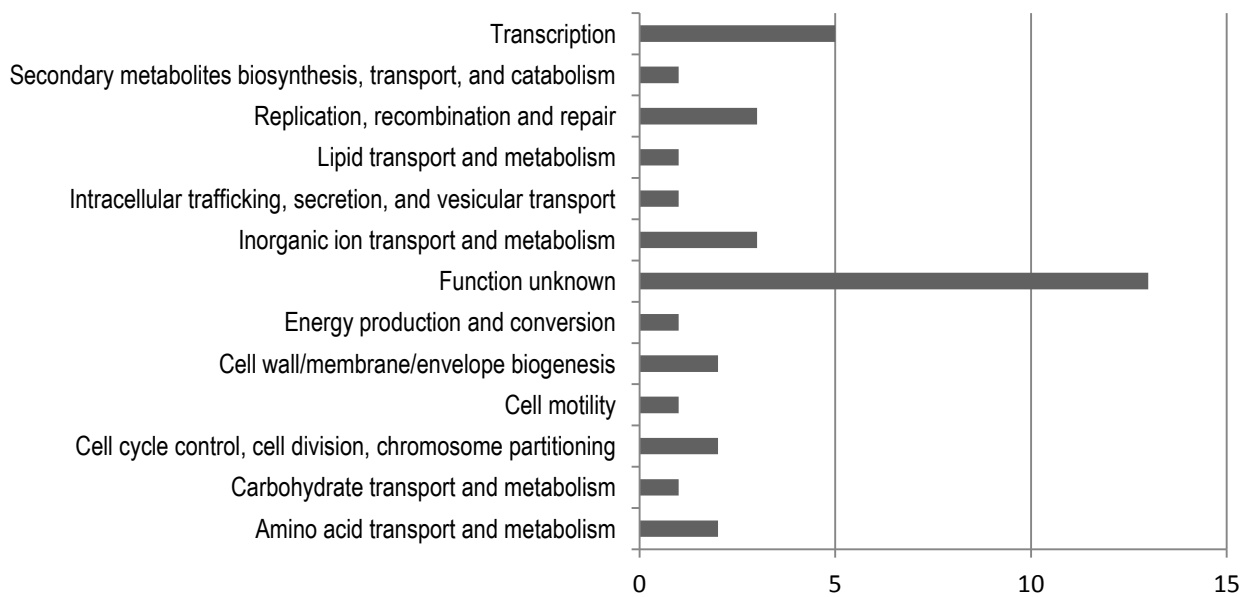


Figure 14 : annotation fonctionnelle des 36 marqueurs sélectionnés

L'ensemble de l'étude transcriptomique a donc permis d'identifier au total 36 marqueurs qui pourraient être de bons candidats pour compléter la caractérisation et la différenciation des souches pathogènes de *B. cereus* et des souches environnementales, par leur présence et/ou leur surexpression.

Discussion et Perspectives

L'émergence de *B. cereus* comme pathogène d'origine alimentaire et comme pathogène opportuniste a intensifié le besoin de distinguer les souches présentant un danger en santé publique. Dans la première partie des travaux de thèse, j'ai étudié les souches de *B. cereus* à l'origine de 140 TIAC survenues en France entre 2007 et 2014. La première étape a consisté à rassembler et analyser les informations collectées lors des investigations de TIAC. Dans 66 TIAC, *B. cereus* et d'autres agents pathogènes comme *Staphylococcus aureus* ou *Clostridium perfringens* ont été isolés dans l'aliment à l'origine de l'infection. Dans ces contextes, les TIAC n'ont pu être attribuées de façon certaine à *B. cereus* puisque l'effet synergique entre les bactéries pathogènes ne peut pas être exclu. Les souches isolées de ces TIAC n'ont donc pas été retenues. Cependant, j'ai identifié 74 TIAC pour lesquelles l'attribution à *B. cereus* est confirmée. Je me suis alors intéressé à la diversité des souches isolées dans chacune des TIAC. L'analyse de typage moléculaire M13-PCR a permis de répondre à cette question en montrant que 42 TIAC avaient été causées par des souches présentant un profil identique. À l'inverse, j'ai identifié une diversité importante des souches de *B. cereus* isolées dans les 32 autres TIAC. Dans ce cas de figure, il a été impossible d'affirmer avec certitude quelle est la souche responsable de l'infection. Dans mes travaux, il a été montré que collecter au moins cinq colonies de *B. cereus* issues du même prélèvement alimentaire serait une solution pour observer la diversité des souches isolées au sein d'une même TIAC. Une action synergique entre les différentes souches ne peut pas non plus être exclue (Doll *et al.*, 2013; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Des actions synergiques entre éléments toxiques extracellulaires ont déjà pu être étudiées, notamment entre la toxine Hbl, la phosphatidylcholine phospholipase C et la sphingomyelinase (Beecher and Wong, 2000b). Mes résultats ont permis d'identifier de façon certaine des *B. cereus* à l'origine d'intoxications alimentaires. Ces souches ont été majoritairement retrouvées dans les végétaux, crus ou cuits, et les féculents. Ces résultats ont validé les données de la littérature au sujet des végétaux cuits de 4^{ème} et 5^{ème} gammes régulièrement contaminés par *B. cereus* (Choma *et al.*, 2000). Les TIAC à *B. cereus* ont été majoritairement rapportées en restauration collective (60% des foyers), et peu dans le contexte familial (9%). Les symptômes étant généralement peu sévères et la rémission de courte durée, les malades ne font pas toujours appel à un médecin. Partant de ce principe, le nombre de TIAC à *B. cereus* dans le cadre familial est probablement largement sous estimé. Proportionnellement, les TIAC survenues dans le cadre familial sont plus souvent causées par des souches productrices de céréulide que les TIAC rapportées dans les autres contextes. Les actions de maitrises non respectées dans le cadre familial, comme un mauvais refroidissement des aliments après leur préparation ou la conservation des plats cuisinés à température ambiante, pourraient être une des causes de la production de céréulide (Agata *et al.*, 2002; InVS, 2014). Aussi, la sévérité des symptômes associés aux souches émétiques pourrait expliquer une déclaration accrue des TIAC liées à ces souches dans le contexte familial.

Dans la littérature, les syndromes émétiques et diarrhéiques de *B. cereus* sont respectivement associés aux souches productrices de céréulide ou aux souches productrices d'entérotoxines (Nhe, Hbl, CytK, etc) (Ceuppens *et al.*, 2013, 2011). Cependant dans mon étude, j'ai montré qu'en corrélant la symptomatologie avec la caractérisation génétique, les souches productrices de céréulide (GS3) ont pu être à l'origine d'un syndrome diarrhéique. Toutes ces souches possèdent le gène codant Nhe et produisent l'entérotoxine en forte quantité dans leur surnageant de culture (Granum and Lund, 1997). Cette donnée expliquerait leur capacité à provoquer des diarrhées profuses sachant que des spores ou des cellules végétatives peuvent être ingérées en même temps que le céréulide. À l'inverse, des souches de *B. cereus* ne possédant pas le gène codant le céréulide ont été isolées à la suite de TIAC ayant provoqué des symptômes émétiques. Cela pourrait suggérer qu'il existe d'autres facteurs contribuant à la virulence chez les *B. cereus* entérotoxiques pouvant provoquer un syndrome émétique. À notre connaissance, il n'existe pas à ce jour de données sur d'autres toxines potentielles chez *B. cereus* pouvant provoquer un syndrome émétique. Le temps d'incubation avant apparition des symptômes a été significativement plus court lors des TIAC associées aux *B. cereus* porteurs du gène *ces*. Ces résultats sont en accord avec la littérature (Ehling-Schulz *et al.*, 2006). Effectivement, cela s'explique par le fait que les bactéries diarrhéiques doivent atteindre l'intestin et produire des entérotoxines pour induire une infection, ce qui n'est pas le cas pour les bactéries qui produisent le céréulide préformé dans les aliments (Ceuppens *et al.*, 2011). Mes résultats ont confirmé qu'il n'existe pas d'effet de la saison sur l'apparition des TIAC à *B. cereus* (InVS, 2016).

Il existe dans la littérature des données sur la dose infectieuse de céréulide nécessaire pour induire une infection et des symptômes (Messelhäuser *et al.*, 2014). Cependant, il n'existe pas de relation dose-réponse à propos du nombre de bactéries nécessaires pour provoquer des syndromes diarrhéiques. La variabilité du potentiel de toxicité entre les souches explique la difficulté de modéliser la relation dose-réponse chez *B. cereus* (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2016). Granum *et al.*, ont montré que des intoxications alimentaires peuvent survenir avec des doses de 10^5 à 10^8 UFC/g ou spores/g d'aliment ingéré (Granum and Lund, 1997). Or mes résultats ont montré que des intoxications pouvaient avoir lieu avec des concentrations inférieures à 10^3 UFC /g d'aliment ingéré. Les souches isolées dans ces situations n'ont pas paru présenter de caractéristiques particulières. Un modèle mathématique basé sur la collecte systématique des données de concentrations de *B. cereus* dans les aliments impliqués dans des TIAC pourrait être mis en place pour évaluer la relation dose-réponse et quantifier l'infectiosité associée à une cellule individuelle (Teunis *et al.*, 2010).

Toutes les souches impliquées dans des TIAC confirmées à *B. cereus* ont été caractérisées par la détection par PCR de dix marqueurs potentiellement impliqués dans la virulence (*cytK-1*, *cytK-2*, *hlyII*, *ces*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblC*, *hblD*, *hblA*) ; à partir de ces données, 12 signatures génétiques (GS) ont

été définies permettant de classer ces souches. La GS1 est la plus représentée avec 21% des souches étudiées. Cette signature génétique est caractéristique des souches possédant uniquement les gènes codant Nhe. Or toutes les souches de *B. cereus* possèdent les gènes de l'opéron *nhe*. De plus, 11% des souches caractérisées par la GS1 n'ont pas produit la toxine *in vitro*. Des analyses doivent être menées pour comprendre ce qui expliquerait la pathogénicité de ces souches. Une étude a montré que la région non codante en amont du promoteur de l'opéron *nhe* possède des régions plus ou moins conservées. Un site de fixation de la protéine régulatrice CodY a ainsi été identifié et des modifications dans sa séquence pourraient expliquer les différences de régulation et d'expression de *nhe* (Böhm *et al.*, 2016). Les GS3 et GS7, caractéristiques des souches codant respectivement le céréulide et la cytotoxine K1, sont connues pour leur potentiel de toxicité et leur virulence sur l'Homme (Dierick *et al.*, 2005; Lund *et al.*, 2000; Mahler *et al.*, 1997). La GS2 a été retrouvée chez 17% des souches mais a été impliquée dans un-tiers des TIAC. Cette signature génétique est caractéristique des souches possédant les gènes codant Nhe, Hbl et CytK-2 et produisent fortement Nhe et Hbl *in vitro*. Une action synergique de ces toxines pourrait expliquer sa forte implication dans les TIAC (Beecher and Wong, 2000b). Des souches possédant la GS8 et appartenant au groupe phylogénétique *panC* VI ont été isolées dans le cadre d'une TIAC. Cette situation est très rare puisque les souches classées dans le groupe *panC* VI sont habituellement des souches très faiblement toxiques avec un faible risque de provoquer des infections gastro-intestinales (Guinebretiere *et al.*, 2010).

De façon générale, l'assignation des souches en fonction de leur signature génétique a permis de montrer la diversité génétique des souches de *B. cereus* qui peuvent être impliquées dans les TIAC. Cependant, cela n'a pas permis de répondre à l'ensemble des questions qui se posent sur les différences de potentiel de toxicité entre les souches, sur l'identification précise de la souche à l'origine de l'intoxication lorsque plusieurs souches différentes sont isolées des aliments à l'origine d'une même TIAC ou sur leur action synergique supposée. Il paraît donc indispensable de rechercher d'autres marqueurs spécifiques de la pathogénicité que ceux identifiés jusqu'à présent.

Dans le deuxième volet de mes travaux de thèse, un travail de caractérisation similaire a été mené sur des souches à l'origine d'infections non-gastro-intestinales survenues en France entre 2008 et 2014 et collectées par l'Inra auprès de neuf hôpitaux. L'objectif a été d'étudier les souches de *B. cereus* impliquées dans des infections locales ou systémiques (septicémies fulminantes, infections dévastatrices du système nerveux central, endocardites, etc) autres que les intoxications alimentaires. Enfin, compte tenu du peu de données sur les limites de sensibilité aux antibiotiques des souches de *B. cereus* et de l'absence de recommandation pour le traitement des patients atteints d'infections à *B. cereus*, j'ai mené des tests de sensibilité aux antibiotiques par mesure de la CMI.

Sur les 39 patients faisant partie de l'étude, huit (21%) sont décédés après avoir développé une infection systémique. La majorité des patients était des nouveaux nés avec un système immunitaire affaibli. Des cas d'infections à *B. cereus* ont déjà été rapportés chez des patients immunodéprimés, en particulier chez les nouveau-nés prématurés (Ramarao *et al.*, 2014). Cela suggère que dans le milieu hospitalier, *B. cereus* pourrait pénétrer dans l'organisme des nourrissons via plusieurs voies d'entrée tels que les cathéters ou les sondes d'intubations. Cependant, à ma connaissance, peu de travaux sont menés sur *B. cereus* pour démontrer l'isolement d'une même souche de *B. cereus* à partir d'un patient et de son environnement hospitalier. La caractérisation moléculaire et le typage moléculaire que j'ai réalisés ont permis de démontrer d'une part i) que des souches de *B. cereus* ayant des profils moléculaires identiques ont pu être isolées chez un patient et dans son environnement hospitalier et d'autre part ii) que des *B. cereus* ayant des profils moléculaires identiques ont pu être isolés chez différents patients au sein du même hôpital et sur des échelles de temps importantes (deux ans). Ces souches ont pu conduire au décès du patient. Cela suggère clairement qu'une souche de *B. cereus* pourrait être capable de persister dans un environnement hospitalier, malgré les procédures de nettoyage et désinfection.

La caractérisation des souches à l'origine d'infections non gastro-intestinales par les signatures génétiques a montré que 10/12 (83,3%) des signatures sont les mêmes que celles retrouvées chez les souches à l'origine de TIAC. Seules les souches caractérisées par la GS8, spécifique des souches environnementales, et GS11 n'ont pas été retrouvées. Aucune corrélation entre les signatures génétiques, la symptomatologie du patient ou le site de l'infection n'a pu être démontrée. Cependant, une corrélation existe entre les faibles niveaux de production de Nhe et Hbl et le jeune âge des patients. Cela suggère que les nouveaux nés seraient sensibles à *B. cereus* même si ces souches ont de faibles capacités de production d'entérotoxines.

L'étude menée sur l'aspect thérapeutique a montré que les traitements antibiotiques empiriques pouvaient varier d'un hôpital à l'autre dû à la rareté des recommandations de la part du CLSI ou de l'EUCAST. Cependant, l'homogénéité de la résistance aux antibiotiques dans les populations de souches testées jusqu'à présent suggère qu'un traitement empirique en cas de suspicion d'infection à *B. cereus* aurait de grande chance de succès thérapeutique. Les résultats *in vitro* obtenus dans mon étude ont montré l'efficacité de l'association des glycopeptides et aminosides pour traiter une infection systémique à *B. cereus*. L'imipénème et la ciprofloxacine sont également recommandés pour traiter les infections à *B. cereus*. Néanmoins, en raison de la résistance naturelle de *B. cereus* aux β -lactamines, le traitement avec les pénicillines ou les céphalosporines de troisième génération ne semblerait pas être recommandé.

À ma connaissance, une telle étude associant les données épidémiologiques, cliniques, phénotypiques et génotypiques sur plusieurs sites hospitaliers n'a jamais été faite. Elle souligne que *B. cereus* ne doit pas être négligé lorsqu'il a été isolé d'un matériel clinique ou chez un patient, en particulier quand celui-ci est immunodéprimé. Une attention insuffisante accordée à cet organisme pourrait retarder la prise d'un traitement antibiotique approprié et risquerait ainsi d'augmenter le développement d'infections graves et la mortalité.

Un autre résultat important ressort de ces deux volets expérimentaux. Effectivement, en compilant les données de la caractérisation phénotypique réalisée sur ces deux collections (TIAC et Clinique), j'ai montré que 22% des souches de *B. cereus* isolées ne sont pas hémolytiques. Ces résultats remettent en question la différenciation de *B. cereus* et de *B. anthracis* sur la base des résultats du test de l'activité hémolytique habituellement mentionnée dans les manuels de bactériologie (Henderson *et al.*, 1994).

Le troisième objectif de ma thèse a été de comparer les souches à l'origine d'infection (TIAC ou clinique) avec des souches environnementales non reliées à des infections. Je les ai comparées sur des aspects phénotypiques, génétiques et de transcriptomique différentielle. Les souches ont été caractérisées par leur toxicité sur trois lignées cellulaires eucaryotes, par les signatures génétiques, par leur capacité à produire Nhe et Hbl, par leur capacité à exprimer des gènes de virulence dans des conditions environnementales différentes et par l'analyse de leur transcriptome dans une condition expérimentale donnée.

Mes travaux ont montré que les souches à l'origine d'infections avaient une activité toxique plus élevée que les souches environnementales. Cependant, j'ai observé une variabilité de la toxicité des souches au sein de chaque collection. J'ai supposé que cette variabilité pouvait être corrélée avec les signatures génétiques et la présence ou l'absence de certains gènes de virulence. Des études précédentes ont montré le rôle joué par Nhe, Hbl et CytK-2 dans la toxicité envers les cellules épithéliales type Caco-2, et HlyII dans la toxicité sur les cellules phagocytaires de type macrophages comme les cellules Raw (Tran *et al.*, 2011). Ces données sont en accord avec mes résultats montrant que les souches caractérisées par les GS5, GS6, GS9 et GS12 possédant le gène codant HlyII sont très toxiques sur les cellules Raw (82% de toxicité moyenne) par rapport aux souches caractérisées par les autres signatures génétiques (31% de toxicité moyenne) (Figure 14). De la même façon, les souches possédant les signatures génétiques dans lesquelles le gène *cytK-2* est présent (GS2, GS4, GS9 et GS11) ont montré un potentiel toxique plus élevé sur les cellules Caco-2 par rapport aux autres souches, soit 73% contre 55%, comme cela a déjà été décrit (Jeßberger *et al.*, 2013). Les souches caractéristiques de la GS8 possédant les gènes codant NheB, NheC, HblA et HblD, appartiennent uniquement à la collection des *B. cereus* environnementaux et sont les moins toxiques sur les trois

lignées cellulaires. Leur moyenne de toxicité est de 13%. En conclusion, la toxicité significativement plus faible de la collection de souches environnementales (Figure 10) est due en grande partie aux souches caractérisées par la GS8. Les souches environnementales caractérisées par les autres signatures génétiques n'ont pas montré de différences de toxicité par rapport aux souches pathogènes partageant ces mêmes signatures génétiques. En perspective, il serait intéressant de tester d'autres lignées cellulaires comme des macrophages humains THP-1 ou des cellules épithéliales productrices de mucus.

Toxicité des surnageants de culture sur chaque lignée cellulaire en fonction des signatures génétiques (GS)

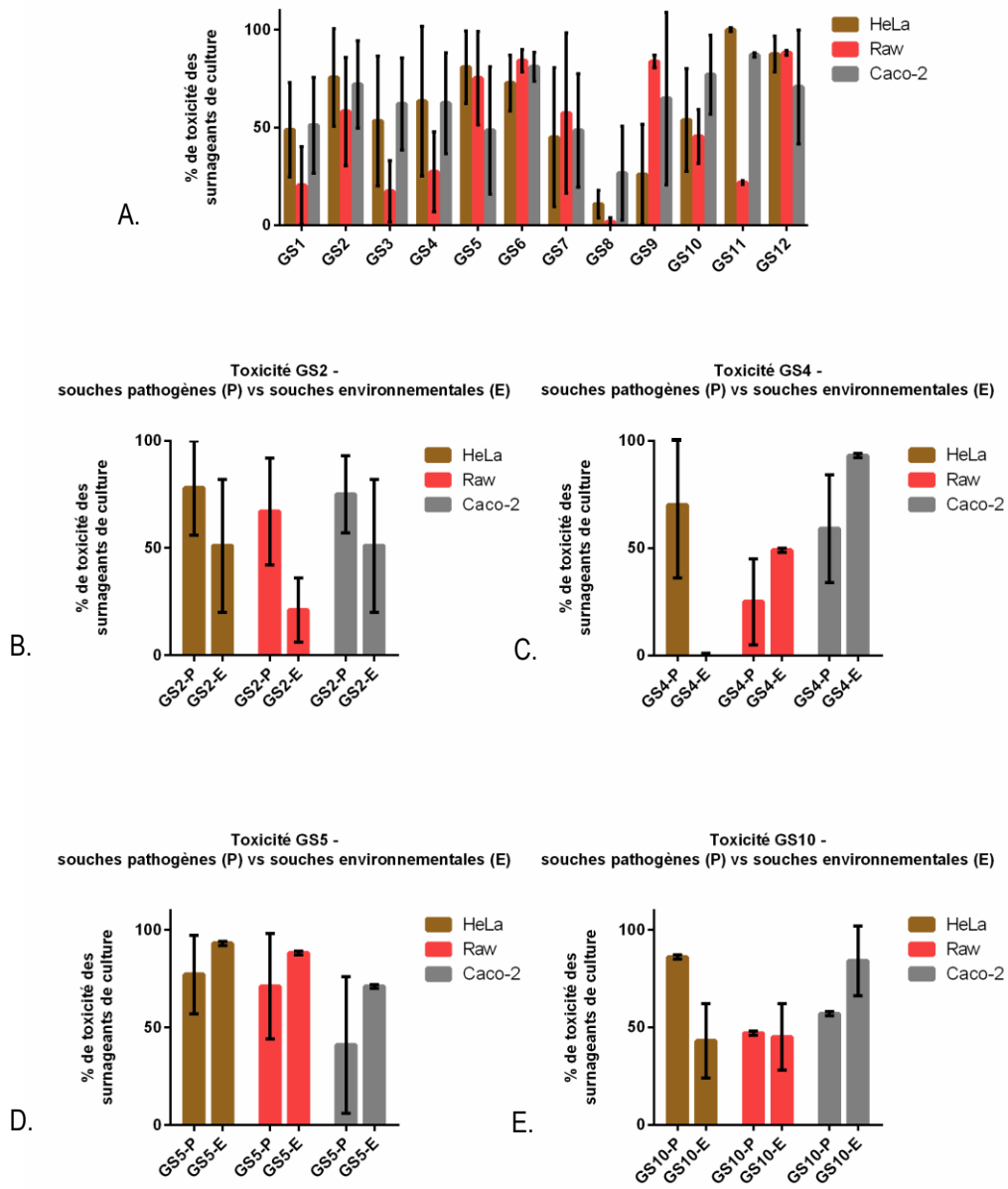


Figure 15 : A : Toxicité des surnageants de culture des souches de *B. cereus* en fonction de la signature génétique et en fonction de la lignée cellulaire. B : Toxicité des surnageants de culture des souches de *B. cereus* caractérisées par la GS2 et en fonction de la collection pathogène (-P) et environnementale (-E), C : Toxicité des surnageants de culture des souches de *B. cereus* caractérisées par la GS4 et en fonction de la collection pathogène (-P) et environnementale (-E). D : Toxicité des surnageants de culture des souches de *B. cereus* caractérisées par la GS5 et en fonction de la collection pathogène (-P) et environnementale (-E). E : Toxicité des surnageants de culture des souches de *B. cereus* caractérisées par la GS10 et en fonction de la collection pathogène (-P) et environnementale (-E). Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type. Chaque échantillon a été testé en triplicat biologique.

Les GS3 et GS7 ont été caractérisées uniquement chez des souches pathogènes par la présence respective des gènes codant le céréulide et la cytotoxine K-1. La signature génétique GS1 est également spécifique des souches pathogènes et caractérisée par la présence du gène codant Nhe. Les souches appartenant à GS1 ont montré des niveaux de toxicité moyens (40% sur les trois lignées cellulaires). Il existe des signatures génétiques partagées par des souches réparties dans les trois collections. Par exemple, la signature GS2 est la signature génétique la plus représentée dans ma population totale, à la fois dans les souches pathogènes et les souches environnementales. La toxicité moyenne des souches GS2 est de 69%. Au sein de la signature GS2, seule la toxicité sur les cellules Raw a montré une différence significative entre les souches pathogènes et environnementales ($pvalue < 0.001$) (Figure 15). Pour toutes les autres signatures génétiques partagées à la fois par des souches pathogènes et environnementales (GS4, GS5, GS10), il n'a pas été possible d'interpréter les résultats de toxicité à cause d'un nombre d'individus trop faible. En conclusion, la caractérisation génétique des souches et l'étude des signatures génétiques pourrait être une analyse de première intention permettant de faire un pré-screening des souches lors d'un événement infectieux. Les souches caractérisées par des signatures génétiques spécifiques associées à la « collection environnementale » ne seraient pas considérées à risque, alors qu'une attention particulière devrait être apportée aux souches caractérisées par des signatures spécifiques associées aux « collections pathogènes ». Des études plus approfondies et complémentaires de toxicité et de transcriptomique devraient être réalisées pour apprécier le potentiel de pathogénicité des souches possédant des signatures génétiques communes aux différentes collections.

C'est dans cette optique que j'ai développé une approche de transcriptomique différentielle afin d'améliorer la caractérisation et la comparaison des souches de *B. cereus*. L'étude a été menée sur cinq souches représentatives issues de chacune des trois collections, soit sur 15 souches au total. Ces souches ont été choisies en fonction des données épidémiologiques et de la caractérisation génétique. La répartition des signatures génétiques au sein des collections a été prise en compte dans la sélection. Dans cette étude, l'analyse du transcriptome est particulière. L'analyse du transcriptome consiste généralement à étudier le comportement d'un mutant par rapport à une souche sauvage en fonction de plusieurs conditions environnementales. Or mon approche a consisté à étudier le transcriptome de deux populations de souches, l'une à l'origine d'infections chez l'Homme et l'autre environnementale. Le but étant de mettre en avant leurs différences d'expression. La principale difficulté méthodologique de cette approche est que les souches sont toutes différentes génétiquement. Il est donc impossible de se baser sur un génome de référence en particulier sans perdre une quantité importante d'information. En collaboration avec les bioinformaticiens de l'équipe Maïage (Inra), nous avons construit un multigénome

pour augmenter les chances de succès. C'est-à-dire que nous avons collecté 91 génomes de référence que nous avons utilisés pour annoter les transcrits séquencés par RNAseq. Avec l'outil Bowtie2, les paramètres du logiciel permettent d'éviter les multi-alignements, c'est-à-dire à éviter qu'un transcrit ne soit compté deux fois lorsqu'il s'aligne sur plusieurs génomes de référence. Procéder ainsi permet d'annoter le plus de transcrit possibles en minimisant les régions inconnues. Par cette méthode, j'ai généré une banque de 14 000 gènes annotés. Parmi ces gènes, 2978 ont été exprimés dans les 15 souches analysées et définissent ainsi les gènes du core-transcriptome. La stratégie ici a été d'identifier ceux qui ont été surexprimés dans les souches pathogènes. J'ai utilisé un test non paramétrique des rangs (Mann & Withney) pour identifier ceux qui présentent ce différentiel d'expression. Cela représente 187 gènes avec un p value <0.01 . En se basant sur les bases de données COG, il serait intéressant d'étudier l'annotation fonctionnelle de ces gènes et identifier quelles sont les voies métaboliques majeures qui sont régulées positivement ou négativement entre les souches pathogènes et environnementales. Cela permettrait d'identifier des mécanismes d'adaptation ou de régulation qui permettent aux souches impliquées dans les TIAC ou des cas cliniques d'être pathogènes. Il serait également intéressant d'étudier les régions promotrices de ces 187 gènes pour comprendre à quels mécanismes de régulation ils sont soumis pour être différentiellement exprimés.

Graphiquement, la représentation cartographique des transcriptomes de nos échantillons (Figure 12) a montré qu'il n'existe pas de groupes de gènes spécifiquement exprimés chez toutes les souches pathogènes ou chez toutes les souches environnementales. Cependant, les gènes exprimés chez les souches pathogènes sont différents des souches environnementales, même lorsque qu'elles partagent la même signature génétique (GS2) (Figure 13). Sur cette figure, plus les échantillons sont éloignés, plus les gènes exprimés sont différents. Malheureusement, aucun gène exprimé n'est spécifique de toutes les souches pathogènes ou de toutes les souches environnementales. L'étude du transcriptome dans son ensemble a montré qu'il existe des différences entre les souches correspondant à la fois à des variations dans la diversité des gènes exprimés mais aussi dans le niveau d'expression des gènes lorsque ceux-ci sont exprimés dans toutes les souches.

L'étude détaillée de la table de comptage des transcrits et l'analyse statistique différentielle ont permis d'identifier 1101 gènes dont une étude approfondie permettra de définir s'ils sont de bons candidats pour différencier les souches, par leur présence, expression ou surexpression. J'ai 36 marqueurs en cours de test répartis dans 13 des 23 classes fonctionnelles (COG), 36% ont une fonction inconnue et 14% ont un rôle fonctionnel lié à la transcription. Une fois validés, ces marqueurs devront être testés sur une collection beaucoup plus large, et notamment les 339 souches représentant la collection initiale de souches isolées de TIAC.

Valorisation

1. Publications

- Glasset B., S. Herbin, L. Guillier, S. Cadel-Six, M.L. Vignaud, J. Grout, S. Pairaud, V. Michel, J.A. Hennekinne, N. Ramarao and A. Brisabois. *Bacillus cereus*-induced foodborne outbreaks, France 2007-2014, epidemiologic and genetic characterization. 2016. *Eurosurveillance*, in press.
- Glasset B., S. Herbin, S. A. Granier, L. Cavalie, E. Lafeuille, J. Robert, R. Ruimy, F. Casagrande-Magne, M. Levast, N. Chautemps, J.W. Decousser, L. Belotti, I. Pelloux, A. Brisabois and N. Ramarao. Epidemiologic and genetic survey on hospital infections caused by *Bacillus cereus*. 2016. Submitted
- Révision de la fiche *Bacillus cereus* de l'ANSES : <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2011sa0116Fi.pdf>

2. Présentations orales

- Glasset B. Identification des facteurs de virulence permettant de caractériser les souches pathogènes de *Bacillus cereus*. Journées des doctorants ANSES. Maisons-Alfort. 2014.
- Glasset B. Caractérisation des dangers et identification des facteurs de virulence de *Bacillus cereus*. Journées des doctorants ANSES. Maisons-Alfort. 2015.
- Glasset B. Characterization of food-borne outbreaks due to *Bacillus cereus* in France during the 2007-2014 period. Doc' MICALIS INRA. Jouy-en-Josas. 2015.
- Glasset B., S. Herbin, L. Guillier, S. Cadel-Six, M.L. Vignaud, J. Grout, S. Pairaud, V. Michel, J.A. Hennekinne, N. Ramarao and A. Brisabois. Characterization of food-borne outbreaks due to *Bacillus cereus* in France during the 2007-2014 period. Congrès BSPIT. Paris. 2015.

3. Présentations affichées

- Glasset B., S. Herbin, L. Guillier, S. Cadel-Six, M.L. Vignaud, J. Grout, S. Pairaud, V. Michel, J.A. Hennekinne, N. Ramarao and A. Brisabois. Characterization of food-borne outbreaks due to *Bacillus cereus* in France during the 2007-2014 period. Congrès SFM. Paris. 2015.
- Glasset B., S. Herbin, L. Guillier, S. Cadel-Six, M.L. Vignaud, J. Grout, S. Pairaud, V. Michel, J.A. Hennekinne, N. Ramarao and A. Brisabois. Characterization of food-borne outbreaks due to *Bacillus cereus* in France during the 2007-2014 period. colloque ECCO XXXIV. Paris. 2015.
- Glasset B., S. Herbin, L. Guillier, S. Cadel-Six, J.A. Hennekinne, N. Ramarao and A. Brisabois. Large-scale Survey of *Bacillus cereus*-induced Food-borne Outbreaks: Epidemiological Data

and Genetic Diversity. Congres IMMEM XI 2016 (International Meeting on Microbial Epidemiological Markers). Estoril, Portugal. 2016

4. Encadrements

- Stagiaire ingénieur, février 2015-juillet 2015 (6 mois) : Caractérisation d'une collection de souches de *Bacillus cereus* issues de TIAC par l'identification de facteurs contribuant à la virulence (Chaima GANDOUZ – école Sup'Biotech). Chayma a travaillé sur le dessin et la validation d'amorces, la mise au point du protocole d'extraction des ARNm et sur les tests d'expression des gènes de virulence en fonction des conditions de cultures.
- Stagiaire DUT, avril 2016-août 2016 (5 mois) : Caractérisation des souches pathogènes de *Bacillus cereus* (Mylène SPERRY - DUT génie biologique option analyses biologiques et biochimiques). Mylène a travaillé sur les tests de cytotoxicité, l'interprétation des données de RNAseq, le dessin et la validation d'amorces et la validation des résultats de RNAseq par des tests de qRT-PCR.

Bibliographie

- 2015 Report of the Committee on Infectious Diseases, 30th ed, 2015. , Red Book. American Academy of Pediatrics.
- Abi Khattar, Z., Rejasse, A., Destoumieux-Garzon, D., Escoubas, J.M., Sanchis, V., Lereclus, D., Givaudan, A., Kallassy, M., Nielsen-Leroux, C., Gaudriault, S., 2009. The *dlt* Operon of *Bacillus cereus* Is Required for Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides and for Virulence in Insects. *J. Bacteriol.* 191, 7063–7073. doi:10.1128/JB.00892-09
- Agaisse, H., Gominet, M., Økstad, O.A., Kolstø, A.-B., Lereclus, D., 1999. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 32, 1043–1053.
- Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I., Isobe, M., 1994. A novel dodecadeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 121, 31–34.
- Agata, N., Ohta, M., Mori, M., Isobe, M., 1995. A novel dodecadeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 129, 17–19.
- Agata, N., Ohta, M., Mori, M., Shibayama, K., 1999. Growth conditions of and emetic toxin production by *Bacillus cereus* in a defined medium with amino acids. *Microbiol. Immunol.* 43, 15–18.
- Agata, N., Ohta, M., Yokoyama, K., 2002. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 23–27.
- Akesson, A., Hedström, S., Ripa, T., 1991. *Bacillus cereus*: a significant pathogen in postoperative and post-traumatic wounds on orthopaedic wards. *Scand. J. Infect. Dis.* 23, 71–77.
- Akiyama, N., Mitani, K., Tanaka, Y., Hanazono, Y., Motoi, N., Zarkovic, M., Tange, T., Hirai, H., Yazaki, Y., 1997. Fulminant septicemic syndrome of *Bacillus cereus* in a leukemic patient. *Intern. Med.* 36, 221–226.
- Alfaro, D., Davis, J., Kim, S., Bia, F., Bogard, J., Briggs, J., Liggett, P., 1996. Experimental *Bacillus cereus* post-traumatic endophthalmitis and treatment with ciprofloxacin. *Br. J. Ophthalmol.* 80, 755–758.
- Ali, S., Zafar, Y., Ali, G.M., Nazir, F., 2010. *Bacillus thuringiensis* and its application in agriculture. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 2022–2031.
- Alonzo, D.A., Magarvey, N.A., Schmeing, T.M., 2015. Characterization of cereulide synthetase, a toxin-producing macromolecular machine. *PLoS One* 10.
- Anders, S., Pyl, P.T., Huber, W., 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166–169.
- Andersson, A., Granum, P.E., Rønner, U., 1998. The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *Int. J. Food Microbiol.* 39, 93–99.
- Andreeva, Z.I., Nesterenko, V.F., Fomkina, M.G., Ternovsky, V.I., Suzina, N.E., Bakulina, A.Y., Solonin, A.S., Sineva, E.V., 2007. The properties of *Bacillus cereus* hemolysin II pores depend on environmental conditions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1768, 253–263.
- Andreeva, Z.I., Nesterenko, V.F., Yurkov, I.S., Budarina, Z.I., Sineva, E.V., Solonin, A.S., 2006. Purification and cytotoxic properties of *Bacillus cereus* hemolysin II. *Protein Expr. Purif.* 47.
- Arnaut, M., Tamburro, R., Bodner, S., Sandlund, J., Rivera, G., Pui, C., Ribeiro, R., 1999. *Bacillus cereus* causing fulminant sepsis and hemolysis in two patients with acute leukemia. *J. Pediatr. Hematol.-Oncol.* 21, 431–435.
- Asano, S.-I., Nukumizu, Y., Bando, H., Iizuka, T., Yamamoto, T., 1997. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1054–1057.
- Ash, C., Farrow, J.A., Dorsch, M., Stackebrandt, E., Collins, M.D., 1991. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 343–346.
- Auger, S., Galleron, N., Bidnenko, E., Ehrlich, S.D., Lapidus, A., Sorokin, A., 2008. The Genetically Remote Pathogenic Strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* Group Is Representative of a Cluster of Thermophilic Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1276–1280.

- Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., Gohar, M., 2009. Biofilm Formation and Cell Surface Properties among Pathogenic and Nonpathogenic Strains of the *Bacillus cereus* Group. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6616–6618.
- Avashia, S.B., Riggins, W.S., Lindley, C., Hoffmaster, A., Drumgoole, R., Nekomoto, T., Jackson, P.J., Hill, K.K., Williams, K., Lehman, L., others, 2007. Fatal pneumonia among metalworkers due to inhalation exposure to *Bacillus cereus* containing *Bacillus anthracis* toxin genes. *Clin. Infect. Dis.* 44, 414–416.
- Awad, M.K., Saadaoui, I., Rouis, S., Tounsi, S., Jaoua, S., 2007. Differentiation between *Bacillus thuringiensis* strains by *gyrB* PCR-Sau3AI fingerprinting. *Mol. Biotechnol.* 35, 171–177.
- Barrie, D., Hoffman, P.N., Wilson, J.A., Kramer, J.M., 1994. Contamination of hospital linen by *Bacillus cereus*. *Epidemiol. Infect.* 113, 297–306.
- Bartoszewicz, M., Bideshi, D.K., Kraszewska, A., Modzelewska, E., Swiecicka, I., 2009. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* display genetic and psychrotrophic properties characteristic of *Bacillus weihenstephanensis*. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1967–1975.
- Beecher, D.J., Macmillan, J.D., 1991. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 59, 1778–1784.
- Beecher, D.J., MacMillan, J.D., 1990. A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 58, 2220–2227.
- Beecher, D.J., Pulido, J.S., Barney, N.P., Wong, A.C., 1995. Extracellular virulence factors in *Bacillus cereus* endophthalmitis: methods and implication of involvement of hemolysin BL. *Infect. Immun.* 63, 632–639.
- Beecher, D.J., Wong, A.C. (Eds.), 2000a. Tripartite haemolysin BL: isolation and characterization of two distinct homologous sets of components from a single *Bacillus cereus* isolate. *Microbiology* 146, 1371–1380.
- Beecher, D.J., Wong, A.C., 2000b. Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *Microbiology* 146, 3033–3039.
- Beecher, D.J., Wong, A.C., 1997. Tripartite Hemolysin BL from *Bacillus cereus* Hemolytic Analysis Of Component Interactions and a Model For Its Characteristic Paradoxical Zone Phenomenon. *J. Biol. Chem.* 272, 233–239.
- Beecher, D.J., Wong, A.C., 1994. Identification of hemolysin BL-producing *Bacillus cereus* isolates by a discontinuous hemolytic pattern in blood agar. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1646–1651.
- Bennett, S.D., Walsh, K.A., Gould, L.H., 2013. Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*--United States, 1998-2008. *Clin. Infect. Dis.* 57, 425–433.
- Bischoff, D.S., Ordal, G.W., 1992. *Bacillus subtilis* chemotaxis: a deviation from the Escherichia coli paradigm. *Mol. Microbiol.* 6, 23–28.
- Bizani, D., Brandelli, A., 2002. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. Strain 8 A. *J. Appl. Microbiol.* 93, 512–519.
- Bizzini, A., Greub, G., 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1614–1619.
- Block, C., Levy, M., Fritz, V., 1978. *Bacillus cereus* endocarditis. A case report. *S. Afr. Med. J.* 53, 556–557.
- Böhm, D., 2012. Comparison of tear protein levels in breast cancer patients and healthy controls using a de novo proteomic approach. *Oncol. Rep.*
- Böhm, M.-E., Krey, V.M., Jeßberger, N., Frenzel, E., Scherer, S., 2016. Comparative Bioinformatics and Experimental Analysis of the Intergenic Regulatory Regions of *Bacillus cereus* *hbl* and *nhe* Enterotoxin Operons and the Impact of CodY on Virulence Heterogeneity. *Front. Microbiol.* 7.
- Bouillaut, L., Perchat, S., Arold, S., Zorrilla, S., Slamti, L., Henry, C., Gohar, M., Declerck, N., Lereclus, D., 2008. Molecular basis for group-specific activation of the virulence regulator PlcR by PapR heptapeptides. *Nucleic Acids Res.* 36, 3791–3801.

- Bouillaut, L., Ramarao, N., Buisson, C., Gilois, N., Gohar, M., Lereclus, D., Nielsen-LeRoux, C., 2005. FlhA Influences *Bacillus thuringiensis* PlcR-Regulated Gene Transcription, Protein Production, and Virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8903–8910.
- Bouza, E., Grant, S., Jordan, C., Yook, R., Sulit, H., 1979. *Bacillus cereus* endogenous panophthalmitis. *J. Am. Med. Assoc.* 97, 498–499.
- Brown, K.L., 2000. Control of bacterial spores. *Br. Med. Bull.* 56, 158–171.
- Bryce, E., Smith, J., Tweeddale, M., Andruschak, B., Maxwell, M., n.d. Dissemination of *Bacillus cereus* in an intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 14, 459–462.
- Byrne, B., Dunne, G., Bolton, D.J., 2006. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. *Food Microbiol.* 23, 803–808. doi:10.1016/j.fm.2006.02.002
- Cadel Six, S., De Buyser, M.-L., Vignaud, M.L., Dao, T.T., Messio, S., Pairaud, S., Hennekinne, J.-A., Pihier, N., Brisabois, A., 2012. Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus* : bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. *Bull Epidemiol Hebd* 45–49.
- Cadot, C., Tran, S.L., Vignaud, M.L., De Buyser, M.L., Kolsto, A.B., Brisabois, A., Nguyen-The, C., Lereclus, D., Guinebretiere, M.H., Ramarao, N., 2010. InhA1, NprA, and HlyII as Candidates for Markers To Differentiate Pathogenic from Nonpathogenic *Bacillus cereus* Strains. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1358–1365.
- Callegan, M.C., Jett, B.D., Hancock, L.E., Gilmore, M.S., 1999. Role of hemolysin BL in the pathogenesis of extraintestinal *Bacillus cereus* infection assessed in an endophthalmitis model. *Infect. Immun.* 67, 3357–3366.
- Callegan, M.C., Ramirez, R., Kane, S., Cochran, D., Jensen, H., 2003. Antibacterial activity of the fourth-generation fluoroquinolones gatifloxacin and moxifloxacin against ocular pathogens. *Adv. Ther.* 20, 246–252.
- Cardazzo, B., Negrisolo, E., Carraro, L., Alberghini, L., Patarnello, T., Giaccone, V., 2008. Multiple-Locus Sequence Typing and Analysis of Toxin Genes in *Bacillus cereus* Food-Borne Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 850–860.
- Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., Salkinojasalonen, M., Svensson, B., Nguyenthe, C., Ehling-Schulz, M., 2006. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 132–138.
- Celandroni, F., Ghelardi, E., Pastore, M., Lupetti, A., Kolstø, A.-B., Senesi, S., 2000. Characterization of the chemotaxis *fliY* and *cheA* genes in *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 190, 247–253.
- 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.
- Ceuppens, S., Rajkovic, A., Hamelink, S., Van de Wiele, T., Boon, N., Uyttendaele, M., 2012. Enterotoxin Production by *Bacillus cereus* Under Gastrointestinal Conditions and Their Immunological Detection by Commercially Available Kits. *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 1130–1136.
- Ceuppens, S., Rajkovic, A., Heyndrickx, M., Tsilia, V., Van De Wiele, T., Boon, N., Uyttendaele, M., 2011. Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Crit. Rev. Microbiol.* 37, 188–213.
- Chan, W.-M., Liu, D.T., Chan, C.K., Chong, K.K., Lam, D.S., 2003. Infective endophthalmitis caused by *Bacillus cereus* after cataract extraction surgery. *Clin. Infect. Dis.* 37, e31–e34.
- Chitlaru, T., Gat, O., Gozlan, Y., Ariel, N., Shafferman, A., 2006. Differential Proteomic Analysis of the *Bacillus anthracis* Secretome: Distinct Plasmid and Chromosome CO₂-Dependent Cross Talk Mechanisms Modulate Extracellular Proteolytic Activities. *J. Bacteriol.* 188, 3551–3571.
- Choma, C., Guinebretiere, M.H., Carlin, F., Schmitt, P., Velge, P., Granum, P.E., Nguyen-The, C., 2000. Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *J. Appl. Microbiol.* 88, 617–625.

- Chung, M.-C., Popova, T.G., Millis, B.A., Mukherjee, D.V., Zhou, W., Liotta, L.A., Petricoin, E.F., Chandhoke, V., Bailey, C., Popov, S.G., 2006. Secreted Neutral Metalloproteases of *Bacillus anthracis* as Candidate Pathogenic Factors. *J. Biol. Chem.* 281, 31408–31418.
- 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.
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szczesniak, M.W., Gaffney, D.J., Elo, L.L., Zhang, X., Mortazavi, A., 2016. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol.* 17.
- Costerton, J., Stewart, P., Greenberg, E., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
- Croxatto, A., Prod'hom, G., Greub, G., 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 380–407.
- DALHAMMAR, G., STEINER, H. akan, 1984. Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *Eur. J. Biochem.* 139, 247–252.
- Daou, N., Buisson, C., Gohar, M., Vidic, J., Bierne, H., Kallassy, M., Lereclus, D., Nielsen-LeRoux, C., 2009. IIsA, A Unique Surface Protein of *Bacillus cereus* Required for Iron Acquisition from Heme, Hemoglobin and Ferritin. *PLoS Pathog.* 5, e1000675.
- Declerck, N., Bouillaut, L., Chaix, D., Rugani, N., Slamti, L., Hoh, F., Lereclus, D., Arold, S.T., 2007. Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 18490–18495.
- Decousser, J.-W., Ramarao, N., Duport, C., Dorval, M., Bourgeois-Nicolaos, N., Guinebretière, M.-H., Razafimahefa, H., Doucet-Populaire, F., 2013. *Bacillus cereus* and severe intestinal infections in preterm neonates: Putative role of pooled breast milk. *Am. J. Infect. Control* 41, 918–921.
- Del Fabbro, C., Scalabrin, S., Morgante, M., Giorgi, F.M., 2013. An Extensive Evaluation of Read Trimming Effects on Illumina NGS Data Analysis. *PLoS ONE* 8, e85024.
- Delbrassinne, L., Botteldoorn, N., Andjelkovic, M., Dierick, K., Denayer, S., 2015. An Emetic *Bacillus cereus* Outbreak in a Kindergarten: Detection and Quantification of Critical Levels of Cereulide Toxin. *Foodborne Pathog. Dis.* 1, 84–87.
- Delmas, G., Gallay, A., Espié, E., Haeghebaert, S., Pihier, N., Weill, F.-X., De Valk, H., Vaillant, V., Désenclos, J.-C., 2006. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *Bull. Epidemiol. Hebd* 51–52.
- den Besten, H.M.W., Mols, M., Moezelaar, R., Zwietering, M.H., Abee, T., 2009. Phenotypic and Transcriptomic Analyses of Mildly and Severely Salt-Stressed *Bacillus cereus* ATCC 14579 Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4111–4119.
- Didelot, X., Urwin, R., Maiden, M.C.J., Falush, D., 2009. Genealogical typing of *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* 155, 3176–3186.
- Dierick, K., Van Coillie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., Hoedemaekers, G., Fourie, L., Heyndrickx, M., Mahillon, J., 2005. Fatal Family Outbreak of *Bacillus cereus*-Associated Food Poisoning. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4277–4279.
- Dixon, T.C., Meselson, M., Guillemin, J., Hanna, P., 1999. Anthrax. *N. Engl. J. Med.* 815–826.
- Doll, V.M., Ehling-Schulz, M., Vogelmann, R., 2013. Concerted Action of Sphingomyelinase and Non-Hemolytic Enterotoxin in Pathogenic *Bacillus cereus*. *PLoS ONE* 8, e61404.
- Drobniowski, F., 2013. *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 324–338.
- Drobniowski, F.A., 1993. *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 324–338.
- Dubois, T., Faegri, K., Perchat, S., Lemy, C., Buisson, C., Nielsen-LeRoux, C., Gohar, M., Jacques, P., Ramarao, N., Kolstø, A.-B., Lereclus, D., 2012. Necrotrophism Is a Quorum-Sensing-Regulated Lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS Pathog.* 8, e1002629.
- 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.

- Duport, C., Zigha, A., Rosenfeld, E., Schmitt, P., 2006. Control of Enterotoxin Gene Expression in *Bacillus cereus* F4430/73 Involves the Redox-Sensitive ResDE Signal Transduction System. *J. Bacteriol.* 188, 6640–6651.
- Edlund, T., Sidén, I., Boman, H.G., 1976. Evidence for two immune inhibitors from *Bacillus thuringiensis* interfering with the humoral defense system of saturniid pupae. *Infect. Immun.* 14, 934–941.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2016. Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp.* including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA J.* 14.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Scherer, S., 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol. Nutr. Food Res.* 48, 479–487.
- Ehling-Schulz, M., Guinebretiere, M.-H., Monthájn, A., Berge, O., Fricker, M., Svensson, B., 2006. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*: Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *B. cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 260, 232–240.
- Ehling-Schulz, M., Vukov, N., Schulz, A., Shaheen, R., Andersson, M., Martlbauer, E., Scherer, S., 2005. Identification and Partial Characterization of the Nonribosomal Peptide Synthetase Gene Responsible for Cereulide Production in Emetic *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 105–113.
- Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J., Spratt, B.G., 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1008–1015.
- Errington, J., 2010. From spores to antibiotics via the cell cycle. *Microbiology* 156, 1–13.
- Errington, J., 1993. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* 57, 1–33.
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014: EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2014. *EFSA J.* 13, 4329.
- Evreux, F., Delaporte, B., Leret, N., Buffet-Janvresse, C., Morel, A., 2007. A case of fatal neonatal *Bacillus cereus* meningitis. *Arch. Pédiatrie* 14, 365–368.
- Eyre, D.W., Cule, M.L., Wilson, D.J., Griffiths, D., Vaughan, A., O'Connor, L., Ip, C.L.C., Golubchik, T., Batty, E.M., Finney, J.M., Wyllie, D.H., Didelot, X., Piazza, P., Bowden, R., Dingle, K.E., Harding, R.M., Crook, D.W., Wilcox, M.H., Peto, T.E.A., Walker, A.S., 2013. Diverse Sources of *C. difficile* Infection Identified on Whole-Genome Sequencing. *N. Engl. J. Med.* 369, 1195–1205.
- Fagerlund, A., 2004. Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology* 150, 2689–2697.
- Fagerlund, A., Brillard, J., Fürst, R., Guinebretière, M.-H., Granum, P., 2007. Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group. *BMC Microbiol.* 7, 43.
- Fagerlund, A., Lindbäck, T., Granum, P.E., 2010. *Bacillus cereus* cytotoxins Hbl, Nhe and CytK are secreted via the Sec translocation pathway. *BMC Microbiol.* 10, 304.
- Fagerlund, A., Lindback, T., Storset, A.K., Granum, P.E., Hardy, S.P., 2008. *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology* 154, 693–704.
- Faille, C., Membré, J.-M., Kubaczka, M., Gavini, F., 2002. Altered ability of *Bacillus cereus* spores to grow under unfavorable conditions (presence of nisin, low temperature, acidic pH, presence of NaCl) following heat treatment during sporulation. *J. Food Prot.* 65, 1930–1936.
- Fallingborg, J., 1999. Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Dan. Med. Bull.* 46, 183–196.
- Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R., Youngman, P., 2000. The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8063–8068.
- Fedhila, S., Daou, N., Lereclus, D., Nielsen-LeRoux, C., 2006. Identification of *Bacillus cereus* internalin and other candidate virulence genes specifically induced during oral infection in insects:

- Bacillus cereus* internalin. Mol. Microbiol. 62, 339–355. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05362.x
- Fiedoruk, K., Daniluk, T., Fiodor, A., Drewicka, E., Buczynska, K., Leszczynska, K., Bideshi, D.K., Swiecicka, I., 2016. MALDI-TOF MS portrait of emetic and non-emetic *Bacillus cereus* group members. Electrophoresis.
- Frenzel, E., Kranzler, M., Stark, T.D., Hofmann, T., Ehling-Schulz, M., 2015. The Endospore-Forming Pathogen *Bacillus cereus* Exploits a Small Colony Variant-Based Diversification Strategy in Response to Aminoglycoside Exposure. mBio 6, e01172-15.
- Fujinami, Y., Kikkawa, H.S., Kurosaki, Y., Sakurada, K., Yoshino, M., Yasuda, J., 2011. Rapid discrimination of Legionella by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Microbiol. Res. 166, 77–86.
- Fujita, M., Gonzalez-Pastor, J.E., Losick, R., 2005. High- and Low-Threshold Genes in the Spo0A Regulon of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 187, 1357–1368.
- Funada, H., Uotani, C., Machi, T., Matsuda, T., Nonomura, A., 1988. *Bacillus cereus* bacteremia in an adult with acute leukemia. Jpn. J. Clin. Oncol. 18, 69–74.
- Galperin, M.Y., Mekhedov, S.L., Puigbo, P., Smirnov, S., Wolf, Y.I., Rigden, D.J., 2012. Genomic determinants of sporulation in *Bacilli* and *Clostridia* : towards the minimal set of sporulation-specific genes: Distribution of sporulation genes in *Bacilli* and *Clostridia*. Environ. Microbiol. 14, 2870–2890.
- Gaur, A.H., Patrick, C.C., McCullers, J.A., Flynn, P.M., Pearson, T.A., Razzouk, B.I., Thompson, S.J., Shenep, J.L., 2001. *Bacillus cereus* bacteremia and meningitis in immunocompromised children. Clin. Infect. Dis. 32, 1456–1462.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Barsotti, C., Baggiani, A., Senesi, S., 2002. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. FEMS Microbiol. Lett. 208, 129–134.
- Gilber, R., Kramer, J., 1986. *Bacillus cereus* food poisoning. Progress in Food Safety (Proceedings of Symposium). Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, pp. 85–93.
- Gilmore, M.S., Cruz-Rodz, A.L., Leimeister-Wächter, M., Kreft, J., Goebel, W., 1989. A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage. J. Bacteriol. 171, 744–753.
- Gilois, N., Ramarao, N., Bouillaut, L., Perchat, S., Aymerich, S., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., Gohar, M., 2007. Growth-related variations in the *Bacillus cereus* secretome. Proteomics 7, 1719–1728.
- Girault, G., Blouin, Y., Vergnaud, G., Derzelle, S., 2014. High-throughput sequencing of *Bacillus anthracis* in France: investigating genome diversity and population structure using whole-genome SNP discovery. BMC Genomics 15, 1.
- Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnum, S., Okstad, O.A., Gominet, M., Kolsto, A.-B., Lereclus, D., 2008. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. PLoS One 3, e2793.
- Gohar, M., Økstad, O.A., Gilois, N., Sanchis, V., Kolstø, A.-B., Lereclus, D., 2002. Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. Proteomics 2, 784–791.
- Goossens, P.L., 2009. Animal models of human anthrax: The Quest for the Holy Grail. Mol. Aspects Med. 30, 467–480.
- Granum, P.E., Andersson, A., Gayther, C., Te Giffel, M., Larsen, H., Lund, T., O’Sullivan, K., 1996. Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. 141, 145–149.
- Granum, P.E., Lund, T., 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol. Lett. 157, 223–228.
- Granum, P.E., O’Sullivan, K., Lund, T., 1999. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. 177, 225–229.

- Grau, R.R., de Oña, P., Kunert, M., Leñini, C., Gallegos-Monterrosa, R., Mhatre, E., Vileta, D., Donato, V., Hölscher, T., Boland, W., Kuipers, O.P., Kovács, Á.T., 2015. A Duo of Potassium-Responsive Histidine Kinases Govern the Multicellular Destiny of *Bacillus subtilis*. *mBio* 6, e00581-15.
- Grossniklaus, H., Bruner, W., Frank, K., Purnell, E., 1985. *Bacillus cereus* panophthalmitis appearing as acute glaucoma in a drug addict. *Am. J. Ophthalmol.* 100, 334–335.
- Guidi-Rontani, C., Weber-Levy, M., Labruyère, E., Mock, M., 1999. Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. *Mol. Microbiol.* 31, 9–17.
- Guillemet, E., Cadot, C., Tran, S.-L., Guinebretiere, M.-H., Lereclus, D., Ramarao, N., 2010. The InhA Metalloproteases of *Bacillus cereus* Contribute Concomitantly to Virulence. *J. Bacteriol.* 192, 286–294.
- Guillemet, E., Tran, S.-L., Cadot, C., Rognan, D., Lereclus, D., Ramarao, N., 2013. Glucose 6P Binds and Activates HlyIIIR to Repress *Bacillus cereus* Haemolysin *hlyII* Gene Expression. *PLoS ONE* 8, e55085.
- 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. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 31–40.
- Guinebretiere, M.-H., Broussolle, V., Nguyen-The, C., 2002. Enterotoxigenic Profiles of Food-Poisoning and Food-Borne *Bacillus cereus* Strains. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3053–3056.
- Guinebretiere, M.-H., Fagerlund, A., Granum, P.E., Nguyen-The, C., 2006. Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system. *FEMS Microbiol. Lett.* 259, 74–80.
- Guinebretiere, M.-H., Nguyen-The, C., 2003. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 207–215.
- Guinebretière, 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., Velge, P., Couvert, O., Carlin, F., Debuyser, M.-L., Nguyen-The, C., 2010. Ability of *Bacillus cereus* Group Strains To Cause Food Poisoning Varies According to Phylogenetic Affiliation (Groups I to VII) Rather than Species Affiliation. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3388–3391.
- Haase, J.K., Didelot, X., Lecuit, M., Korkeala, H., L. monocytogenes MLST Study Group, Achtman, M., 2014. The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale Multilocus Sequence Typing study: MLST of *L. monocytogenes*. *Environ. Microbiol.* 16, 405–416.
- Haeghebaert, S., Le Querrec, F., Bouvet, P., Gallay, A., Espié, E., Vaillant, V., 2002. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. *Bull. Epidémiologique Hebdomadaire* 249.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell. Microbiol.* 11, 1034–1043.
- Hansen, B.M., Hendriksen, N.B., 2001. Detection of Enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains by PCR Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 185–189.
- Hantke, K., 2001. Bacterial zinc transporters and regulators. *BioMetals* 14, 239–249.
- Hardy, S.P., Lund, T., Granum, P.E., 2001. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS Microbiol. Lett.* 197, 47–51.
- Harvie, D.R., 2005. *Bacillus cereus* Fur regulates iron metabolism and is required for full virulence. *Microbiology* 151, 569–577.
- He, G., Shankar, R.A., Chzhan, M., Samouilov, A., Kuppusamy, P., Zweier, J.L., 1999. Noninvasive measurement of anatomic structure and intraluminal oxygenation in the gastrointestinal tract of living mice with spatial and spectral EPR imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 4586–4591.
- Heierson, A., Sidén, I., Kivaisi, A., Boman, H.G., 1986. Bacteriophage-resistant mutants of *Bacillus thuringiensis* with decreased virulence in pupae of *Hyalophora cecropia*. *J. Bacteriol.* 167, 18–24.

- Helgason, E., Økstad, O.A., Caugant, D.A., Johansen, H.A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I., Kolstø, A.-B., 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2627–2630.
- Helgason, E., Tourasse, N.J., Meisal, R., Caugant, D.A., Kolsto, A.-B., 2004. Multilocus Sequence Typing Scheme for Bacteria of the *Bacillus cereus* Group. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 191–201.
- Hemady, R., Zaltas, M., Paton, B., Foster, C., Baker, A., 1990. *Bacillus*-induced endophthalmitis: new series of 10 cases and review of the literature. *Br. J. Ophthalmol.* 74, 26–29.
- Henderson, I., Duggleby, C.J., Turnbull, P.C.B., 1994. Differentiation of *Bacillus anthracis* from other *Bacillus cereus* group bacteria with the PCR. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 44, 99–105.
- Hernaiz, C., Picardo, A., Alos, J.I., Gomez-Garces, J.L., 2003. Nosocomial bacteremia and catheter infection by *Bacillus cereus* in an immunocompetent patient. *Clin. Microbiol. Infect.* 9, 973–975.
- Hindler, J., Richter, S., 2016. M45-Ed3 - Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria, 3rd ed.
- Hoffmaster, A.R., Hill, K.K., Gee, J.E., Marston, C.K., De, B.K., Popovic, T., Sue, D., Wilkins, P.P., Avashia, S.B., Drumgoole, R., Helma, C.H., Ticknor, L.O., Okinaka, R.T., Jackson, P.J., 2006. Characterization of *Bacillus cereus* Isolates Associated with Fatal Pneumonias: Strains Are Closely Related to *Bacillus anthracis* and Harbor *B. anthracis* Virulence Genes. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3352–3360.
- Hoffmaster, A.R., Novak, R.T., Marston, C.K., Gee, J.E., Helsel, L., Pruckler, J.M., Wilkins, P.P., 2008. Genetic diversity of clinical isolates of *Bacillus cereus* using multilocus sequence typing. *BMC Microbiol.* 8, 191.
- Hoffmaster, A.R., Ravel, J., Rasko, D.A., Chapman, G.D., Chute, M.D., Marston, C.K., De, B.K., Sacchi, C.T., Fitzgerald, C., Mayer, L.W., others, 2004. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8449–8454.
- Hoton, F.M., Fornelos, N., N’Guessan, E., Hu, X., Swiecicka, I., Dierick, K., Jääskeläinen, E., Salkinoja-Salonen, M., Mahillon, J., 2009. Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* cereulide-producing strains. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 177–183.
- Hsueh, P.-R., Teng, L.-J., Yang, P.-C., Pan, H.-L., Ho, S.-W., Luh, K.-T., 1999. Nosocomial pseudoepidemic caused by *Bacillus cereus* traced to contaminated ethyl alcohol from a liquor factory. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2280–2284.
- Hudson, M., Beyer, W., Böhm, R., Fasanella, A., Garofolo, G., Golinski, R., Goossens, P., Hahn, U., Hallis, B., King, A., Mock, M., Montecucco, C., Ozin, A., Tonello, F., Kaufmann, S., 2008. *Bacillus anthracis*: balancing innocent research with dual-use potential. *Int. J. Med. Microbiol.* 5–6, 345–364.
- Hunter, S.E., Brown, J.E., Oyston, P.C., Sakurai, J., Titball, R.W., 1993. Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 61, 3958–3965.
- Ikeda, M., Yagihara, Y., Tatsuno, K., Okazaki, M., Okugawa, S., Moriya, K., 2015. Clinical characteristics and antimicrobial susceptibility of *Bacillus cereus* blood stream infections. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 14.
- InVS, 2016. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives Données de la déclaration obligatoire, 2014.
- InVS, 2015. Données relatives aux toxi-infections alimentaires collectives déclarées en France en 2013. Institut de Veille Sanitaire.
- InVS, 2014. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives Données de la déclaration obligatoire, 2012. Institut de Veille Sanitaire.
- InVS, 2013. Surveillance des toxi infections alimentaires collectives Données de la déclaration obligatoire, 2011. Institut de Veille Sanitaire.
- InVS, 2012. Surveillance des toxi infections alimentaires collectives Données de la déclaration obligatoire, 2010. Institut de Veille Sanitaire.

- InVS, 2011. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives Données de la déclaration obligatoire, 2009.
- InVS, 2010. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives Données de la déclaration obligatoire, 2008. Institut de Veille Sanitaire.
- InVS, 2009. Données relatives aux Toxi-infections alimentaires collectives (Tiac) déclarées en France en 2006 et 2007. Institut de Veille Sanitaire.
- Jääskeläinen, E., Teplova, V., Andersson, M., Andersson, L., Tammela, P., Andersson, M., Pirhonen, T., Saris, N.-E., Vuorela, P., Salkinoja-Salonen, M., 2003. In vitro assay for human toxicity of cereulide, the emetic mitochondrial toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*. *Toxicol. In Vitro* 17, 737–744.
- Jääskeläinen, E.L., Häggblom, M.M., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S., 2004. Atmospheric oxygen and other conditions affecting the production of cereulide by *Bacillus cereus* in food. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 75–83.
- Jackson, S.G., Goodbrand, R.B., Ahmed, R., Kasatiya, S., 1995. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 103–105.
- Jensen, G.B., Hansen, B.M., Eilenberg, J., Mahillon, J., 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ. Microbiol.* 5, 631–640.
- Jenson, H., Levy, S., Duncan, C., Mcintosh, S., 1989. Treatment of multiple brain abscesses caused by *Bacillus cereus*. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 8, 795–798.
- Jeßberger, N., Dietrich, R., Bock, S., Didier, A., Märtlbauer, E., 2013. *Bacillus cereus* enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. *Toxicon* 30, 1–9.
- Jeßberger, N., Krey, V.M., Rademacher, C., Böhm, M.-E., Mohr, A.-K., Ehling-Schulz, M., Scherer, S., Märtlbauer, E., 2015. From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* 6.
- Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A.R., Tamames, J., Kämpfer, P., Kolstø, A.-B., Ramón, D., Martínez, J.F., Codoñer, F.M., Rosselló-Móra, R., 2013. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 383–391.
- Kamar, R., Gohar, M., Jéhanno, I., Réjasse, A., Kallassy, M., Lereclus, D., Sanchis, V., Ramarao, N., 2013. Pathogenic Potential of *Bacillus cereus* Strains as Revealed by Phenotypic Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 51, 320–323.
- Kamat, A., Nerkar, D., Nair, P., 1989. *Bacillus cereus* in some indian foods, incidence and antibiotic, heat and radiation resistance. *J. Food Saf.* 10, 31–41.
- Kato, K., Matsumura, Y., Yamamoto, M., Nagao, M., Ito, Y., Takakura, S., Ichiyama, S., 2016. Erratum to: Seasonal trend and clinical presentation of *Bacillus cereus* bloodstream infection: association with summer and indwelling catheter. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*
- Kawatani, E., Kishikawa, Y., Sankoda, C., Kuwahara, N., Mori, D., Osoegawa, K., Matsuishi, E., Gondo, H., 2009. *Bacillus cereus* sepsis and subarachnoid hemorrhage following consolidation chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Rinsho Ketsueki* 50, 300–303.
- Kerkenezov, N., 1953. Panophthalmitis after a blood transfusion: Responsible organism *Bacillus cereus*. *Br. J. Ophthalmol.* 37, 632.
- Kerr, H., 2009. Commercial household disinfectant inactivation of *Bacillus cereus* spores on fruit and vegetable surfaces.
- Kim, J.-B., Kim, J.-M., Cho, S.-H., Oh, H.-S., Choi, N.J., Oh, D.-H., 2011. Toxin Genes Profiles and Toxin Production Ability of *Bacillus cereus* Isolated from Clinical and Food Samples. *J. Food Sci.* 76, T25–T29.
- Kim, Y., Batt, C., 2008. Riboprint and virulence gene patterns for *Bacillus cereus* and related species. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1146–1155.

- Kiyomizu, K., Yagi, T., Yoshida, H., Minami, R., Tanimura, A., Karasuno, T., Hiraoka, A., 2008. Fulminant septicemia of *Bacillus cereus* resistant to carbapenem in a patient with biphenotypic acute leukemia. *J. Infect. Chemother.* 14, 361–367.
- Klee, S.R., Brzuszkiewicz, E.B., Nattermann, H., Brüggemann, H., Dupke, S., Wollherr, A., Franz, T., Pauli, G., Appel, B., Liebl, W., Couacy-Hymann, E., Boesch, C., Meyer, F.-D., Leendertz, F.H., Ellerbrok, H., Gottschalk, G., Grunow, R., Liesegang, H., 2010. The Genome of a *Bacillus* Isolate Causing Anthrax in Chimpanzees Combines Chromosomal Properties of *B. cereus* with *B. anthracis* Virulence Plasmids. *PLoS ONE* 5, e10986.
- Konstantinidis, K.T., Tiedje, J.M., 2007. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 504–509.
- Krause, A., Freeman, R., Sisson, P., Murphy, O., 1996. Infection with *Bacillus cereus* after close-range gunshot injuries. *J. Trauma* 41, 546–548.
- Kumari, S., Sarkar, P.K., 2016. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control*.
- Kuroki, R., Kawakami, K., Qin, L., Kaji, C., Watanabe, K., Kimura, Y., Ishiguro, C., Tanimura, S., Tsuchiya, Y., Hamaguchi, I., Sakakura, M., Sakabe, S., Tsuji, K., Inoue, M., Watanabe, H., 2009. Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Intern. Med.* 48, 791–796.
- Kutima, P.M., Foegeding, P.M., 1987. Involvement of the spore coat in germination of *Bacillus cereus* T spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 47–52.
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S., 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J. Invertebr. Pathol.* 132, 1–41.
- Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359.
- Lapidus, A., Goltsman, E., Auger, S., Galleron, N., Ségurens, B., Dossat, C., Land, M.L., Broussolle, V., Brillard, J., Guinebretiere, M.-H., Sanchis, V., Nguen-the, C., Lereclus, D., Richardson, P., Wincker, P., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Sorokin, A., 2008. Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 171, 236–249.
- Lasch, P., Beyer, W., Nattermann, H., Stammler, M., Siegbrecht, E., Grunow, R., Naumann, D., 2009. Identification of *Bacillus anthracis* by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and Artificial Neural Networks. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7229–7242.
- Le Scanff, J., Mohammedi, I., Thiebaut, A., Martin, O., Argaud, L., Robert, D., 2006. Necrotizing Gastritis due to *Bacillus cereus* in an Immunocompromised Patient. *Infection* 34, 98–99.
- Lebessi, E., Dellagrammaticas, H., Antonaki, G., Foustoukou, M., Lacovidou, N., 2009. *Bacillus cereus* meningitis in a term neonate. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 22, 458–461.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K.P., Prü, B.M., Kaplan, T., Wies Sner-Gunkel, E., Stewart, G.S., Scherer, S., 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 1373–1382.
- Lee, W., Ho, M., 1974. *Bacillus cereus* endocarditis in an addict. *Ann. Intern. Med.* 80, 418.
- Lequin, M.H., Vermeulen, J.R., Van Elburg, R.M., Barkhof, F., Kornelisse, R.F., Swarte, R., Govaert, P.P., 2005. *Bacillus cereus* meningoencephalitis in preterm infants: neuroimaging characteristics. *Am. J. Neuroradiol.* 26, 2137–2143.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., Salamitou, S., Sanchis, V., 1996. Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *J. Bacteriol.* 178, 2749–2756.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Grandvalet, C., Salamitou, S., Gominet, M., 2000. Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 290, 295–299.
- Li, S., Dong, X., Su, Z., 2013. Directional RNA-seq reveals highly complex condition-dependent transcriptomes in *E. coli* K12 through accurate full-length transcripts assembling. *BMC Genomics* 14, 1.

- Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J.P., Wang, M., Sun, Y., Wang, L., Shao, Z., 2015. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Sci. Rep.* 5, 14082.
- Lücking, G., Dommel, M.K., Scherer, S., Fouet, A., Ehling-Schulz, M., 2009. Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR. *Microbiology* 155, 922–931.
- Lund, T., De Buyser, M.-L., Granum, P.E., 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.* 38, 254–261.
- Lund, T., Granum, P.E., 1996. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiol. Lett.* 141, 151–156.
- Luu-Thi, H., Khadka, D.B., Michiels, C.W., 2014. Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 189, 183–188.
- Macfarlane, S., Dillon, J.F., 2007. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1187–1196.
- Mahler, H., Pasi, A., Kramer, J.M., Schulte, P., Scoging, A.C., Bär, W., Krähenbühl, S., 1997. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *N. Engl. J. Med.* 336, 1142–1148.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., others, 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 3140–3145.
- Malek, F., Boudjemaa, B.M., Aouar-Métri, A., Kihal, M., 2013. Identification and genetic diversity of *Bacillus cereus* strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria. *Dairy Sci. Technol.* 93, 73–82.
- Manickam, N., Knorr, A., Muldrew, K., 2008. Neonatal meningoenzephalitis caused by *Bacillus cereus*. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 27, 843–846.
- Marrone, P.G., 1994. Present and future use of *Bacillus thuringiensis* in integrated pest management systems: An industrial perspective. *Biocontrol Sci. Technol.* 4, 517–526.
- Marston, C.K., Ibrahim, H., Lee, P., Churchwell, G., Gumke, M., Stanek, D., Gee, J.E., Boyer, A.E., Gallegos-Candela, M., Barr, J.R., Li, H., Boulay, D., Cronin, L., Quinn, C.P., Hoffmaster, A.R., 2016. Anthrax Toxin-Expressing *Bacillus cereus* Isolated from an Anthrax-Like Eschar. *PLOS ONE* 11, e0156987.
- Martin, J.A., Wang, Z., 2011. Next-generation transcriptome assembly. *Nat. Rev. Genet.* 12, 671–682.
- Martin, S.F., Follows, B.C., Hergenrother, P.J., Trotter, B.K., 2000. The Choline Binding Site of Phospholipase C (*Bacillus cereus*): Insights into Substrate Specificity. *Biochemistry (Mosc.)* 39, 3410–3415.
- Martínez-Blanch, J.F., Sánchez, G., Garay, E., Aznar, R., 2009. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 15–21.
- Marxen, S., Stark, T.D., Frenzel, E., Rüttschle, A., Lücking, G., Pürstinger, G., Pohl, E.E., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., Hofmann, T., 2015. Chemodiversity of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 2439–2453.
- McIntyre, L., Bernard, K., Beniac, D., Isaac-Renton, J.L., Naseby, D.C., 2008. Identification of *Bacillus cereus* Group Species Associated with Food Poisoning Outbreaks in British Columbia, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7451–7453.
- Merzougui, S., Lkhider, M., Grosset, N., Gautier, M., Cohen, N., 2013. Differentiation by Molecular Typing of *Bacillus cereus* Isolates from Food in Morocco: PFGE-Eric PCR. *Food Public Health* 3, 223–227.
- Messelh usser, U., Frenzel, E., Bl ochinger, C., Zucker, R., K ampf, P., Ehling-Schulz, M., 2014. Emetic *Bacillus cereus* Are More Volatile Than Thought: Recent Foodborne Outbreaks and Prevalence Studies in Bavaria (2007–2013). *BioMed Res. Int.* 2014, 1–9.

- Miclard, J., Jäggi, M., Sutter, E., Wyder, M., Grabscheid, B., Posthaus, H., 2009. *Clostridium perfringens* beta-toxin targets endothelial cells in necrotizing enteritis in piglets. *Vet. Microbiol.* 137, 320–325.
- Mikkola, R., Saris, N.-E.L., Grigoriev, P.A., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S., 1999. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide. *Eur. J. Biochem.* 263, 112–117.
- Miller, J.M., Hair, J.G., Hebert, M., Hebert, L., Roberts, F.J., Weyant, R.S., 1997. Fulminating bacteremia and pneumonia due to *Bacillus cereus*. *J. Clin. Microbiol.* 35, 504–507.
- Miller, R., Beno, S., Kent, D., Carroll, L., Martin, N., Boor, K., Kovac, J., 2016. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Miyoshi, S., Shinoda, S., 2000. Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect.* 2, 91–98.
- Molle, V., Fujita, M., Jensen, S.T., Eichenberger, P., González-Pastor, J.E., Liu, J.S., Losick, R., 2003. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*: The Spo0A regulon. *Mol. Microbiol.* 50, 1683–1701.
- Moravek, M., Dietrich, R., Buerk, C., Broussolle, V., Guinebretière, M.-H., Granum, P.E., Nguyen-the, C., Märklbauer, E., 2006. Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *FEMS Microbiol. Lett.* 257, 293–298.
- Mortazavi, A., Williams, B., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B., 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5, 621–628.
- Motoi, N., Ishida, T., Nakano, I., Akiyama, N., Mitani, K., Hirai, H., Yazaki, Y., Machinami, R., 1997. Necrotizing *Bacillus cereus* infection of the meninges without inflammatory reaction in a patient with acute myelogenous leukemia: a case report. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 93, 301–305.
- Moyer, A.L., Ramadan, R.T., Novosad, B.D., Astley, R., Callegan, M.C., 2009. *Bacillus cereus* –Induced Permeability of the Blood–Ocular Barrier during Experimental Endophthalmitis. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 50, 3783.
- Nakamura, L.K., 1998. *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1031–1035.
- Naranjo, M., Denayer, S., Botteldoorn, N., Delbrassinne, L., Veys, J., Waegenaere, J., Sirtaine, N., Driesen, R.B., Sipido, K.R., Mahillon, J., Dierick, K., 2011. Sudden Death of a Young Adult Associated with *Bacillus cereus* Food Poisoning. *J. Clin. Microbiol.* 49, 4379–4381.
- Ngamwongsatit, P., Buasri, W., Pianariyanon, P., Pulsrikarn, C., Ohba, M., Assavanig, A., Panbangred, W., 2008. Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 352–356.
- Odunuga, O.O., Adekoya, O.A., Sylte, I., 2015. High-level expression of pseudolysin, the extracellular elastase of *Pseudomonas aeruginosa*, in *Escherichia coli* and its purification. *Protein Expr. Purif.* 113, 79–84.
- Oren, A., Garrity, G.M., 2014. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 1–5.
- Oster, H., Kong, T., 1982. *Bacillus cereus* endocarditis involving a prosthetic valve. *South. Med. J.* 75, 508–509.
- Otlewska, A., Oltuszek-Walczak, E., Walczak, P., 2013. Differentiation of strains from the *Bacillus cereus* group by RFLP-PFGE genomic fingerprinting. *Electrophoresis* 34, 3023–3028.
- Paananen, A., Mikkola, R., Sareneva, T., Matikainen, S., Hess, M., Andersson, M., Julkunen, I., SALKINOJA-SALONEN, M., Timonen, T., 2002. Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Clin. Exp. Immunol.* 129, 420–428.
- Pan, Y., Breidt, F., Kathariou, S., 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Sanitizing Agents in a Simulated Food Processing Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7711–7717.

- Peng, J., Tsai, W., Chou, C., 2002. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int. J. Food Microbiol.* 77, 11–18.
- Perchat, S., Dubois, T., Zouhir, S., Gominet, M., Poncet, S., Lemy, C., Aumont-Nicaise, M., Deutscher, J., Gohar, M., Nessler, S., Lereclus, D., 2011. A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group: The NprR-NprX system. *Mol. Microbiol.* 82, 619–633.
- Pfaffl, M.W., 2011. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29.
- Phillips, Z., Strauch, M., 2002. *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 392–402.
- Piggot, P., Coote, J., 1976. Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriol. Rev.* 40, 908–962.
- Piggot, P., Losick, R., 2002. Sporulation genes and intercompartmental regulation. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R, editors. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: From genes to cells. *Am. Soc. Microbiol.* 483–518.
- Piggot, P.J., Hilbert, D.W., 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 579–586.
- Priest, F.G., Barker, M., Baillie, L.W.J., Holmes, E.C., Maiden, M.C.J., 2004. Population Structure and Evolution of the *Bacillus cereus* Group. *J. Bacteriol.* 186, 7959–7970.
- Ragon, M., Wirth, T., Hollandt, F., Lavenir, R., Lecuit, M., Le Monnier, A., Brisse, S., 2008. A New Perspective on *Listeria monocytogenes* Evolution. *PLoS Pathog.* 4, e1000146.
- Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Ombregt, S.-A., Jääskeläinen, E., Salkinoja-Salonen, M., Debevere, J., 2006. Influence of Type of Food on the Kinetics and Overall Production of *Bacillus cereus* Emetic Toxin. *J. Food Prot.* 712–968.
- Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Vermeulen, A., Andjelkovic, M., Fitz-James, I., Veld, P., Denon, Q., Vérhe, R., Debevere, J., 2008. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 536–541.
- Ramarao, N., Belotti, L., Deboscker, S., Ennahar-Vuillemin, M., de Launay, J., Lavigne, T., Koebel, C., Escande, B., Guinebretiere, M.H., 2014. Two unrelated episodes of *Bacillus cereus* bacteremia in a neonatal intensive care unit. *Am. J. Infect. Control* 42, 694–695.
- Ramarao, N., Lereclus, D., 2006. Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively. *Microbes Infect.* 8, 1483–1491.
- Ramarao, N., Lereclus, D., 2005. The InhA1 metalloprotease allows spores of the *B. cereus* group to escape macrophages: InhA1 allows *B. thuringiensis* escape from macrophages. *Cell. Microbiol.* 7, 1357–1364.
- Ramarao, N., Sanchis, V., 2013. The Pore-Forming Haemolysins of *Bacillus cereus*: A Review. *Toxins* 5, 1119–1139.
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Okstad, O.A., Fouts, D.E., Jiang, L., Cer, R.Z., Kolsto, A.-B., Gill, S.R., Ravel, J., 2007. Complete Sequence Analysis of Novel Plasmids from Emetic and Periodontal *Bacillus cereus* Isolates Reveals a Common Evolutionary History among the *B. cereus*-Group Plasmids, Including *Bacillus anthracis* pXO1. *J. Bacteriol.* 189, 52–64.
- Rocha-Estrada, J., Aceves-Diez, A.E., Guarneros, G., de la Torre, M., 2010. The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 913–923.
- Romero, I.G., Pai, A.A., Tung, J., Gilad, Y., 2014. RNA-seq: impact of RNA degradation on transcript quantification. *BMC Biol.* 12, 1.
- Ruppitsch, W., Pietzka, A., Prior, K., Bletz, S., Fernandez, H.L., Allerberger, F., Harmsen, D., Mellmann, A., 2015. Defining and Evaluating a Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for Whole-Genome Sequence-Based Typing of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2869–2876.

- Ryan, P.A., Macmillan, J.D., Zilinskas, B.A., 1997. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 179, 2551–2556.
- Salamitou, S., Ramisse, F., Brehélin, M., Bourguet, D., Gilois, N., Gominet, M., Hernandez, E., Lereclus, D., 2000. The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology* 146, 2825–2832.
- Sanchis, V., 2011. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 31, 217–231.
- Sanz, P., Teel, L.D., Alem, F., Carvalho, H.M., Darnell, S.C., O'Brien, A.D., 2008. Detection of *Bacillus anthracis* Spore Germination In Vivo by Bioluminescence Imaging. *Infect. Immun.* 76, 1036–1047.
- Savini, V., Favaro, M., Fontana, C., Catavittello, C., Balbinot, A., Talia, M., Febbo, F., D'Antonio, D., 2008. *Bacillus cereus* heteroresistance to carbapenems in a cancer patient. *J. Hosp. Infect.* 71, 288–290.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.-A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 7–15.
- Scharff, R.L., 2012. Economic Burden from Health Losses Due to Foodborne Illness in the United States. *J. Food Prot.* 123–131.
- Schnepf, E., Crickmore, N. v, Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775–806.
- Selvakumar, G., Mohan, M., Sushil, S., Kundu, S., Bhatt, J., Gupta, H., 2007. Characterization and phylogenetic analysis of an entomopathogenic *Bacillus cereus* strain WGPSB-2 (MTCC 7182) isolated from white grub, *Anomala dimidiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 17, 525–534.
- Senesi, S., Celandroni, F., Salvetti, S., Beecher, D.J., Wong, A.C., Ghelardi, E., 2002. Swarming motility in *Bacillus cereus* and characterization of a fliY mutant impaired in swarm cell differentiation. *Microbiology* 148, 1785–1794.
- Setlow, P., 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 101, 514–525.
- Syednasrollah, F., Laiho, A., Elo, L.L., 2013. Comparison of software packages for detecting differential expression in RNA-seq studies. *Brief. Bioinform.* 16, 59–70.
- Syednasrollah, F., Rantanen, K., Jaakkola, P., Elo, L.L., 2016. ROTS: reproducible RNA-seq biomarker detector—prognostic markers for clear cell renal cell cancer. *Nucleic Acids Res.* 44, e1–e1.
- Shaheen, R., Andersson, M., Apetroaie, C., Schulz, A., Ehling-schulz, M., Ollilainen, V., Salkinojasalonen, M., 2006. Potential of selected infant food formulas for production of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Int. J. Food Microbiol.* 107, 287–294.
- Shinagawa, K., Sugiyama, J., Terada, T., Matsusaka, N., Sugii, S., 1991. Improved methods for purification of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 80, 1–5.
- Shinagawa, K., Ueno, Y., Hu, D., 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. *J. Vet. Med. Sci.* 58, 1027–1029.
- Shiota, M., Saitou, K., Mizumoto, H., Matsusaka, M., Agata, N., Nakayama, M., Kage, M., Tatsumi, S., Okamoto, A., Yamaguchi, S., Ohta, M., Hata, D., 2010. Rapid Detoxification of Cereulide in *Bacillus cereus* Food Poisoning. *Pediatric* 125.
- Sidén, I., Dalhammar, G., Telander, B., Boman, H., Somerville, H., 1979. Virulence factors in *Bacillus thuringiensis*: purification and properties of a protein inhibitor of immunity in insects. *J. Gen. Microbiol.* 114, 45–52.
- Sinev, M., Budarina, Z.I., Gavrilenko, I., Tomashevskii, A., Kuz'min, N., 1993. Evidence of the existence of hemolysin II from *Bacillus cereus*: cloning the genetic determinant of hemolysin II. *Mol. Biol.* 27, 1218–1229.

- Sineva, E.V., Andreeva-Kovalevskaya, Z.I., Shadrin, A.M., Gerasimov, Y.L., Ternovsky, V.I., Teplova, V.V., Yurkova, T.V., Solonin, A.S., 2009. Expression of *Bacillus cereus* hemolysin II in *Bacillus subtilis* renders the bacteria pathogenic for the crustacean *Daphnia magna*. *FEMS Microbiol. Lett.* 299, 110–119.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K., Viridi, J.S., 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 6.
- Slamti, L., Lereclus, D., 2002. A cell–cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J.* 21, 4550–4559.
- Slamti, L., Perchat, S., Gominet, M., Vilas-Boas, G., Fouet, A., Mock, M., Sanchis, V., Chaufaux, J., Gohar, M., Lereclus, D., 2004. Distinct Mutations in PlcR Explain Why Some Strains of the *Bacillus cereus* Group Are Nonhemolytic. *J. Bacteriol.* 186, 3531–3538.
- Sliman, R., Rehm, S., Shlaes, D., 1987. Serious infections caused by *Bacillus* species. *Medicine (Baltimore)* 66, 218–223.
- Sonenshein, A.L., 2000. Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 561–566.
- Sorokin, A., Candelon, B., Guilloux, K., Galleron, N., Wackerow-Kouzova, N., Ehrlich, S.D., Bourguet, D., Sanchis, V., 2006. Multiple-Locus Sequence Typing Analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Reveals Separate Clustering and a Distinct Population Structure of Psychrotrophic Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1569–1578.
- Spira, W.M., Silverman, G.J., 1979. Effects of glucose, pH, and dissolved-oxygen tension on *Bacillus cereus* growth and permeability factor production in batch culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 109–116.
- Starostin, K.V., Demidov, E.A., Bryanskaya, A.V., Efimov, V.M., Rozanov, A.S., Peltek, S.E., 2015. Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach. *Sci. Rep.* 5, 16989.
- Steen, M.K., Bruno-Murtha, L.A., Chaux, G., Lazar, H., Bernard, S., Sulis, C., 1992. *Bacillus cereus* endocarditis: report of a case and review. *Clin. Infect. Dis.* 14, 945–946.
- Steinthorsdottir, V., Halldorsson, H., Andr sson, O.S., 2000. *Clostridium perfringens* beta-toxin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells. *Microb. Pathog.* 28, 45–50.
- Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E., 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 579–606.
- Stenfors, L.P., Granum, P.E., 2001. Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 197, 223–228.
- Stewart, P.S., Costerton, W.J., 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* 358, 135–138.
- Strauch, M., Webb, V., Spiegelman, G., Hoch, J.A., 1990. The SpoOA protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 1801–1805.
- Stretton, R., Bulman, R., 1975. Experimental infection of rabbits with *Bacillus cereus*. *Med. Mikrobiol. Parasitol.* 232, 83–90.
- Stuart, J.M., Segal, E., Koller, D., Kim, S.K., 2003. A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules. *science* 302, 249–255.
- Sue, D., Hoffmaster, A.R., Popovic, T., Wilkins, P.P., 2006. Capsule Production in *Bacillus cereus* Strains Associated with Severe Pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3426–3428.
- Sutherland, A., Limond, A., 1993. Influence of pH and sugars on the growth and production of diarrhoeagenic toxin by *Bacillus cereus*. *J. Dairy Res.* 60, 575–580.
- Swaminathan, B., Barrett, T.J., Hunter, S.B., Tauxe, R.V., 2001. PulseNet: The Molecular Subtyping Network for Foodborne Bacterial Disease Surveillance, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 7.
- Swiecicka, I., Mahillon, J., 2006. Diversity of commensal *Bacillus cereus* sensu lato isolated from the common sow bug (Porcellio scaber, Isopoda): Diversity of commensal *Bacillus cereus* isolated from the sow bug. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 132–140.
- Tanabe, T., Kodama, Y., Nisaikawa, Y., Okamoto, Y., Kawano, Y., 2009. Critical illness polyneuropathy after *Bacillus cereus* sepsis in acute lymphoblastic leukemia. *Intern. Med.* 48, 1175–1177.

- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 254–262.
- Techer, C., Baron, F., Delbrassinne, L., Belaid, R., Brunet, N., Gillard, A., Gonnet, F., Cochet, M.-F., Grosset, N., Gautier, M., Andjelkovic, M., Lechevalier, V., Jan, S., 2014. Global overview of the risk linked to the *Bacillus cereus* group in the egg product industry: identification of food safety and food spoilage markers. *J. Appl. Microbiol.* 116, 1344–1358.
- Teunis, P.F.M., Kasuga, F., Fazil, A., Ogden, I.D., Rotariu, O., Strachan, N.J.C., 2010. Dose–response modeling of *Salmonella* using outbreak data. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 243–249.
- Thompson, N.E., Ketterhagen, M.J., Bergdoll, M.S., Schantz, E.J., 1984. Isolation and some properties of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 43, 887–894.
- Thorsen, L., Budde, B.B., Henrichsen, L., Martinussen, T., Jakobsen, M., 2009. Cereulide formation by *Bacillus weihenstephanensis* and mesophilic emetic *Bacillus cereus* at temperature abuse depends on pre-incubation conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 133–139.
- Thorsen, L., Hansen, B.M., Nielsen, K.F., Hendriksen, N.B., Phipps, R.K., Budde, B.B., 2006. Characterization of Emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a New Cereulide-Producing Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5118–5121.
- Titball, R.W., 1998. Bacterial phospholipases. *J. Appl. Microbiol.* 84.
- Tran, S.-L., Guillemet, E., Gohar, M., Lereclus, D., Ramarao, N., 2010. CwpFM (EntFM) Is a *Bacillus cereus* Potential Cell Wall Peptidase Implicated in Adhesion, Biofilm Formation, and Virulence. *J. Bacteriol.* 192, 2638–2642.
- Tran, S.-L., Guillemet, E., Ngo-Camus, M., Clybouw, C., Puhar, A., Moris, A., Gohar, M., Lereclus, D., Ramarao, N., 2011. Haemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages: *Bacillus cereus* HlyII is a toxic factor inducing apoptosis. *Cell. Microbiol.* 13, 92–108.
- Tran, S.-L., Ramarao, N., 2013. *Bacillus cereus* immune escape: a journey within macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* 347, 1–6.
- Tschiedel, E., Rath, P.-M., Steinmann, J., Becker, H., Dietrich, R., Paul, A., Felderhoff-Müser, U., Dohna-Schwake, C., 2015. Lifesaving liver transplantation for multi-organ failure caused by *Bacillus cereus* food poisoning. *Pediatr. Transplant.* 19, 11–14.
- Tuazon, C., Hill, R., Sheagren, J., 1974. Microbiologic study of street heroin and injection paraphernalia. *J. Infect. Dis.* 129, 327.
- Turabelidze, G., Lawrence, S.J., Gao, H., Sodergren, E., Weinstock, G.M., Abubucker, S., Wylie, T., Mitreva, M., Shaikh, N., Gautom, R., Tarr, P.I., 2013. Precise Dissection of an *Escherichia coli* O157:H7 Outbreak by Single Nucleotide Polymorphism Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3950–3954.
- Turnbull, P.C., Jørgensen, K., Kramer, J.M., Gilbert, R.J., Parry, J.M., 1979. Severe clinical conditions associated with *Bacillus cereus* and the apparent involvement of exotoxins. *J. Clin. Pathol.* 32, 289–293.
- Turner, N., Whyte, R., Hudson, A., Kaltovei, S., 2006. Presence and Growth of *Bacillus cereus* in Dehydrated Potato Flakes and Hot-Held, Ready-to-Eat Potato Products Purchased in New Zealand. *J. Food Prot.* 984–1216.
- Van der Auwera, G.A., Feldgarden, M., Kolter, R., Mahillon, J., 2013. Whole-Genome Sequences of 94 Environmental Isolates of *Bacillus cereus* Sensu Lato. *Genome Announc.* 1, e00380-13-e00380-13.
- Van Der Zwet, W.C., Parlevliet, G.A., Savelkoul, P.H., Stoof, J., Kaiser, A.M., Van Furth, A.M., Vandenbroucke-Grauls, C.M., 2000. Outbreak of *Bacillus cereus* infections in a neonatal intensive care unit traced to balloons used in manual ventilation. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4131–4136.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60, 407–438.

- Veysseyre, F., Fourcade, C., Lavigne, J.-P., Sotto, A., 2015. *Bacillus cereus* infection: 57 case patients and a literature review. *Médecine Mal. Infect.* 45, 436–440.
- Vilas-Bôas, G., Peruca, A., Arantes, O., 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* 53, 673–687.
- Virtanen, S.M., Roivainen, M., Andersson, M.A., Ylipaasto, P., Hoornstra, D., Mikkola, R., Salkinoja-Salonen, M.S., 2008. In vitro toxicity of cereulide on porcine pancreatic Langerhans islets. *Toxicon* 51, 1029–1037.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N., Ludwig, W., Rainey, F., Schleifer, K., Whitman, W., 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.
- Wang, J., Mei, H., Zheng, C., Qian, H., Cui, C., Fu, Y., Su, J., Liu, Z., He, J., 2013. The Metabolic Regulation of Sporulation and Parasporal Crystal Formation in *Bacillus thuringiensis* Revealed by Transcriptomics and Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 12, 1363–1376.
- Wang, L.-T., Lee, F.-L., Tai, C.-J., Kasai, H., 2007. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1846–1850.
- Wassenaar, T.M., Gaastra, W., 2001. Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol. Lett.* 201, 1–7.
- Wehrle, E., Moravek, M., Dietrich, R., Bürk, C., Didier, A., Märklbauer, E., 2009. Comparison of multiplex PCR, enzyme immunoassay and cell culture methods for the detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus*. *J. Microbiol. Methods* 78, 265–270.
- Weller, P., Nicholson, A., Braslow, N., 1979. The spectrum of *Bacillus* bacteremias in heroin addicts. *Arch. Intern. Med.* 139, 293–294.
- World Health Organization, Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group, 2015. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases.
- Xu, D., 2003. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 695–704.
- Yang, I., Shih, D.Y.-C., Huang, T.-P., Huang, Y.-P., Wang, J.-Y., Pan, T.-M., others, 2005. Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. *J. Food Prot.* 68, 2123–2130.
- Yokoyama, K., Ito, M., Agata, N., Isobe, M., Shibayama, K., Horii, T., Ohta, M., 1999. Pathological effect of synthetic cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, is reversible in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24, 115–120.
- York, M.K., 1990. *Bacillus* species pseudobacteremia traced to contaminated gloves used in collection of blood from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2114–2116.
- Young, S.B., Setlow, P., 2003. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *J. Appl. Microbiol.* 95, 54–67.
- Zenewicz, L.A., Wei, Z., Goldfine, H., Shen, H., 2005. Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C of *Bacillus anthracis* Down-Modulates the Immune Response. *J. Immunol.* 174, 8011–8016.
- Zhong, W., Shou, Y., Yoshida, T.M., Marrone, B.L., 2007. Differentiation of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis* by Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3446–3449.
- Zigha, A., Rosenfeld, E., Schmitt, P., Duport, C., 2007. The Redox Regulator Fnr Is Required for Fermentative Growth and Enterotoxin Synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. *J. Bacteriol.* 189, 2813–2824.
- Zouhir, S., Perchat, S., Nicaise, M., Perez, J., Guimaraes, B., Lereclus, D., Nessler, S., 2013. Peptide-binding dependent conformational changes regulate the transcriptional activity of the quorum-sensor NprR. *Nucleic Acids Res.* 41, 7920–7933.

Annexes

Annexe 1 : Caractéristiques des 42 souches TIAC retenues pour l'étude comparative

Souches	année	mois	Aliments	Nombre de cas	Temps d'incubation	CFU/g	symptômes	Signature Génétique
07CEB21BAC	2007	7	Semolina	5	2	1,20E+07	vomiting	3
07CEB48BAC	2007	11	Shrimp	12	24	6,80E+04	vomiting - diarrhea	1
07CEB53BAC	2007	12	Tomatoes	4,00	0-3	7,00E+02	vomiting - diarrhea	4
08CEB116BAC	2008	9	Semolina	40,00	12	1,20E+03	diarrhea	1
08CEB121BAC	2008	10	Tabbouleh and minced meat of beef	not known	not known	5,00E+03	not known	2
08CEB145BAC	2008	12	Composed salad (rice and corn)	2,00	not known	1,90E+03	abdominal pains - vomiting	2
08CEB037BAC	2008	1	Rice salad	13,00	12-15	2,00E+03	abdominal pain - vomiting - other	2
08CEB044BAC	2008	1	Semolina	61,00	3-6	1,00E+04	abdominal pain - vomiting	7
08CEB049BAC	2008	3	Semolina and lamb	4,00	0-3	5,50E+04	vomiting	3
08CEB075BAC	2008	6	Fruit salad	70,00	not known	6,30E+03	not known	3
09CEB01BAC	2009	8	Tiramisu	15,00	0-3	8,00E+02	vomiting - diarrhea	9
09CEB03BAC	2009	2	Fish in coconut milk	2,00	0-3	1,10E+04	nausea - other	1
09CEB04BAC	2009	4	Mashed potatoes	24,00	not known	4,00E+02	vomiting - diarrhea	7
09CEB05BAC	2009	7	Cantonese rice	2,00	0-3	1,60E+05	vomiting - other	3
09CEB26BAC	2009	8	Quenelle of pike	15,00	0-3	1,20E+03	vomiting - diarrhea - other	6
09CEB38BAC	2009	9	Chicken sauce	15,00	not known	5,00E+02	vomiting - diarrhea	3
09CEB40BAC	2009	9	Squid - sauce	3,00	9-12	2,10E+05	diarrhea	12
10CEB06BAC	2010	3	Pasta gratin	2,00	0-3	1,50E+07	vomiting - diarrhea	3
10CEB13BAC	2010	11	Sausage and rice salad	8,00	0-3	3,00E+03	vomiting - diarrhea	2
10CEB33BAC	2010	6	Paella	27,00	6-9	2,80E+04	diarrhea	3
10CEB46BAC	2010	7	Chicken	8,00	3-6	6,50E+04	vomiting - diarrhea	2
10CEB68BAC	2010	8	Tabbouleh	11,00	not known	not known	abdominal pains - other	1
10CEB88BAC	2010	10	Mashed potatoes and mashed vegetables	19,00	not known	1,20E+04	vomiting - diarrhea - other	3
12CEB01BAC	2012	6	Apricot compote, mashed carrots and mashed broccolis	8,00	9-12	7,00E+02	vomiting	1
14 SBCL 008	2011	1	Carrot	3,00	3-6	5,80E+03	vomiting - diarrhea - other	2
14 SBCL 013	2011	2	Mashed potatoes	10,00	not known	7,80E+04	vomiting - diarrhea	4
14 SBCL 015	2011	3	Mashed celery	15,00	12-15	1,00E+05	vomiting - diarrhea	7
14 SBCL 016	2011	3	Tomatoes and fish	3,00	12-15	5,50E+03	vomiting - diarrhea	2
14 SBCL 019	2011	4	Miso soup	1,00	not known	1,50E+03	not known	9
14 SBCL 020	2011	5	Composed salad	3,00	0-3	2,00E+03	vomiting - diarrhea	2
14 SBCL 022	2011	5	Tomatoe - corn - courgette dish	9,00	6-9	4,00E+03	abdominal pains - vomiting	2
14 SBCL 038	2011	11	Samoussa	9,00	0-1	1,00E+09	nausea - other	6

14 SBCL 049	2012	6	Composed salad	8,00	18-21	4,00E+02	abdominal pains - vomiting - other	2
14 SBCL 102	2012	7	Lamb meat	5,00	6-9	2,30E+03	vomiting - diarrhea	2
14 SBCL 175	2012	11	Mashed fish	18,00	9-12	4,00E+02	vomiting - diarrhea	7
14 SBCL 180	2012	11	Diced mixed vegetables	14,00	9-12	4,00E+02	vomiting - diarrhea	2
14 SBCL 266	2012	12	Millefeuille	2,00	3-6	2,00E+03	nausea	2
14 SBCL 281	2012	12	Onion soup	5,00	9-12	4,00E+02	vomiting	2
14 SBCL 369	2013	5	Vegetables soup	10,00	15-18	9,10E+02	vomiting - diarrhea	2
14 SBCL 374	2013	6	Composed salad	not known	6-9	5,50E+02	abdominal pains	2
14 SBCL 566	2013	8	Mix of pie	19,00	12-15	4,00E+02	vomiting - diarrhea	1
14 SBCL 714	2014	4	Polenta	25,00	18-21	9,00E+03	abdominal pains - diarrhea	5

Annexe 2 : Caractéristiques des souches cliniques retenues pour l'étude comparative

Key of strains	Date of sampling	Age of patients	Type of sampling	Symptoms	Antibiotic treatment	Outcomes	Genetic signature
09CEB11BAC	28/07/2009	Premature newborn	blood culture	meningitis		death	1
09CEB12BAC	28/07/2009	Premature newborn	cerebrospinal fluid	meningitis, infection in the liver, both lungs		death	1
09CEB13BAC	16/06/2009	Premature newborn	blood culture	brain abscess	VAN, CTX	recovery	2
09CEB14BAC	05/07/2009	Premature newborn	blood culture	bacteremia	VAN	recovery	1
09CEB15BAC	30/06/2009	newborn	neonatal gastric liquid	bacteremia	VAN	recovery	1
09CEB16BAC	21/07/2009	newborn	Umbilical	local colonization	CTX, AMX, AMK	recovery	1
09CEB33BAC	03/09/2009	newborn	axilla	skin infection	CRO	recovery	1
09CEB34BAC	17/09/2009	premature newborn	stomach tube feeding	premature birth	CTX, AMK, AMX (3 days)	recovery	3
09CEB35BAC	20/09/2009	premature newborn	gastric acid	neonatal infection	VAN (7days)	recovery	1
09CEB36BAC	21/09/2009	premature newborn	central venous catheter	bacteremia	AMX, AMK (3 days), then VAN (18 days)	recovery	1
12CEB30BAC	02/08/2011	premature newborn	blood culture	refractory hypoxemia, chronic bronchial dysplasia, stage-ii intraventricular hemorrhage, sepsis	CTX, VAN, AMK (10 days)	recovery	4
12CEB31BAC	08/2011	premature newborn	blood culture	apnea, bradycardia, and gray complexion. after that, sepsis, organ failure and pulmonary and cerebral abscesses		Death	4
12CEB34BAC	01/06/2009	80	Thoracentesis	pulmonary infection	AMX	?	2
12CEB35BAC	01/12/2010	premature newborn	stomach tube feeding	abdominal distension followed by severe enterocolitis and biological abnormalities	VAN, CTX, MTZ	recovery	4
12CEB36BAC	01/12/2010	premature newborn	stomach tube feeding	abdominal distension appeared three days after birth associated with radiologic, clinical, and biologic signs of enterocolitis	VAN, CTX, MTZ	recovery	12
12CEB37BAC	18/09/2011	30	blood culture	endocarditis associated to MSSA in a intravenous drug abuser, and cerebral mycotic aneurysms	GEN, OXA (4 days)	death	2
12CEB38BAC	02/11/2009	65	blood culture	sepsis causing death in a very pejorative context (leukocytes 0.3, platelets 20)		death	1

12CEB39BAC	12/09/2011	54	blood culture	sepsis and undernourishment	VAN, CRO, then VAN, CIP (21 days)	recovery	1
12CEB42BAC	03/03/2010	63	blood culture	bacteremia and central venous catheter-linked infection	AMX, then CIP (21 days), then GEN (3days), IPM (18days), then CIP, VAN (10 days)	recovery	3
12CEB40BAC	26/03/2010	63	blood culture	bacteremia and central venous catheter-linked infection	AMX, then CIP (21 days), then GEN (3days), IPM (18days), then CIP, VAN (10 days)	recovery	2
12CEB43BAC	27/05/2010	63	blood culture	bacteremia and central venous catheter-linked infection	AMX, then CIP (21 days), then GEN (3days), IPM (18days), then CIP, VAN (10 days)	recovery	3
12CEB41BAC	01/12/2010	61	blood culture	sepsis (patient with an acute myeloid leukemia)	PIP, AMK, VAN (7 days), then CIP, GEN	recovery	1
12CEB46BAC	07/12/2010	61	blood culture	sepsis (patient with an acute myeloid leukemia)	PIP, AMK, VAN (7 days), then CIP, GEN	recovery	4
12CEB44BAC	03/06/2008	34	blood culture	bacteremia (drug addict patient with axillary abscess)		recovery	1
12CEB45BAC	27/11/2010	newborn	blood culture	kidneys and urinary infections	CRO, GEN	recovery	2
12CEB47BAC	15/06/2008	43	blood culture	bacteremia		recovery	6
12CEB48BAC	06/10/2009	66	blood culture	bacteremia (patient with a colorectal cancer)		recovery	1
12CEB49BAC	24/09/2010	24	blood culture+ skin infection	sepsis and aplastic anemia caused by drugs	PIP, AMK	recovery	2
12CEB50BAC	12/08/2009	77	blood culture	bacteremia (patient with breast cancer)	CIP	recovery	2
12CEB51BAC	16/07/2010	60	blood culture	sternum abscess, absent fever		Sequela of osteitis	1
12CEB52BAC	20/06/2008	40	blood culture	bacteremia (immunocompromised patient)		recovery	4
13CEB01BAC	01/07/2011	31	Prosthesis from tibia	no clinical sign of infection	AMX	recovery	9
13CEB03BAC	01/10/2011	76	blood culture	community acquired pneumonia	CTX, SPI then CTX	recovery	1

13CEB04BAC	01/09/2012		46	catheter culture without an blood positive culture	heart failure and multiple infectious episodes	VAN, CLO, GEN then AMX then PIP then IPM then IPM, CAZ, CIP	?	2
13CEB05BAC	01/09/2012		48	blood culture	acute respiratory distress syndrome	CRO, GEN then CAZ, then PIP then CAZ, VAN, AMK	recovery	3
13CEB06BAC	01/06/2011		86	blood culture from catheter	heart failure, ventilator-associated pneumonia, ischemic stroke	AMK, IPM then IPM	recovery	1
13CEB07BAC	01/10/2011		24	blood culture	abdominal pain, shivering, vomiting, fever, diarrhea	none	recovery	3
13CEB08BAC	01/10/2012		56	blood culture from catheter	bronchogenic carcinoma, pneumonia	CTX then PIP then AMK, IPM	death	3
13CEB09BAC	01/09/2012		85	Liver abscess	sepsis, hepatitis c and liver abscess, abdominal pain, diarrhea	GEN, CTX, then CTX, CIP, then SXT, OFX, CTX	recovery	3
13CEB30BAC	01/09/2013	?		blood culture	nausea, abdominal pain and vomiting		?	5
14CEB15BAC	01/12/2013	Premature newborn		Blood culture from umbilical venous catheter	septic shock, multiple organ failure, pulmonary and cerebral abscesses	VAN	death	2
14CEB16BAC	01/12/2013	Premature newborn		blood culture from peripheral veins	septic shock, multiple organ failure, pulmonary and cerebral abscesses	VAN	death	2
14CEB17BAC	01/12/2013	Premature newborn		Bronchial aspiration (lung)	septic shock and pneumonia	VAN	death	4
14 SBCL987BAC	06/07/1905	?		Biopsy (kidney)	vomiting and diarrhea		death	2
14 SBCL988BAC	06/07/1905	?		Biopsy (spleen)	vomiting and diarrhea		death	5

Annexe 3 : Caractéristiques de souches environnementales, considérées comme non pathogènes, retenues pour l'étude comparative (Kamar *et al.*, 2013)

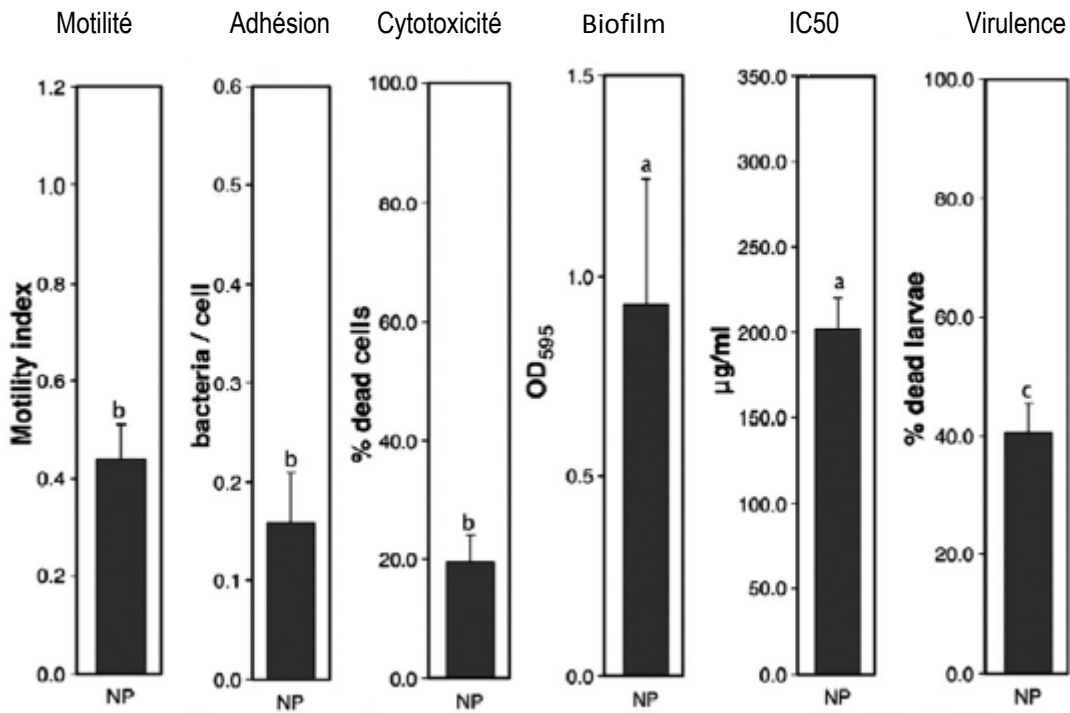
TABLE 1 Strain collection, origin, and genetic group

Pathogenic profile and genetic group	Strain	Source ^a	Reference source ^b
Nonpathogenic (NP)			
II	INRA BC'	Vegetable	7
	INRA BN	Vegetable	13
III	INRA PF	Milk protein	7, 13
	INRA PA	Milk protein	7, 13
IV	INRA A3	Starch	13
	I23	Cooked apple	13
	I13	Cooked rice	13
	I2	Dried fruit	7, 13
V	SB'	Vegetable field	13
	I11	Cooked food	13
VI	INRA 1	Pasteurized zucchini puree	7, 13
	INRA 5	Pasteurized zucchini puree	7, 13
	INRA BK	Vegetable	7
	INRA BL	Vegetable	7
	INRA C1	Pasteurized vegetables	7, 13
	INRA C46	Pasteurized vegetables	7
	INRA C64	Pasteurized vegetables	7
	INRA C74	Pasteurized vegetables	7, 13
	ADRIA I3	Cooked foods	7, 13
	ADRIA I20	Cooked foods	7, 13
	ADRIA I21	Cooked foods	7, 13
	INRA SL'	Soil	7, 13
	INRA SO	Soil	7, 13
	INRA SV	Soil	7, 13
	WSBC 10204	Pasteurized milk	13

7 : Guinebretière MH, Broussolle V, Nguyen-The C. 2002. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3053–3056.

13 : Guinebretière MH, Thompson FL, Sorokin A, Normand P, Dawyndt P, Ehling-Schulz M, Svensson B, Sanchis V, Nguyen-The C, Heyndrickx M, Vos PD. 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environ. Microbiol.* **10**:851– 865

Annexe 4 : caractéristiques phénotypiques des souches de la collection environnementale (E) (Kamar *et al.*, 2013)



Phenotypic analyses of representative *B. cereus* strains. Quantitative mean values \pm standard deviations for motility, epithelial cell adhesion, cytotoxicity, biofilm formation, polymyxin B resistance, and virulence in the model insect *G. mellonella* for each group of strains. NP, nonpathogenic strains; FP, food poisoning strains; C, clinical strains. Bars with different letters (a, b, c) indicate significant differences in their mean values ($P < 0.005$). Results are the means of results of at least three independent experiments.

Annexe 5 : Script pour l'analyse bioinformatique des données de RNAseq

```

#-----#
# Auteur : Cyprien GUERIN #
# Creation : 10.12.15 #
# MaIAGE, INRA #
#-----#

# Traitement des donnees RNA-Seq du projet "virbac"

directory="/projet/virbac/work"
cd ${directory}

# Repertoire contenant les donnees bruts RNA-Seq
mkdir ${directory}/initial_data/
mkdir ${directory}/initial_data/imagif/
# Copie depuis le disque dur de Benjamin Glasset

# Description du plan d'experience
echo "collection,strain,sample,sNumber,replicate" > ${directory}/initial_data/sample_description.csv
for sample in {1..45}
do
  strain=$(( ((${sample} - 1) % 15) + 1)
  collectionNumber=$(( ((${strain} - 1) / 5) + 1)
  replicate=$(( ((${sample} - 1) / 15) + 1)
  sNumber="ls ${directory}/initial_data/imagif/fastq/GLA-${sample}_*_all_R1_001.fastq.gz | awk -F"_" '{print $3}'"
  echo "${collectionNumber},${strain},GLA-${sample},${sNumber},${replicate}" >> ${directory}/initial_data/sample_description.csv
done

# Repertoire contenant les infos sur la (multi)reference a utiliser pour le mapping
mkdir ${directory}/reference/
# Donnees fournis par Pierre

mkdir ${directory}/processing

# Controle qualite des donnees bruts
mkdir ${directory}/processing/raw_data_quality_control
# Assemblage
mkdir ${directory}/processing/mapping
cd ${directory}/processing/mapping
# copie de la reference et indexation
cp ${directory}/reference/all_Bc_cds.fna .
bowtie2-build all_Bc_cds.fna all_Bc_cds_bowtie__ref_index

cd ${directory}/processing/

echo "name|R1_file|R2_file" > ${directory}/processing/raw_data_quality_control/sample_list.txt

for sample in `ls ${directory}/initial_data/imagif/fastq/*.fastq.gz | awk -F"." '{print $NF}' | sed -e 's/_all_R[12]_001.fastq.gz/' | sort -u`
do
  echo "Traitement de l'echantillon ${sample}"
  R1="ls ${directory}/initial_data/imagif/fastq/${sample}*R1*.fastq.gz | awk -F"." '{print $NF}' | sed 's/./g/'"
  R2="ls ${directory}/initial_data/imagif/fastq/${sample}*R2*.fastq.gz | awk -F"." '{print $NF}' | sed 's/./g/'"
  echo "${sample}|${R1}|${R2}" >> ${directory}/processing/raw_data_quality_control/sample_list.txt
  rm -rf ${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}
  mkdir -p ${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}
  rm -rf ${directory}/processing/mapping/${sample}
  mkdir -p ${directory}/processing/mapping/${sample}
  echo -e "
# controle qualite et nettoyage
cd ${directory}/processing/raw_data_quality_control

gunzip -d -c ${directory}/initial_data/imagif/fastq/${sample}_all_R1_001.fastq.gz >
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R1_001.fastq
gunzip -d -c ${directory}/initial_data/imagif/fastq/${sample}_all_R2_001.fastq.gz >
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R2_001.fastq

echo \"# FastqC\"
fastqc -o ${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R1_001.fastq
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R2_001.fastq

echo \"# Cutadapt R1\"
cutadapt -b AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC -n 5 -O 3 -m 0
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R1_001.fastq
  "
done

```

```

${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt.fastq

echo "# Cutadapt R2"
cutadapt -b AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGTAGA -n 5 -O 3 -m 0
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R2_001.fastq
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt.fastq

rm -f ${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R1_001.fastq
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R2_001.fastq

echo "# Sickle"
sickle pe -f ${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt.fastq -r
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt.fastq -t sanger -x -n -q 20 -l 20 -o
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle.fastq -p
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle.fastq -s
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_S_001.cutadapt_sickle.fastq

rm -f ${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt.fastq
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt.fastq

echo "# FastqCl"
fastqc -o ${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle.fastq
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle.fastq
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_S_001.cutadapt_sickle.fastq

# controle qualite et nettoyage
cd ${directory}/processing/mapping
echo "# Bowtie2 paired"
bowtie2 --phred33 -X 800 -N 1 -L 16 -R 4 -x all_Bc_cds_bowtie_ref_index -1
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle.fastq -2
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle.fastq -U
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/${sample}_all_S_001.cutadapt_sickle.fastq | samtools view -bS - | samtools sort -
${directory}/processing/mapping/${sample}/${sample}_all_001.cutadapt_sickle_sorted
" | qsub -S /bin/bash -m a -o ${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/fastqc.out -e
${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/fastqc.err -cwd -v PATH -N ${sample}
done

cd ${directory}/processing/mapping/
rm -f resultats_mapping.txt
# Extraction des infos de mapping et indexation des bam
for sample in `ls ${directory}/initial_data/imagif/fastq/*.fastq.gz | awk -F"." '{print $NF}' | sed -e 's/_all_R[12]_001.fastq.gz/' | sort -u`
do
echo "Traitement de l'echantillon ${sample}"
echo -e "
# Resultat du mapping pour l'echantillon ${sample}" >> resultats_mapping.txt
tail -20 ${directory}/processing/raw_data_quality_control/${sample}/fastqc.err >> resultats_mapping.txt
samtools index ${directory}/processing/mapping/${sample}/${sample}_all_001.cutadapt_sickle_sorted.bam

done

mkdir ${directory}/processing/htseq-count
cd ${directory}/processing/htseq-count

# Creation du fichier gff de reference a partir du fasta
cat ${directory}/reference/all_Bc_cds.fna | grep ">" | sed 's/>/g' | awk -F"." 'BEGIN{print "##gff3";}{a=$3-$2+1; print
$0"tGenbanktCDS\t1\t"a"\t.t.t+.\t.tgene_id=\"$0}' > all_Bc_cds.gff

for sample in `ls ${directory}/initial_data/imagif/fastq/*.fastq.gz | awk -F"." '{print $NF}' | sed -e 's/_all_R[12]_001.fastq.gz/' | sort -u`
do
echo "Traitement de l'echantillon ${sample}"
rm -rf ${directory}/processing/htseq-count/${sample}
mkdir -p ${directory}/processing/htseq-count/${sample}
echo -e "htseq-count -r pos -f bam -s yes -t CDS -m union -i gene_id
${directory}/processing/mapping/${sample}/${sample}_all_001.cutadapt_sickle_sorted.bam all_Bc_cds.gff >
${sample}/${sample}_all_001.cutadapt_sickle_sorted.bam_on_all_Bc_cds.gff.htseq_count.txt
" | qsub -S /bin/bash -m a -o ${directory}/processing/htseq-count/${sample}/htseq-count.out -e ${directory}/processing/htseq-count/${sample}/htseq-
count.err -cwd -v PATH -N ${sample}
done

# Aligner separement les reads 1 et 2.
#####

```

```

# Controle qualite des donnees bruts
rm -rf ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired
mkdir ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired
# Assemblage
rm -rf ${directory}/processing/mapping_unpaired
mkdir ${directory}/processing/mapping_unpaired
# Htseq-count
rm -rf ${directory}/processing/htseq-count_unpaired
mkdir ${directory}/processing/htseq-count_unpaired
# Sortie standard_error_sge
rm -rf ${directory}/processing/sortie_cluster_unpaired
mkdir ${directory}/processing/sortie_cluster_unpaired

cd ${directory}/processing/mapping_unpaired
# copie de la reference et indexation
cp ${directory}/reference/all_Bc_cds.fna .
bowtie2-build all_Bc_cds.fna all_Bc_cds_bowtie__ref_index

cd ${directory}/processing/htseq-count_unpaired
# Creation du fichier gff de reference a partir du fasta
cat ${directory}/reference/all_Bc_cds.fna | grep ">" | sed 's/>/g/' | awk -F"|" 'BEGIN{print "##gff3";}{a=$3-$2+1; print $0"\tGenbank\tCDS\t1\t"a"\t.t+\t.tgene_id=\"$0}' > all_Bc_cds.gff

cd ${directory}/processing/

echo "name|R1_file|R2_file" > ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/sample_list.txt
for sample in `ls ${directory}/initial_data/imagif/fastq/*.fastq.gz | awk -F"." '{print $NF}' | sed -e 's/_all_R[12]_001.fastq.gz/' | sort -u`
do
    echo "Traitement de l'echantillon ${sample}"
    R1=`ls ${directory}/initial_data/imagif/fastq/${sample}*R1*.fastq.gz | awk -F"." '{print $NF}' | sed 's/_all_R[12]_001.fastq.gz/'`
    R2=`ls ${directory}/initial_data/imagif/fastq/${sample}*R2*.fastq.gz | awk -F"." '{print $NF}' | sed 's/_all_R[12]_001.fastq.gz/'`
    echo "${sample}|${R1}|${R2}" >> ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/sample_list.txt
    rm -rf ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}
    mkdir -p ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}
    rm -rf ${directory}/processing/mapping_unpaired/${sample}
    mkdir -p ${directory}/processing/mapping_unpaired/${sample}
    rm -rf ${directory}/processing/htseq-count_unpaired/${sample}
    mkdir -p ${directory}/processing/htseq-count_unpaired/${sample}
    rm -rf ${directory}/processing/sortie_cluster_unpaired/${sample}
    mkdir -p ${directory}/processing/sortie_cluster_unpaired/${sample}
    echo -e "
# controle qualite et nettoyage
cd ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired

gunzip -d -c ${directory}/initial_data/imagif/fastq/${sample}_all_R1_001.fastq.gz >
${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.fastq
gunzip -d -c ${directory}/initial_data/imagif/fastq/${sample}_all_R2_001.fastq.gz >
${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.fastq

echo \"# FastqC\"
fastqc -o ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}
${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.fastq
${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.fastq

echo \"# Cutadapt R1\"
cutadapt -b AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC -n 5 -O 3 -m 0
${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.fastq -o
${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt.fastq
echo \"# Cutadapt R2\"
cutadapt -b AGATCGGAAGAGCGTCGTAGGAAAGAGTGTAGA -n 5 -O 3 -m 0
${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.fastq -o
${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt.fastq

rm -f ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.fastq
${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.fastq

echo \"# Sickle R1\"
sickle se -f ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt.fastq -t sanger -x -n -q 20 -l 20 -o
${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle.fastq
echo \"# Sickle R2\"
sickle se -f ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt.fastq -t sanger -x -n -q 20 -l 20 -o
${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle.fastq

```

```

rm -f $(directory)/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt.fastq
$(directory)/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt.fastq

echo "# FastqC"
fastqc -o $(directory)/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}
$(directory)/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle.fastq
$(directory)/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle.fastq

# mapping
cd $(directory)/processing/mapping_unpaired
echo "# Bowtie2 single R1"
bowtie2 --phred33 -N 1 -L 16 -R 4 -x all_Bc_cds_bowtie_ref_index -U
$(directory)/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle.fastq | samtools view -bS - | samtools sort -
$(directory)/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle_sorted
echo "# Bowtie2 single R2"
bowtie2 --phred33 -N 1 -L 16 -R 4 -x all_Bc_cds_bowtie_ref_index -U
$(directory)/processing/raw_data_quality_control_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle.fastq | samtools view -bS - | samtools sort -
$(directory)/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle_sorted

echo "# index bai R1"
samtools index $(directory)/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle_sorted.bam
echo "# index bai R2"
samtools index $(directory)/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle_sorted.bam

# htseq-count
echo "# htseq-count bai R1"
htseq-count -r pos -f bam -s yes -t CDS -m union -i gene_id
$(directory)/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle_sorted.bam
count_unpaired/all_Bc_cds.gff >
$(directory)/processing/htseq-count_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle_sorted.bam__on__all_Bc_cds.gff.htseq_count.txt
echo "# htseq-count bai R2"
htseq-count -r pos -f bam -s yes -t CDS -m union -i gene_id
$(directory)/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle_sorted.bam
count_unpaired/all_Bc_cds.gff >
$(directory)/processing/htseq-count_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle_sorted.bam__on__all_Bc_cds.gff.htseq_count.txt

" | qsub -S /bin/bash -m a -o $(directory)/processing/sortie_cluster_unpaired/${sample}/unpaired.out -e
$(directory)/processing/sortie_cluster_unpaired/${sample}/unpaired.err -cwd -v PATH -N ${sample}
done

# Fusion des fichiers de sortie htseq-count
cat $(directory)/processing/htseq-count_unpaired/GLA-1_S4/GLA-1_S4_all_R1_001.cutadapt_sickle_sorted.bam__on__all_Bc_cds.gff.htseq_count.txt |
grep -v "_" | cut -f 1 > $(directory)/processing/htseq-count_unpaired/all_R1_001.cutadapt_sickle_sorted.bam__on__all_Bc_cds.gff.htseq_count.txt

cat $(directory)/processing/htseq-count_unpaired/GLA-1_S4/GLA-1_S4_all_R2_001.cutadapt_sickle_sorted.bam__on__all_Bc_cds.gff.htseq_count.txt |
grep -v "_" | cut -f 1 > $(directory)/processing/htseq-count_unpaired/all_R2_001.cutadapt_sickle_sorted.bam__on__all_Bc_cds.gff.htseq_count.txt

echo "Name" > $(directory)/processing/htseq-count_unpaired/colnames_R1.txt
echo "Name" > $(directory)/processing/htseq-count_unpaired/colnames_R2.txt
for sample in `cat $(directory)/processing/raw_data_quality_control_unpaired/sample_list.txt | grep -v "name" | awk -F"|" '{print $1}' | sort -t '-' -n -k2`
do echo "Traitement de l'échantillon ${sample}"
echo "${sample}_R1" >> $(directory)/processing/htseq-count_unpaired/colnames_R1.txt
cat $(directory)/processing/htseq-count_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle_sorted.bam__on__all_Bc_cds.gff.htseq_count.txt |
grep -v "_" | join -1 1 -2 1 $(directory)/processing/htseq-count_unpaired/all_R1_001.cutadapt_sickle_sorted.bam__on__all_Bc_cds.gff.htseq_count.txt ->
$(directory)/processing/htseq-count_unpaired/R1_tmp
mv $(directory)/processing/htseq-count_unpaired/R1_tmp $(directory)/processing/htseq-
count_unpaired/all_R1_001.cutadapt_sickle_sorted.bam__on__all_Bc_cds.gff.htseq_count.txt

echo "${sample}_R2" >> $(directory)/processing/htseq-count_unpaired/colnames_R2.txt
cat $(directory)/processing/htseq-count_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle_sorted.bam__on__all_Bc_cds.gff.htseq_count.txt |
grep -v "_" | join -1 1 -2 1 $(directory)/processing/htseq-count_unpaired/all_R2_001.cutadapt_sickle_sorted.bam__on__all_Bc_cds.gff.htseq_count.txt ->
$(directory)/processing/htseq-count_unpaired/R2_tmp
mv $(directory)/processing/htseq-count_unpaired/R2_tmp $(directory)/processing/htseq-
count_unpaired/all_R2_001.cutadapt_sickle_sorted.bam__on__all_Bc_cds.gff.htseq_count.txt
done

# touch htseq-count_merge.R
R

# Regroupement des comptages
mkdir $(directory)/processing/cluster_count
cd $(directory)/processing/cluster_count

cp /projet/applis/tiling/Bc_rnaseq_annotated_clusters_20160126.tsv $(directory)/reference/.
```

```

touch cluster_count.pl

# Calculs pour les deux brins
for R in "R1" "R2"
do echo "Traitement de ${R}"
perl cluster_count.pl -samples ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/sample_list.txt -count_dir ${directory}/processing/htseq-count_unpaired/ -count_end_filename _all_${R}_001.cutadapt_sickle_sorted.bam_on_all_Bc_cds.gff.htseq_count.txt -clusters_in ${directory}/reference/Bc_maseq_annotated_clusters_20160126.tsv -clusters_out Bc_maseq_annotated_clusters_20160126_${R}_counts.tsv
done

# Representation stat
mkdir figures

touch traitements.R

# Relance des Htseq-count pour prendre en compte les mauvaises qualites (du a des mappings multiples)
cd ${directory}/processing/

for sample in `ls ${directory}/initial_data/imagif/fastq/*.fastq.gz | awk -F"." '{print $NF}' | sed -e 's/_all_R[12]_001.fastq.gz/' | sort -u`
do
echo "Traitement de l'echantillon ${sample}"
R1=`ls ${directory}/initial_data/imagif/fastq/${sample}*R1*.fastq.gz | awk -F"." '{print $NF}' | sed 's/.gz/'`
R2=`ls ${directory}/initial_data/imagif/fastq/${sample}*R2*.fastq.gz | awk -F"." '{print $NF}' | sed 's/.gz/'`
echo -e "
# htseq-count qual 0
echo \"# htseq-count bai R1\"
htseq-count -r pos -f bam -s yes -a 0 -t CDS -m union -i gene_id
${directory}/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle_sorted.bam
${directory}/processing/htseq-count_unpaired/all_Bc_cds.gff >
${directory}/processing/htseq-count_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle_sorted.bam_on_all_Bc_cds.gff.htseq_count_qual_0.txt
echo \"# htseq-count bai R2\"
htseq-count -r pos -f bam -s reverse -a 0 -t CDS -m union -i gene_id
${directory}/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle_sorted.bam
${directory}/processing/htseq-count_unpaired/all_Bc_cds.gff >
${directory}/processing/htseq-count_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle_sorted.bam_on_all_Bc_cds.gff.htseq_count_qual_0.txt

" | qsub -S /bin/bash -m a -o ${directory}/processing/sortie_cluster_unpaired/${sample}/unpaired.out -e
${directory}/processing/sortie_cluster_unpaired/${sample}/unpaired.err -cwd -v PATH -N ${sample}
done

cd ${directory}/processing/cluster_count
# Relance du comptage en prenant les nouvelles sorties htseq-count
for R in "R1" "R2"
do echo "Traitement de ${R}"
perl cluster_count.pl -samples ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/sample_list.txt -count_dir ${directory}/processing/htseq-count_unpaired/ -count_end_filename _all_${R}_001.cutadapt_sickle_sorted.bam_on_all_Bc_cds.gff.htseq_count_qual_0.txt -clusters_in ${directory}/reference/Bc_maseq_annotated_clusters_20160126.tsv -clusters_out Bc_maseq_annotated_clusters_20160126_${R}_counts_qual_0.tsv -infos_out Bc_maseq_annotated_clusters_20160126_${R}_infos_qual_0.tsv
done

R CMD BATCH --no-save traitements.R

zip resultats_rpkM_R1_20160301.zip data_rpkM_R1_log2_wlnf_with_order_20160301.csv figures/gene_cluster_rpkM_*

mkdir ${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq
cd ${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq
# Assemblage du gene panC
gene="panC"
# mkdir ${gene}
sample="GLA-10_S13"
samtools view -b ${directory}/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle_sorted.bam `grep ${gene}
${directory}/reference/Bc_maseq_annotated_clusters_20160126.tsv | awk -F"t" '{print $10}' | sed 's;/ /g' | sed 's//g' | samtools bam2fq - >
gene_${gene}__${sample}_R1.fastq

samtools view -b ${directory}/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle_sorted.bam `grep ${gene}
${directory}/reference/Bc_maseq_annotated_clusters_20160126.tsv | awk -F"t" '{print $10}' | sed 's;/ /g' | sed 's//g' | samtools bam2fq - |
fastx_reverse_complement -Q 33 > gene_${gene}__${sample}_revR2.fastq

echo -e "Trinity --seqType fq --single gene_${gene}__${sample}_R1.fastq,gene_${gene}__${sample}_revR2.fastq --full_cleanup --max_memory 10G --
output gene_${gene}__${sample}"

```

```

" | qsub -S /bin/bash -m a -o ${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq/gene_${gene}__${sample}_trinity.out -e
${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq/gene_${gene}__${sample}_trinity.err -cwd -v PATH -N ${sample}

gene="panC"
for sample in `cat ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/sample_list.txt | grep -v "name" | awk -F"|" '{print $1}' | sort -t '-' -n -k2`
do echo "Traitement de l'echantillon ${sample}"
  echo -e "# samtools R1"
  samtools view -b ${directory}/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle_sorted.bam | grep ${gene}
${directory}/reference/Bc_maseq_annotated_clusters_20160126.tsv | awk -F"\t" '{print $10}' | sed 's;/ /g\' | samtools bam2fq - >
gene_${gene}__${sample}_R1.fastq
  echo -e "# samtools R2"
  samtools view -b ${directory}/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle_sorted.bam | grep ${gene}
${directory}/reference/Bc_maseq_annotated_clusters_20160126.tsv | awk -F"\t" '{print $10}' | sed 's;/ /g\' | samtools bam2fq - |
fastx_reverse_complement -Q 33 > gene_${gene}__${sample}_revR2.fastq
  echo -e "# Trinity"
  Trinity --seqType fq --single gene_${gene}__${sample}_R1.fastq,gene_${gene}__${sample}_revR2.fastq --full_cleanup --max_memory 10G --output
gene_${gene}__${sample}_trinity
" | qsub -S /bin/bash -m a -o ${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq/gene_${gene}__${sample}_trinity.out -e
${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq/gene_${gene}__${sample}_trinity.err -cwd -v PATH -N ${sample}
done

# Relance d'un des jobs sur migale :
gene="panC"
sample="GLA-2_S5"
mv gene_panC__${sample}_trinity old_gene_panC__${sample}_trinity
echo -e "Trinity --seqType fq --single gene_${gene}__${sample}_R1.fastq,gene_${gene}__${sample}_revR2.fastq --full_cleanup --max_memory 10G --
output gene_${gene}__${sample}_trinity"

#Essaie de relance des jobs ayant donnees plus d'un contig pour jouer avec les parametres :
--min_glue 1
--path_reinforcement_distance 1

--SS_lib_type F

Trinity --show_full_usage_info | less

sample="GLA-12_S15"
sample="GLA-9_S12"
mv gene_panC__${sample}_trinity.Trinity.fasta old_gene_panC__${sample}_trinity.Trinity.fasta
echo -e "Trinity --KMER_SIZE 15 --SS_lib_type F --min_glue 1 --path_reinforcement_distance 1 --seqType fq --single
gene_${gene}__${sample}_R1.fastq,gene_${gene}__${sample}_revR2.fastq --full_cleanup --max_memory 10G --output gene_${gene}__${sample}_trinity"

# Relance de l'ensemble des analyses avec les nouveaux parametres sur le noeud maitre
rm -rf old_*
rm -f *.readcount
rm -rf *trinity*

gene="panC"
for sample in `cat ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/sample_list.txt | grep -v "name" | awk -F"|" '{print $1}' | sort -t '-' -n -k2`
do echo "Traitement de l'echantillon ${sample}"
  Trinity --KMER_SIZE 15 --SS_lib_type F --min_glue 1 --path_reinforcement_distance 1 --seqType fq --single
gene_${gene}__${sample}_R1.fastq,gene_${gene}__${sample}_revR2.fastq --full_cleanup --max_memory 10G --output gene_${gene}__${sample}_trinity >
${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq/gene_${gene}__${sample}_trinity.out
2>
${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq/gene_${gene}__${sample}_trinity.err
done

fasta manquant :
sample="GLA-15_S18"
sample="GLA-36_S39"

Trinity --KMER_SIZE 15 --SS_lib_type F --min_glue 1 --path_reinforcement_distance 1 --seqType fq --single
gene_${gene}__${sample}_R1.fastq,gene_${gene}__${sample}_revR2.fastq --full_cleanup --max_memory 10G --output gene_${gene}__${sample}_trinity

# extraction des sequences les plus longues par echantillon
perl -ne 'if(/^>(S+)/){$c=grep(/^$1$/qw(id1 id2))print if $c' fasta.file
perl -ne 'if(/^>(S+)/){$c=grep(/^$1$/qw(TR2))print if $c' gene_panC__GLA-37_S40_trinity.Trinity.fasta

rm -f all_sequences_${gene}.fasta
for sample in `cat ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/sample_list.txt | grep -v "name" | awk -F"|" '{print $1}' | sort -t '-' -n -k2`
do echo "Traitement de l'echantillon ${sample}"
  cat gene_${gene}__${sample}_trinity.Trinity.fasta | sed 's/>/${sample}/g' >> all_sequences_${gene}.fasta
done

```



```

# Comparaison avec les donnees de sequences fournies par Benjamin.
mkdir ${directory}/initial_data/sequences_panC_from_Benjamin
cd ${directory}/initial_data/sequences_panC_from_Benjamin
# Les sequences de 1 a 10 sont reverse complement. Il faut donc les remettre dans le bon sens.
for i in `ls Seq_PanC`
do   echo "Conversion ${i}"
    echo ">panC_${i}" > rev_panC_${i}.fasta
    cat Seq_PanC/${i}/*.seq.clipped | dos2unix | grep -v ">" >> rev_panC_${i}.fasta
    revFasta rev_panC_${i}.fasta > panC_${i}.fasta
done
for i in `ls Seq_PanC_2`
do   echo "Conversion ${i}"
    echo ">panC_${i}" > panC_${i}.fasta
    cat Seq_PanC_2/${i}/*.txt | dos2unix | grep -v ">" | tr '[:lower:]' '[:upper:]' >> panC_${i}.fasta
done

cd ${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq/
gene="panC"

cat          all_sequences_${gene}.fasta          ${directory}/initial_data/sequences_panC_from_Benjamin/${gene}*.fasta          >
all_sequences_${gene}_with_original_sequence.fasta
cat ${directory}/initial_data/sequences_panC_from_Benjamin/${gene}*.fasta > ${gene}_original_sequence.fasta

muscle -in all_sequences_${gene}_with_original_sequence.fasta -out all_sequences_${gene}_with_original_sequence.aligned.fasta
muscle -in ${gene}_original_sequence.fasta -out ${gene}_original_sequence.aligned.fasta

# Modification des sequences de S6, S28 et S37 pour rabouter la position 799 S6_TR2, S28_TR2 et S37_TR2 de alignee a la position 800 de S6_TR1,
S28_TR1 et S37_TR3 et Elimination des sequences GLA-21 TR1 et GLA-37 TR1
cp all_sequences_${gene}_with_original_sequence.aligned.fasta all_sequences_${gene}_with_original_sequence.aligned_hand_modified.fasta

# Relancement de l'alignement avec Muscle
muscle          -in          all_sequences_${gene}_with_original_sequence.aligned_hand_modified.fasta          -out
all_sequences_${gene}_with_original_sequence.aligned_hand_modified.aligned.fasta

# Tronquer les sequences en 5' et 3' pour ne garder que les fragments alignes avec les sequencages Sanger
# 482..831

# Creation du bed pour l'extraction avec bedtools
cat all_sequences_panC_with_original_sequence.aligned_hand_modified.aligned.fasta | grep ">" | sed 's/>/g' | awk '{print $1"\t482\t831"}' >
all_sequences_panC_with_original_sequence.aligned_hand_modified.aligned.extraction_482_831.bed
bedtools          getfasta          -fi          all_sequences_panC_with_original_sequence.aligned_hand_modified.aligned.fasta          -bed
all_sequences_panC_with_original_sequence.aligned_hand_modified.aligned.extraction_482_831.bed          -fo
all_sequences_panC_with_original_sequence.aligned_hand_modified.aligned.extraction_482_831.fasta

# Anonymisation des echantillons en attendant confirmation des noms des souches
mkdir ${directory}/processing/cluster_count_anonymous
cd ${directory}/processing/cluster_count_anonymous

cp ${directory}/processing/cluster_count/traitements.R traitements_anonymous.R
mkdir figures

R

# Creation de l'archive
zip data_rpkms_R1_log2_wlnf_with_order_20160407.zip data_rpkms_R1_log2_wlnf_with_order_20160407.csv figures/*.png

# Version nouvelle des reconstructions de genes pour nhe
cd ${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq
for gene in "nheA" "nheB" "nheC"
do   rm -rf ${gene}
    mkdir ${gene}
    for sample in `cat ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/sample_list.txt | grep -v "name" | awk -F"|" '{print $1}' | sort -t'|' -n -k2`
    do   echo "Traitement pour le gene ${gene} de l'echantillon ${sample}"
        echo -e "cd ${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq
            echo `# samtools R1`
            samtools view -b ${directory}/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle_sorted.bam `egrep
            \`${gene}\|s|:` ${directory}/reference/Bc_maseq_annotated_clusters_20160126.tsv | awk -F"\\|\\|\\|" '{print $10}' | sed 's/;/ /g' | samtools bam2fq - >
            ${gene}/gene_${gene}_${sample}_R1.fastq
            echo `# samtools R2`"
    done
done

```

```

        samtools view -b ${directory}/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle_sorted.bam \egrep
        \"${gene}(\|s|;)\" ${directory}/reference/Bc_rnaseq_annotated_clusters_20160126.tsv | awk -F\"\\|\" '{print $10}' | sed 's:/ /g' | samtools bam2fq - |
        fastx_reverse_complement -Q 33 > ${gene}/gene_${gene}__${sample}_revR2.fastq
        echo \"# Trinity\"
        Trinity --KMER_SIZE 15 --SS_lib_type F --min_glue 1 --path_reinforcement_distance 1 --seqType fq --single
        ${gene}/gene_${gene}__${sample}_R1.fastq,${gene}/gene_${gene}__${sample}_revR2.fastq --full_cleanup --max_memory 10G --output
        ${gene}/gene_${gene}__${sample}_trinity
        echo \"# remove fastq\"
        rm -f ${gene}/gene_${gene}__${sample}_R1.fastq ${gene}/gene_${gene}__${sample}_revR2.fastq
        \" | qsub -S /bin/bash -m a -o ${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq/${gene}/gene_${gene}__${sample}_trinity.out -e
        ${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq/${gene}/gene_${gene}__${sample}_trinity.err -cwd -v PATH -N ${gene}__${sample}
        done
    done
done

# Relance des assemblages qui n'ont pas marche
for gene in \"nheA\" \"nheB\" \"nheC\"
do for sample in `ls -d ${gene}/gene_${gene}__*_trinity | sed 's/.*__//g' | sed 's/_trinity//g'`
do echo \"Traitement pour le gene ${gene} de l'echantillon ${sample}\"
rm -rf ${gene}/gene_${gene}__${sample}*
echo -e \"cd ${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq
echo \"# samtools R1\"
samtools view -b ${directory}/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle_sorted.bam \egrep
\"${gene}(\|s|;)\" ${directory}/reference/Bc_rnaseq_annotated_clusters_20160126.tsv | awk -F\"\\|\" '{print $10}' | sed 's:/ /g' | samtools bam2fq - >
${gene}/gene_${gene}__${sample}_R1.fastq
echo \"# samtools R2\"
samtools view -b ${directory}/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle_sorted.bam \egrep
\"${gene}(\|s|;)\" ${directory}/reference/Bc_rnaseq_annotated_clusters_20160126.tsv | awk -F\"\\|\" '{print $10}' | sed 's:/ /g' | samtools bam2fq - |
fastx_reverse_complement -Q 33 > ${gene}/gene_${gene}__${sample}_revR2.fastq
echo \"# Trinity\"
Trinity --KMER_SIZE 15 --SS_lib_type F --min_glue 1 --path_reinforcement_distance 1 --seqType fq --single
${gene}/gene_${gene}__${sample}_R1.fastq,${gene}/gene_${gene}__${sample}_revR2.fastq --full_cleanup --max_memory 10G --output
${gene}/gene_${gene}__${sample}_trinity
echo \"# remove fastq\"
rm -f ${gene}/gene_${gene}__${sample}_R1.fastq ${gene}/gene_${gene}__${sample}_revR2.fastq
\" | qsub -S /bin/bash -m a -o ${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq/${gene}/gene_${gene}__${sample}_trinity.out -e
${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq/${gene}/gene_${gene}__${sample}_trinity.err -cwd -v PATH -N ${gene}__${sample}
done
done
done

ls -d */gene_*__*_trinity | wc -l

# Verification du nombre de contigs par echantillons
for gene in \"nheA\" \"nheB\" \"nheC\"
do for sample in `cat ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/sample_list.txt | grep -v \"name\" | awk -F\"|\" '{print $1}' | sort -t '-' -n -k2`
do echo \"Traitement pour le gene ${gene} de l'echantillon ${sample} : `grep -c \">\" ${gene}/gene_${gene}__${sample}_trinity.Trinity.fasta\"`\"
done
done

# Les fichiers fasta qui ne sortent pas correspondent a des faibles couvertures en reads

# Creation des multifasta et alignement
for gene in \"nheA\" \"nheB\"
do rm -f all_sequences_${gene}.fasta
for sample in `ls ${gene}/gene_${gene}__*_trinity.Trinity.fasta | sed 's/.*__//g' | sed 's/_trinity.Trinity.fasta//g'`
do echo \"Traitement de l'echantillon ${sample}\"
cat ${gene}/gene_${gene}__${sample}_trinity.Trinity.fasta | sed \"s/>/>${sample}//g\" >> ${gene}/all_sequences_${gene}.fasta
done
muscle -in ${gene}/all_sequences_${gene}.fasta -out ${gene}/all_sequences_${gene}.aligned.fasta
done

# Extraction des genes du cluster
gene=\"nheB\"
rm -f ${gene}/reference_genomes_${gene}.bed
for i in `egrep \"nheA(\|s|;)\" /projet/virbac/work/reference/Bc_rnaseq_annotated_clusters_20160126.tsv | awk -F\"|\" '{print $10}' | sed 's:/ /g'`
do echo ${i}
start=`echo ${i} | awk -F\"|\" '{print $2}'`
end=`echo ${i} | awk -F\"|\" '{print $3}'`
newend=$((end)-$(start)+1)
echo -e \"${i}|t1|t${newend}\" >> ${gene}/reference_genomes_${gene}.bed
done
bedtools getfasta -fi ${directory}/reference/all_Bc_cds.fna -bed ${gene}/reference_genomes_${gene}.bed -fo ${gene}/reference_genomes_${gene}.fasta
muscle -in ${gene}/reference_genomes_${gene}.fasta -out ${gene}/reference_genomes_${gene}.aligned.fasta

# recherche des genes mlst fortement exprimes

```

```

# http://mlstoslo.uio.no/cgi-bin/mlstdb/mlstdbnet5.pl?dbase=optimized&page=mainindex&file=bcereusgrp_isolates.xml
# adk : 10.3608166161 10.5787955166 10.9738741795 10.6456582409 11.7161902339 11.7146197159 11.0721421196 12.078504737
11.8628563725 11.0649972068 12.1181897792 11.422885463 11.2140834619 11.3663720213 12.1902322824 12.7130981695 10.644453759
11.5326914469 10.495888644 12.859131707 12.2313248098 9.9965740515 12.1911306244 11.8794177502 11.1835499583 12.2699486253
11.0612933969 11.2053634055 11.4537053756 12.2398302278 11.6114151914 11.0618250352 10.4580676072 11.1365562984
11.0305473708 11.3523793115 12.1434662776 12.5240253125 12.5308970537 11.4092658018 8.9697177301 11.3545657099 11.5350506638
10.8840591496 9.8193094284
# ccpA : trouve dans deux clusters de genes (dont un present que dans quelques echantillons)
# glpF : trouve dans deux clusters de genes (dont un present que dans quelques echantillons)
# glpT : trouve dans trois clusters de genes (avec de faibles expressions)
# panC : deja fait
# pta : 8.2077553524 7.3603149801 6.9499781218 7.7299503888 9.0492723802 9.0985189127 6.617248475 8.4226477185
6.4508697316 5.9389846727 6.0474406468 7.8779292272 7.5256299868 7.9854172762 7.5148284214 6.3315521557 8.9354716187
7.5130886268 7.4915652569 7.9834575784 9.5762540856 5.186534272 8.9797207039 6.9152625308 6.8535465178 8.1974368145
7.5713701424 6.822477936 8.012712388 7.3197931707 7.9816593207 8.8164564131 5.7173578889 8.905181908 7.7238351962
8.8264021355 8.8262997573 9.7253671597 7.7001088845 8.2876597704 6.367615935 7.4039076206 7.8647924826 7.5681813756
7.47795373
# pycA : 8.5493064233 8.8325536571 9.1429563807 9.1121195988 9.2064112111 9.4734695825 8.3799618283 8.4842355554 9.7325159
8.6402488454 8.645724225 8.5884028882 8.8106560904 8.9459586664 8.8449119582 8.8858996559 9.3591996359 9.2443512793
8.492052877 9.9332999104 8.9328564981 10.2385758771 9.3689005933 9.2906698678 8.716768703 9.3250517005 9.3230512488
9.4658898315 9.0222432729 10.3049511215 9.1549488225 8.8449194121 8.7860200118 9.3470465374 9.0784078167 9.1687009643
8.5714978468 9.009854937 9.3560983893 8.8271844838 8.6000898716 9.9195821455 8.8844478803 8.890701606 8.1764786878
# Utilisation des nouveaux genes de MLST qui sont bien exprimes et dans des clusters uniques
for gene in "adk" "pta" "pycA"
do rm -rf ${gene}
mkdir ${gene}
for sample in `cat ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/sample_list.txt | grep -v "name" | awk -F"|" '{print $1}' | sort -t'|' -n -k2`
do echo "Traitement pour le gene ${gene} de l'echantillon ${sample}"
echo -e "cd ${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq
echo \"# samtools R1\"
samtools view -b ${directory}/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R1_001.cutadapt_sickle_sorted.bam `egrep
\"${gene}(\|s|);\" ${directory}/reference/Bc_maseq_annotated_clusters_20160126.tsv | awk -F\"\\|\" '{print $10}' | sed 's:/ /g' | samtools bam2fq - >
${gene}/gene_${gene}_${sample}_R1.fastq
echo \"# samtools R2\"
samtools view -b ${directory}/processing/mapping_unpaired/${sample}/${sample}_all_R2_001.cutadapt_sickle_sorted.bam `egrep
\"${gene}(\|s|);\" ${directory}/reference/Bc_maseq_annotated_clusters_20160126.tsv | awk -F\"\\|\" '{print $10}' | sed 's:/ /g' | samtools bam2fq - |
fastx_reverse_complement -Q 33 > ${gene}/gene_${gene}_${sample}_revR2.fastq
echo \"# Trinity\"
Trinity --KMER_SIZE 15 --SS_lib_type F --min_glue 1 --path_reinforcement_distance 1 --seqType fq --single
${gene}/gene_${gene}_${sample}_R1.fastq,${gene}/gene_${gene}_${sample}_revR2.fastq --full_cleanup --max_memory 10G --output
${gene}/gene_${gene}_${sample}_trinity
echo \"# remove fastq\"
rm -f ${gene}/gene_${gene}_${sample}_R1.fastq ${gene}/gene_${gene}_${sample}_revR2.fastq
" | qsub -S /bin/bash -m a -o ${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq/${gene}/gene_${gene}_${sample}_trinity.out -e
${directory}/processing/gene_reconstruction_from_RNA-seq/${gene}/gene_${gene}_${sample}_trinity.err -cwd -v PATH -N ${gene}_${sample}
done
done

# Verification du nombre de contigs par echantillons
for gene in "adk" "pta" "pycA"
do for sample in `cat ${directory}/processing/raw_data_quality_control_unpaired/sample_list.txt | grep -v "name" | awk -F"|" '{print $1}' | sort -t'|' -n -k2`
do echo "Traitement pour le gene ${gene} de l'echantillon ${sample} : `grep -c ">" ${gene}/gene_${gene}_${sample}_trinity.Trinity.fasta`"
done
done

# Creation des multifasta et alignement
for gene in "adk" "pta" "pycA"
do rm -f all_sequences_${gene}.fasta
for sample in `ls ${gene}/gene_${gene}_*trinity.Trinity.fasta | sed 's/.*_//g' | sed 's/_trinity.Trinity.fasta//g`
do echo "Traitement de l'echantillon ${sample}"
cat ${gene}/gene_${gene}_${sample}_trinity.Trinity.fasta | sed "s/>/>${sample}/g" >> ${gene}/all_sequences_${gene}.fasta
done
muscle -in ${gene}/all_sequences_${gene}.fasta -out ${gene}/all_sequences_${gene}.aligned.fasta
done

# Utilisation de l'anonymisation des echantillons avec edgeR
cd ${directory}/processing/cluster_count_anonymous
cp traitements_anonymous.R traitements_anonymous_edgeR.R
R

cd ${directory}
mkdir traitement_anonymous_20160621
cd traitement_anonymous_20160621
cp ../processing/cluster_count_anonymous/data_edgeR_rpkM_R12_log2_with_order_20160621.csv

```

```
cp ../processing/cluster_count_anonymous/figures/*_20160621* .
cd ..
zip traitement_anonymous__20160621.zip traitement_anonymous__20160621*
```

```
# gestion des droits pour que benjamin puisse bosser ici egalement
chown -R cyguerin:virbac ${directory}/*
chmod -R 750 ${directory}/*
```

```
mkdir ${directory}/initial_data/genomes_from_benjamin
chmod 770 ${directory}/initial_data/genomes_from_benjamin
```

```
chown                                bglasset:virbac                                ${directory}/initial_data/genomes_from_benjamin
```

Titre : Approche combinatoire pour la caractérisation des souches de *Bacillus cereus* à l'origine d'infections chez l'Homme

Mots clés : *Bacillus cereus* ; biomarqueurs ; pathogénicité ; caractérisation

Résumé : *Bacillus cereus* est une bactérie connue pour être le deuxième agent responsable de Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) en France depuis 2012. Plusieurs cas d'infections locales et systémiques à *B. cereus* ont également été signalés. Par sa capacité à former des biofilms et à sporuler, *B. cereus* pose de vrais problèmes en agroalimentaire et en santé publique en résistant aux procédures de nettoyage et désinfection. Il reste néanmoins beaucoup d'interrogations sur les différences de toxicité observées chez les souches de *B. cereus*, des souches étant inoffensives pour l'Homme alors que d'autres sont mortelles. Or, les industries agroalimentaires et les hôpitaux ont besoin de savoir si une souche retrouvée dans leur environnement présente un danger et nécessite une intervention qui pourra avoir des répercussions économiques et humaines. Pour répondre à ces enjeux, mon travail a consisté à collecter et caractériser 564 souches isolées dans le cadre de TIAC et 56 souches isolées suite à des cas d'infections non-gastro-intestinales dans le but de les comparer avec des souches environnementales de *B. cereus* non reliées à des infections et identifier ce qui les différencie.

A la suite de l'analyse complète des données épidémiologiques et cliniques des souches de *B. cereus* ainsi que leur typage et leur caractérisation sur un modèle de caractérisation génétique basé sur la détection de dix gènes présumés impliqués dans la virulence, des souches d'intérêts ont été sélectionnées pour faire l'objet d'une étude approfondie de toxicité et de transcriptomique. Cette première partie du travail a également permis d'approfondir les connaissances portant sur les foyers de TIAC causés par *B. cereus* et aussi de mettre en évidence des cas de contaminations croisées survenues au sein de plusieurs hôpitaux français pouvant conduire au décès du patient.

L'étude portant sur la toxicité *in vitro* des souches sur trois modèles cellulaires eucaryotes a montré des différences significatives entre des *B. cereus* qui ont causé des infections et ceux non reliés à des infections. L'étude de transcriptomique différentielle a permis d'identifier une liste de marqueurs qui pourraient être utilisés, après validation, pour différencier les souches pathogènes et environnementales considérées comme non pathogènes. À la suite d'un transfert de connaissance et de méthode, ces marqueurs pourront être utilisés par les laboratoires de terrain en agro-alimentaire et les laboratoires d'analyses médicales pour aider à la prise de décision en cas de contamination à *B. cereus*.

Title: Combinatory approach for the characterization of *Bacillus cereus* strains involved in human infections

Keywords: *Bacillus cereus*; biomarkers; pathogenicity; characterization

Abstract: *Bacillus cereus* is the second cause of foodborne outbreaks (FBO) in France since 2012. Several cases of local and systemic infections caused by *B. cereus* were also reported. By its ability to form biofilms and spores, *B. cereus* arises real problems in the food industry and public health by resisting to cleaning and disinfection procedures. It remains many questions about the toxicity differences observed among *B. cereus* strains, several are harmless to humans while others can cause death. But the food industry and hospitals need to know if a strain found in their environment is unsafe and requires intervention that can have an economic and human impact. Face to these challenges, my work was to collect and characterize 564 strains isolated from FBO and 56 strains isolated from patients following cases of non-gastrointestinal infections in order to compare them with environmental strains of *B. cereus* and identify what differentiates them to others.

By a full analysis of epidemiological and clinical data of *B. cereus* strains and their molecular typing and characterization by a genetic model based on the detection of ten genes potentially involved in virulence, interest strains have been selected to deal with toxicity and transcriptomic in depth. This first part has also allowed increasing knowledge about FBO caused by *B. cereus* and also to highlight cross-contaminations occurred in several French hospitals leading to death.

The *in vitro* toxicity studies performed on three eukaryotic cell models showed significant differences between toxicity levels of *B. cereus* strains that have caused infections and those no linked to infections. The differential transcriptomic study has allowed identifying a list of markers that could be used, after validation, for differentiating pathogenic strains from those considering as non-pathogenic. Following the transfer of knowledge and methods, these markers could be used by food safety laboratories and medical laboratories to be a decision aid in case of *B. cereus* contamination.

