



HAL
open science

Maitrise des risques de contamination des produits alimentaires tunisiens par le groupe *Bacillus cereus*

Maroua Gdoura Épouse Ben Amor

► To cite this version:

Maroua Gdoura Épouse Ben Amor. Maitrise des risques de contamination des produits alimentaires tunisiens par le groupe *Bacillus cereus*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Agrocampus Ouest; Université de Sfax. Faculté des sciences, 2019. Français. NNT : 2019NSARB324 . tel-02933085

HAL Id: tel-02933085

<https://theses.hal.science/tel-02933085>

Submitted on 8 Sep 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.

THESE DE DOCTORAT EN COTUTELLE DE

AGROCAMPUS OUEST
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE
ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : *Biochimie-Biologie moléculaire et cellulaire*

FACULTÉ DES SCIENCES DE SFAX
UNIVERSITE DE SFAX
Ecole doctorale des Sciences Fondamentales
ED08FSSf01

Par

Maroua GDOURA épouse BEN AMOR

**Maitrise des risques de contamination des produits alimentaires
par le groupe *Bacillus cereus***

Thèse présentée et soutenue à Sfax, le Mardi 29 Octobre 2019 (FSS, Salle des thèses)

- Laboratoire de Recherche Toxicologie Microbiologie Environnementale et Santé.
Faculté des Sciences de Sfax, Tunisie.
- UMR STLO- Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, Equipe Microbiologie.
Agrocampus- Ouest, Rennes, France.

Thèse N°: 2019-16 – B-324

Rapporteurs avant soutenance :

Alya SELLAMI Professeur, FSS
Mamdouh BEN ALI Directeur de recherche, LBMIE, CBS

Composition du Jury :

Président :	Slim TOUNSI	Directeur de recherche, CBS
Examinateur :	Ivan LE GUERINEL	Professeur des Universités, LUBEM
Rapporteurs :	Alya SELLAMI Mamdouh BEN ALI	Professeur, FSS Directeur de recherche, LBMIE, CBS
Directeurs de thèse :	Radhouane GDOURA Michel GAUTIER	Directeur de recherche, LR17ES06, FSS Professeur, UMR STLO, Equipe Microbiologie, AO
Co-directrices de thèse :	Sophie JAN Mariam SIALA	Maître de conférences, UMR STLO, Equipe Microbiologie, AO Maître assistant habilité, IPEIS

Dédicaces

A mon Mari Mourad

Aucun mot ne saurait t'exprimer mon profond attachement et ma reconnaissance pour l'amour, la tendresse et la gentillesse dont tu m'as toujours entourée. Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études. Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements, ce travail n'aurait vu le jour. Que dieu le tout puissant nous accorde un avenir meilleur.

A ma Petite Janna

Mon adorable bébé qui a supporté des moments difficiles de stress et d'angoisse durant la grossesse. Je te remercie d'avoir été gentil et patient durant mes nuits d'études. Ta présence me tenait compagnie.

A mes Chers Parents Mohamed et Najoua

Tous les mots ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance pour votre dévouement et vos sacrifices, vous avez toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'épauler. Je vous dédie cette thèse, puissiez-vous y trouver le fruit de vos efforts.

A mes Chers Beaux-Parents Mohamed et Wassila

Vous m'avez accueillie à bras ouverts dans votre famille. En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous, je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A mes très Chères sœurs Safa et Hela

Je vous remercie pour votre soutien continu. Je suis chanceuse de vous avoir à mes côtés. Puissiez-vous trouver dans mon travail le témoin de mon amour et de mon affection.

A mon frère Achraf

Tu as rempli mes moments de joie et de bonheur. Je te souhaite tout ce qu'il y a de meilleur.

A ma Chère Petite Niece Mariem

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour toi. Ta joie et ta gaieté me comblent de bonheur. Puisse Dieu te garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.

A mes Grands-Mères Rafika et Fathia

Ce travail est le résultat de vos prières incessantes, de votre tendresse, et de votre amour. Que dieu vous procure santé et joie pour le restant de la vie... Je vous aime !

A la Mémoire de mes Grands-Pères Rachid et Taoufik

J'aurais souhaité votre présence en ce moment pour partager ma joie. Vous m'avez toujours fait preuve d'amour et d'affection, vous êtes toujours présents dans mon esprit et dans mon coeur. Aussi dans ce moment de joie, vous avez toutes mes pensées. Que vos âmes reposent en paix.

A mes Chères Amies Mouna et Sahar

En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Remerciements

A l'issue de cette rédaction, je peux dire que la thèse est loin d'être un travail solitaire et je ne peux la terminer sans remercier les personnes qui m'ont encadrée, aidée et soutenue au cours de ces quatre dernières années. Je tiens également à remercier par avance ceux dont le nom n'apparaîtra pas dans ces pages.

*Tout d'abord je tiens à remercier Professeur **Slim TOUNSI**, Professeur **Alya SELLAMI**, Professeur **Mamdouh BEN ALI** et Professeur **Ivan LE GUERINEL** pour avoir accepté de lire, d'évaluer et de juger cette thèse.*

*Mes remerciements vont tout particulièrement aux professeurs **Radhouane GDOURA** et **Michel GAUTIER** qui m'ont dirigée tout au long de ces 4 années, pour leur disponibilité et leur intérêt à l'avancée de mes travaux, ainsi que pour leur rigueur scientifique et technologique qui m'ont beaucoup appris. Vous avez su m'orienter durant ces 4 années et me faire confiance pour mener à bien ce travail de recherche. Votre dynamisme et votre engagement ont été essentiels à la réussite de ma thèse. Pour tout cela, je vous remercie.*

*Ce travail n'aurait pas vu le jour sans la confiance et le soutien de **Sophie JAN** et **Mariem SIALA** pour avoir co-encadré ce travail de thèse et pour être une source d'idées intarissable. Durant ces 4 années de collaboration, vous avez su jongler avec vos emplois du temps pour vous montrer toujours disponibles pour répondre à mes multiples sollicitations et me remotiver lors des moments de doute. Pour cette chance que vous m'avez offerte et votre bienveillance, je vous dois beaucoup.*

*A **Noël GROSSET**, mon sauveteur au laboratoire. Tu as su me transmettre tes connaissances techniques. Nous avons partagé quatre années, entre petites galères et grandes réussites. Merci pour ton amitié, ta présence, ton humour et ta joie de vivre.*

*A **Clarisse TECHER**, merci pour votre aide et vos conseils avisés. Par votre expertise du monde industriel, votre soutien et votre amitié, vous faites partie intégrante de la réussite de ce travail.*

*Je remercie également toutes les personnes de l'équipe Microbiologie qui m'ont aidée de près ou de loin. Merci à **Florence BARON**, **Sylvie BONNASSIE**, **Fabienne GONNET**, **Marie-Françoise COCHET** et **Antoine CULOT**.*

*Un merci tout particulier à **Maryvonne PASCO** pour son aide sur les manipulations d'électrophorèses SDS-PAGE, et à **Chantal CAUTY** pour les manipulations de Microscopie Electronique.*

*Un grand merci à tous les personnels administratifs pour votre accueil, pour votre chaleur et votre humour. Merci à **Fatma GHORBEL**, **Delphine RICHARD**, **Françoise PRIGENT** et **Dominiq VOLLAND**.*

*Un simple mot ne suffira pas à remercier ma famille. A mon **Mari**, mes **Parents** et mes **Beaux-Parents** pour leur amour, leur présence et leur soutien sans faille. Vous avez été des piliers durant ces 4 années parfois laborieuses, vos encouragements ont été bénéfiques et m'ont permis d'aller de l'avant.*

Communications sur les travaux de thèse

Articles publiés

Maroua GDOURA-BEN AMOR, Sophie JAN, Florence BARON, Noël GROSSET, Antoine CULOT, Radhouane GDOURA, Michel GAUTIER and Clarisse TECHER. (2019). Toxigenic potential and antimicrobial susceptibility of *Bacillus cereus* group bacteria isolated from Tunisian foodstuffs. *BMC Microbiology*. August 2019 | Volume 19:196.

<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1571-y>

Maroua GDOURA-BEN AMOR, Mariam SIALA, Mariem ZAYANI, Noël GROSSET, Salma SMAOUI, Férièle MESSADI-AKROUT, Florence BARON, Sophie JAN, Michel GAUTIER and Radhouane GDOURA. (2018). Isolation, identification, prevalence, and genetic diversity of *Bacillus cereus* group bacteria from different foodstuffs in Tunisia. *Frontiers in Microbiology*. March 2018 | Volume 9 | p44712 doi: 10.3389/fmicb.2018.00447

Article soumis

Maroua GDOURA-BEN AMOR, Sophie JAN, Florence BARON, Noël GROSSET, Clarisse TECHER, Radhouane GDOURA and Michel GAUTIER. (2019). Isolation, characterization of bacteriophages and their application to prevent or eradicate *Bacillus cereus* biofilm formation on stainless steel surface. *International Journal of Antimicrobial Agents*.

Communications orales

Maroua GDOURA-BEN AMOR, Mariam SIALA, Sophie JAN, Florence BARON, Radhouane GDOURA and Michel GAUTIER. (2018). Prévalence et caractérisation toxigénique et antibiotypique des souches de *Bacillus cereus* isolées des denrées alimentaires en Tunisie. 2^{ème} Colloque Bactéries Sporulantes Pathogènes ou d'Intérêt Technologiques (BSPIT) ; 27 Mars 2018, PARIS, FRANCE.

Maroua GDOURA-BEN AMOR, Mariam SIALA, Noël GROSSET, Radhouane GDOURA and Michel GAUTIER. (2017). Molecular typing and cytotoxicity testing of *B. cereus* strains isolated from foodstuffs in Tunisia. *6^{ème} congrès de l'ATP-BE*, Du 28 au 21 Décembre 2017, DOUZ, TUNISIE.

Maroua GDOURA-BEN AMOR, Mariam SIALA, Mariem ZAYANI, Noël GROSSET, Salma SMAOUI, Férièle MESSADI-AKROUT, Michel GAUTIER and Radhouane GDOURA. (2016). Molecular characterization of *B. cereus* Group isolated from food in Tunisia. *5^{ème} congrès de l'ATP-BE*. Du 28 au 21 Décembre 2016, HAMMAMET, TUNISIE.

Poster

Maroua GDOURA-BEN AMOR, Mariam SIALA, Mariem ZAYANI, Noël GROSSET, Salma SMAOUI, Férièle MESSADI-AKROUT, Florence BARON, Sophie JAN, Michel GAUTIER and Radhouane GDOURA. (2017). Genetic diversity of *B. cereus* group bacteria isolated from food in Tunisia. *Microbial Spoilers in food 2017*. Du 28 au 30 Juin 2017, QUIMPER, FRANCE.

Table des matières

Dédicaces	i
Remerciements	ii
Communications sur les travaux de thèse	iii
Table des matières	v
Liste des Abréviations	x
Liste des Figures	xiii
Liste des Tableaux	xv
Introduction générale	1
Etude Bibliographique	6
1. Etiologie des maladies d'origine alimentaire	6
2. Le groupe <i>Bacillus cereus</i>	9
2.1. Historique et incidence de <i>B. cereus</i> en tant que pathogène alimentaire	9
2.2. Caractéristiques et taxonomie.....	10
2.3. La contamination des produits alimentaires par le groupe <i>B. cereus</i>	18
2.4. Toxines de <i>B. cereus</i> responsables des maladies d'origine alimentaire.....	19
2.4.1. Syndrome diarrhéique.....	21
2.4.2. Syndrome émétique	26
2.5. La régulation de la toxinogénèse chez le groupe <i>B. cereus</i>	28
2.6. La résistance des membres du groupe <i>B. cereus</i> aux agents antimicrobiens	30
3. Détection, identification et caractérisation des membres du groupe <i>B. cereus</i>	31
3.1. Méthodes d'isolement, de dénombrement ou de détection.....	31
3.2. Méthodes de caractérisation moléculaire.....	34
3.2.1. Analyses génomiques comparatives des espèces du groupe <i>B. cereus</i>	34
3.2.2. Méthodes de différenciation des membres du groupe <i>B. cereus</i>	40
3.2.2.1. ERIC-PCR	40
3.2.2.2. Amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD).....	40
3.2.2.3. Electrophorèse en Champ Pulsé (PFGE).....	40
3.2.2.4. Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP).....	41
3.2.2.5. MALDI-TOF MS	41
3.3. Méthodes d'identification du pouvoir pathogène du groupe <i>B. cereus</i>	42
4. Les bactéries du groupe <i>B. cereus</i> dans l'industrie agroalimentaire (IAA)	44
4.1. La question de la thermorésistance.....	45
4.2. La question de l'adhésion aux surfaces industrielles et de la formation des biofilms	45

5.	Stratégies de contrôle des biofilms formés de bactéries du groupe <i>B. cereus</i> dans les IAA	49
5.1.	Les procédures de nettoyage de routine.....	49
5.2.	Les protocoles de nettoyage en place (NEP)	50
5.3.	Les stratégies de biocontrôle	51
6.	Les bactériophages en tant que moyens de contrôle des bactéries du groupe <i>B. cereus</i>	53
6.1.	Caractéristiques génétiques et morphologiques des bactériophages du groupe <i>B. cereus</i>	53
6.2.	Application des bactériophages au contrôle des bactéries du groupe <i>B. cereus</i> dans les IAA.....	56
	Objectifs et Stratégie du travail	59
	Matériel et Méthodes	62
1.	Prélèvement des échantillons	62
2.	Souches de référence	62
3.	Isolement et dénombrement des bactéries du groupe <i>B. cereus</i>	63
3.1.	Milieux de culture et tampons utilisés	63
3.1.1.	Milieu d'enrichissement : Eau Peptonée Tamponnée (EPT) + Chlorure de Lithium (LiCl) ...	64
3.1.2.	Le Bouillon Tryptone Soja (TSB)	64
3.1.3.	Le Tryptone Sel (TS).....	64
3.1.4.	Le Bouillon BHI-YE	65
3.1.5.	Le milieu BHI-YE Agar	64
3.1.6.	Le milieu « Mannitol, egg Yolk Polymyxin » (MYP).....	65
3.2.	Méthodologie.....	67
3.2.1.	Préparation de la suspension et mise en culture	67
3.2.2.	Comptage des colonies présumées de <i>B. cereus</i>	67
3.2.3.	Obtention et conservation des isolats	68
4.	Identification des isolats par PCR	68
4.1.	Préparation de l'ADN génomique	68
4.1.1.	Préparation de l'inoculum bactérien	68
4.1.2.	Extraction de l'ADN.....	68
4.1.3.	Quantification et vérification de la pureté de l'ADN.....	68
4.2.	Préparation du mélange réactionnel (Mix)	69
4.3.	Détection du groupe <i>B. cereus</i>	70
4.4.	Recherche des signatures « <i>16S rDNA-1 m</i> » et « <i>16S rDNA-2 p</i> ».....	71
4.5.	Recherche de la signature « <i>cspA</i> »	71
4.6.	Analyse électrophorétique des produits PCR	71
5.	Affiliation phylogénétique des isolats	71
5.1.	Principe.....	72
5.2.	Méthodologie.....	72
6.	Typage moléculaire des isolats.....	72
6.1.	Protocole de l'ERIC-PCR.....	72

6.2.	Protocole de la PFGE	72
6.2.1.	Milieux et Solutions Tampons pour PFGE	72
6.2.2.	Méthodologie.....	73
6.3.	Analyse et interprétation des profils de migration.....	74
7.	Evaluation du pouvoir d'adhésion aux coupons en inox	75
7.1.	Traitement des coupons en inox	75
7.2.	Préparation de l'inoculum bactérien.....	75
7.2.1.	Préparation des cellules végétatives.....	75
7.2.2.	Préparation des suspensions sporales.....	77
7.3.	Test d'adhésion des cellules végétatives/ des spores sur coupons en inox	77
7.4.	Décrochage et dénombrement des cellules adhérentes	77
8.	Recherche des gènes de virulence du groupe <i>B. cereus</i>	78
9.	Evaluation de l'activité cytotoxique sur les cellules Caco-2	80
9.1.	Cellules Caco-2	80
9.2.	Réactifs pour la culture cellulaire	80
9.2.1.	Milieu de culture des cellules Caco-2	80
9.2.2.	Tampon Phosphate Salin (PBS).....	80
9.2.3.	Préparation de la trypsine.....	81
9.2.4.	Préparation du paraformaldéhyde	81
9.2.5.	Préparation de la solution de coloration au cristal violet	81
9.3.	Principe.....	81
9.4.	Méthodologie.....	81
9.4.1.	Préparation des surnageants bactériens	82
9.4.2.	Préparation des cellules Caco-2	82
9.4.3.	Coloration au cristal violet (CV).....	82
9.4.4.	Analyses statistiques	83
10.	Détermination de la résistance aux antibiotiques	83
10.1.	Réactifs pour la réalisation de l'antibiogramme	83
10.1.1.	La gélose Müller-Hinton.....	83
10.1.2.	Les disques de diffusion d'antibiotiques.....	83
10.1.3.	Témoin d'opacité équivalent au standard 0,5 de Mcfarland	84
10.2.	Principe de l'antibiogramme : Méthode des disques	84
10.3.	Méthodologie.....	84
10.3.1.	Préparation de l'inoculum.....	84
10.3.2.	Ensemencement et application des disques de diffusion	85
10.3.3.	Lecture et critères d'interprétation.....	85
11.	Techniques de manipulation des bactériophages.....	86
11.1.	Isolement des bactériophages	86
11.1.1.	Sources de prélèvement	86

11.1.2.	Phase d'enrichissement	87
11.1.3.	Isolement et propagation des phages	87
11.2.	Etude du spectre d'hôte des bactériophages	87
11.3.	Obtention d'une suspension concentrée de bactériophages	89
11.4.	Caractérisation des bactériophages isolés	88
11.4.1.	Observation des phages en Microscope Electronique à Transmission (MET)	89
11.4.2.	Etude du profil protéique	90
11.4.3.	Etude du profil de restriction de l'ADN phagique	90
11.4.3.1.	Extraction de l'ADN phagique	90
11.4.3.2.	Digestion de l'ADN phagique	91
12.	Evaluation de l'effet anti-biofilm des bactériophages isolés	91
12.1.	Préparation des coupons en inox	92
12.2.	Traitement curatif sur des biofilms préformés (Post-traitement phagique)	92
12.3.	Traitement préventif au cours de la formation du biofilm (Traitement phagique)	92
Résultats et Discussion		93
Chapitre 1: Isolement, identification, prévalence et diversité génétique des isolats du groupe <i>B. cereus</i> d'origine alimentaire		93
1.	Résultats	93
1.1.	Isolement et identification des souches du groupe <i>B. cereus</i>	93
1.2.	Affiliation phylogénétique des isolats	93
1.3.	Typage moléculaire des isolats	95
1.4.	Evaluation du pouvoir d'adhésion des isolats	95
2.	Discussion	101
3.	Conclusion	108
Chapitre 2: Evaluation des risques sanitaires causés par les bactéries du groupe <i>B. cereus</i>		110
1.	Résultats	110
1.1.	Détection des gènes associés à la virulence	110
1.2.	Profils toxinogéniques des isolats du groupe <i>B. cereus</i>	112
1.2.1.	Profil entéro-hémolytique et non hémolytique associé ou non aux gènes <i>bceT</i> et <i>cytK-2</i>	112
1.2.2.	Profil entéro-non hémolytique associé ou non aux gènes <i>bceT</i> et <i>cytK-2</i>	113
1.2.3.	Profil émetique, entéro-hémolytique et non hémolytique	113
1.2.4.	Profil émetique et entéro-non-hémolytique associé ou non aux gènes <i>bceT</i> et <i>cytK-2</i>	113
1.3.	Etude du pouvoir cytotoxique des isolats du groupe <i>B. cereus</i> sur les cellules Caco-2	113
1.4.	Evaluation de la relation entre l'origine et la cytotoxicité des souches	114
1.5.	Evaluation de la relation entre les profils toxinogéniques et la cytotoxicité des souches	114
1.6.	Etude de la sensibilité des isolats du groupe <i>B. cereus</i> aux antibiotiques	117
2.	Discussion	117

3.	Conclusion.....	122
Chapitre 3: Isolement, identification et caractérisation des bactériophages infectant les bactéries du groupe <i>B. cereus</i>..... 124		
1.	Résultats	124
1.1.	Isolement et évaluation du spectre d'hôte des bactériophages isolés	124
1.2.	Caractérisation des bactériophages.....	126
1.2.1.	Caractérisation morphologique.....	126
1.2.2.	Etude des profils protéiques.....	127
1.2.3.	Caractérisation génomique.....	128
2.	Discussion	129
3.	Conclusion.....	131
Chapitre 4: Evaluation de l'efficacité des bactériophages sur l'inhibition et l'éradication de biofilms formés de bactéries du groupe <i>B. cereus</i> 133		
1.	Résultats	133
1.1.	Efficacité du traitement phagique curatif pour la réduction de biofilms formés de bactéries du groupe <i>B. cereus</i>	133
1.2.	Efficacité du traitement phagique préventif pour l'inhibition de la formation des biofilms par les bactéries du groupe <i>B. cereus</i>	135
2.	Discussion	137
3.	Conclusion.....	139
Conclusion générale et Perspectives 141		
Références Bibliographiques 148		

Liste des Abréviations

ADNe	Acide désoxyribonucléique extracellulaire
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
AFLP	Amplified Fragment-Length Polymorphism
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
<i>aroE</i>	Gène codant pour la Shikimate dehydrogenase
BceT	<i>Bacillus cereus</i> entérotoxine T
BET	Bromure d'éthidium
BHI-YE	Brain Heart Infusion- Yeast Extract
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDC	Centers for Disease Control (Canada)
CDSs	Protein Coding Sequencing
<i>ces</i>	Gène codant le céréulide
CFSAN	Center for Food Safety and Applied Nutrition
CNR	Centres de Références
Cry	Crystal
CspA	Cold-shock protein A
CV	Cristal violet
Cyt	Cytolytic
CytK	Cytotoxine K
DMEM	Dulbelcco's Modified Eagle's Medium
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
ECDC	European Centre for Disease prevention and Control
EDTA	Acide Éthylène Diamine Tétra Acétique
EFSA	European Food Safety Authority (Autorité européenne de sécurité des aliments)
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
EntFM	Entérotoxine FM
EPS	Extracellular Polymeric Substances
EPT	Eau peptonée tamponnée
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
FASTA	Fast Alignment Search Tool
FSANZ	Food Standards Australia New Zealand
GLISA	Gold-Labelled-Immuno-Sorbent-Assay
<i>gyrB</i>	Gène codant pour la gyrase B
HBL	Hemolysin Binding Lytic (Hémolysine BL)
HGT	Horizontal Gene Transfer
HPLC-MS	High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
IAA	Industrie Agroalimentaire
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
InVS	Institut de veille sanitaire (Santé Publique France)
ISO	International Organization for Standardization
ITS	Internal Transcribed Spacer
LB	Luria-Bertani

m/v	masse à volume
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
MCPs	Monocyte Chemoattractant Protein
MET	Microscope Electronique à Transmission
MH	Muller Hunton
MLEE	Multi-Locus Enzyme <i>Electrophoresis</i>
MLST	MultiLocus Sequence Typing
NPP	Nombre le Plus Probable (MPN en anglais pour Most Probable Number)
MYP	Mannitol-Egg Yolk Polymyxine
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEP	Protocoles de Nettoyage en Place (CIP en anglais pour Cleaning in place)
NHE	Non-Haemolytic Enterotoxin (Entérotoxine non-hémolytique)
NRPS	Non Ribosomal Peptides Synthetase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
<i>PanC</i>	Pantoate-bêta-alanine ligase C
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEMBA	Polymyxin Egg Yolk Mannitol Bromothymol Blue Agar
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PHE	Public Health England
PlcR	Phospholipase C Regulator (régulateur pléiotropique)
P24	Microplaque de 24 puits
P96	Microplaque de 96 puits
qPCR	Real-Time quantitative PCR
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
<i>sspE</i>	Gène codant la protéine structurale des spores
ST	Sequence Type
SVF	Sérum de Veau Foetal
TAE	Tris-Acétate-EDTA
TBE	Tris-Borate-EDTA
TE	Tris-EDTA
TES	Tris-EDTA-Saccharose
<i>TetA, TetB</i>	Gènes codant la protéine de résistance à la tétracycline
TIA	Toxi-Infection Alimentaire
TIAC	Toxi-Infection Alimentaire Collective
TerL	Grandes sous-unités de la terminase
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
TS	Tryptone Sel
TSB	Bouillon Tryptone Soja
UFC	Unité Formant Colonie
UFP	Unités Formant des Plages de lyses
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages

v/v	Volume à volume
Vips	Vegetative Insecticidal Proteins
VPR	Vascular Permeability Reaction
WGS	Whole Genome Sequencing
WHO	World Health Organization
YOPI	Young, Old, Pregnant, Immunocompromised

Liste des Figures

Figure 1: Colonies de *B. mycooides* (Di Franco et al., 2002).

Figure 2: Schéma représentant les deux types de maladies d'origine alimentaire dues aux bactéries du groupe *B. cereus* (Guérin, 2016).

Figure 3: Structure du céréulide (A) et structure en 2D (B) (Pitchayawasin et al., 2003).

Figure 4: Représentation schématique des réseaux de régulation des facteurs de pathogénicité chez le groupe *B. cereus* (Ceuppens et al., 2011).

Figure 5: Colonies issues du développement de bactéries du groupe *B. cereus* sur milieu MYP, après 24 h d'incubation à 30 °C (Fricker et al., 2008).

Figure 6: Confirmation de l'activité hémolytique du groupe *B. cereus* sur gélose au sang de mouton.

Figure 7: Les 5 clades phylogénétiques majeurs du groupe *B. cereus* (Ehling-Schulz et al., 2019).

Figure 8: Représentation schématique des 5 étapes de formation du biofilm: (1) adhésion réversible, (2) adhésion irréversible, (3) accumulation, (4) maturation et (5) dispersion (Monroe, 2007).

Figure 9: Conséquences liées à la présence de biofilms dans l'IAA (Tournay, 2018).

Figure 10: Caractéristiques morphologiques des Caudovirus: les *Siphoviridae*, les *Myoviridae* et les *Podoviridae* (Tournay, 2018).

Figure 11: Dendrogramme de PFGE montrant les relations entre les isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

Figure 12: Dendrogramme de ERIC montrant les relations entre les isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

Figure 13 : Etude du pouvoir d'adhésion des spores et des cellules végétatives de 174 isolats du groupe *B. cereus* sur des coupons en inox.

Figure 14: (A-G): Micrographies de MET montrant les bactériophages sélectionnés infectant les isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments tunisiens collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015. La coloration a été réalisée à l'acétate d'uranyle aqueux à 2%.

Figure 15: Analyse, par SDS-PAGE, des protéines structurales des bactériophages sélectionnés, infectant les isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments tunisiens collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

Figure 16: Profils de restriction de la digestion enzymatique du génome de sept phages infectant les isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments tunisiens collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

Figure 17: (A-G) : Effet des traitements bactériophagiques curatifs à différents titres (5-8 log UFP/mL) sur des biofilms préformés sur coupons en inox et âgés de 24, 48 et 72h. Les résultats sont exprimés en pourcentages d'éradication des biofilms.

Figure 18: (A-G) : Effets des traitements bactériophagiques à différents titres (5-8 log UFP/mL) au cours de la formation des biofilms sur coupons en inox pour des durées de 24, 48 ou 72h. Les résultats sont exprimés en pourcentages d'éradication des biofilms.

Liste des Tableaux

Tableau 1: Principaux caractères communs et distinctifs des espèces du groupe *B. cereus* (Biomérieux, 2016; Guinebretière et Sanchis, 2003).

Tableau 2: Classification du groupe *B. cereus* présentant les 7 groupes phylogénétiques et leur principales caractéristiques génétiques et écologiques (Guinebretière et al., 2008, 2010).

Tableau 3: Caractéristiques des deux types de maladies d'origine alimentaire liées au groupe *B. cereus* (Stenfors Arnesen et al., 2008).

Tableau 4: Caractéristiques des différentes toxines du groupe *B. cereus*.

Tableau 5: Morphologie des Caudovirales (Ackermann, 2003; Gillis et Mahillon, 2014).

Tableau 6: Caractéristiques des familles de phages infectant les bactéries du groupe *B. cereus* (Lee et al., 2014).

Tableau 7: Classification des phages du groupe *B. cereus* selon l'analyse des protéines majeures des capsides et des grandes sous-unités de la Terminase (Lee et al., 2014).

Tableau 8: Composition de l'eau peptonée tamponnée.

Tableau 9: Composition du milieu TSB.

Tableau 10: Composition de la poudre BHI.

Tableau 11: Composition de la base Mossel.

Tableau 12: Composition de 20 µL de mélange réactionnel commun de la PCR.

Tableau 13: Amorces pour la détection de *sspE* et des signatures « 16S rDNA-1 m », « 16S rDNA-2 p » et « *cspA* ».

Tableau 14: Composition de 50 µL de mélange réactionnel pour l'ERIC-PCR.

Tableau 15: Amorces et programmes PCR utilisés pour la détection des gènes de virulence au sein du groupe *B. cereus*.

Tableau 16: Composition du PBS.

Tableau 17: Molécules d'antibiotiques, diamètres critiques et lecture interprétative pour l'antibiogramme des bactéries du groupe *B. cereus*.

Tableau 18: Prévalence des bactéries du groupe *B. cereus* dans des échantillons d'aliments collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015, analysés sur milieu MYP (culture conventionnelle) et par la recherche de la signature spécifique au groupe *B. cereus* (test PCR décrit par Kim et al. (2005))

Tableau 19: Classification phylogénétique des isolats du groupe *B. cereus* isolés d'aliments collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015, selon Guinebretière et al. (2008, 2010).

Tableau 20: Relations entre les profils ERIC-PCR et PFGE des isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

Tableau 21: Distribution totale des gènes de virulence au sein de la collection de bactéries du groupe *B. cereus* (n= 174) provenant d'aliments collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015. Les pourcentages sont indiqués entre parenthèses pour chacun des aliments analysés.

Tableau 22: Groupes toxigéniques spécifiques aux isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

Tableau 23: Analyse statistique des associations entre la présence ou l'absence de facteurs de virulence et la cytotoxicité sur cellules Caco-2 des isolats de la collection de bactéries du groupe *B. cereus* provenant d'aliments tunisiens.

Tableau 24: Sensibilité aux antibiotiques des isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

Tableau 25: Détails de l'isolement des bactériophages infectant les isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments tunisiens collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

Tableau 26: Sélection de bactériophages infectant les isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments tunisiens collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015, sur la base de leur spectre d'hôtes et de leur pourcentage de lyse (le pourcentage est calculé à partir de l'infection par les 174 isolats du groupe *B. cereus*).

Tableau 27: Caractéristiques morphologiques révélées par observation au MET des phages infectant les isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments tunisiens collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

Introduction générale

La sécurité sanitaire des aliments constitue l'une des grandes exigences pour préserver la santé publique. La consommation d'aliments, contaminés par des agents pathogènes et des sous-produits microbiens tels que les toxines, peut entraîner des maladies graves, voire mortelles (Havelaar et al., 2012; Tewari et Abdullah, 2015; Van Cauteren et al., 2017). Certaines bactéries appartenant au groupe *B. cereus* sont pathogènes et peuvent contaminer un grand nombre d'aliments. La présence du groupe *B. cereus* dans les aliments peut être associée à des maladies d'origine alimentaire qui se présentent sous deux formes : le syndrome diarrhéique et/ou émétique (Granum, 1994). Ces maladies d'origine alimentaire sont généralement bénignes et résolues spontanément. Cependant, les bactéries du groupe *B. cereus* peuvent aussi occasionnellement entraîner l'hospitalisation ou même la mort de personnes immunodéprimées (Bennet et al., 2013; Dierick et al., 2005; Haeghbaert et al., 2002; Mahler et al., 1997; Stenfors Arnesen et al., 2008). Le syndrome émétique est causé par l'ingestion d'une toxine émétique, préformée dans l'aliment, « le céréulide ». Le syndrome diarrhéique est causé par une ou plusieurs entérotoxines thermolabiles qui peuvent être produites dans l'intestin grêle suite à l'ingestion d'aliments contaminés par des cellules végétatives ou des spores du groupe *B. cereus*. Les entérotoxines qui sont reconnues comme responsable du syndrome diarrhéique sont l'hémolysine BL (HBL) l'entérotoxine non hémolytique (NHE), la cytotoxine K (CytK) et l'entérotoxine T (BceT) (Agata et al., 1995; Hwang et Park, 2010; Zhang et al., 2015). La possession de ce fond génétique ne signifie cependant pas que les souches produisent des toxines actives. Le niveau d'expression des gènes de virulence peut aussi varier (Ceuppens et al., 2011; Granum et al., 1999; Hendriksen et al., 2006; Lund et al., 2000). Ainsi, et dans le but de mieux étudier le pouvoir toxigène des souches du groupe *B. cereus*, plusieurs études ont évalué leur cytotoxicité sur des cellules CHO, Vero, Hep-2 ou Caco-2 (Castiaux et al., 2016; Choma et al., 2000; Jan et al., 2011; Stenfors et al., 2002). Les syndromes émétique et diarrhéique peuvent survenir lorsque la charge bactérienne atteint respectivement 5 à 8 log (UFC/g) et 5 à 7 log UFC/g (Granum, 2001; Kramer et Gilbert, 1989). Ainsi, une charge bactérienne ingérée supérieure à 5 log UFC/g est considéré comme dangereux pour la consommation (Public Health England [PHE], 2009).

Le groupe *B. cereus* ou *B. cereus sensu lato* comprend sept espèces étroitement apparentées (Drobniewski et al., 1993; Guinebretière et al., 2013).

Sur la base des plages de température de croissance et des séquences de gènes codant partiellement pour la pantoate-bêta-alanine ligase C (*panC*), ces espèces se répartissent

en sept groupes phylogénétiques (**Guinebretière et al., 2008, 2010**). Cette affiliation permet d'attribuer un niveau de risque sanitaire à chaque groupe phylogénétique. Ainsi, le groupe III présente le risque le plus élevé. Un risque inférieur et de niveau très faible est attribué aux groupes V et VI, respectivement. Un risque modéré est associé aux groupes VII, IV et II.

B. cereus sensu lato est également connu pour entraîner des problèmes d'altération des aliments (**Lücking et al., 2013**), en raison de l'action de diverses enzymes hydrolytiques, même à des températures réfrigérées lorsque des souches psychrotolérantes sont impliquées (**Andersson et al., 1995**). *B. cereus sensu lato* est un contaminant alimentaire courant capable de se développer dans une large gamme d'activités de l'eau (a_w), de températures et de pH (**Kramer et Gilbert, 1989**). Les bactéries du groupe *B. cereus* associées aux groupes phylogénétiques psychrotrophes II et VI sont capables de croître à des températures inférieures à 7 °C et peuvent être préoccupantes dans les aliments pasteurisés entreposés au froid (**Guinebretière et al., 2008; Jan et al., 2011**). Les études concernant les mécanismes moléculaires adoptés par le groupe *B. cereus* pour permettre sa croissance à basse température se sont concentrées sur le rôle joué par une famille de petits polypeptides, nommés les *cold shock proteins* majeures « *cspA* » (**Graumann et Marahiel, 1996 ; Mayr et al., 1996**) et aussi par les ribosomes et plus précisément la sous-unité 16S rDNA qui permet de distinguer les souches mésophiles des souches psychrotrophes. Il existe en effet une signature spécifique pour chaque groupe thermique de bactéries, à savoir la signature « *16S rDNA-1 m* » pour les bactéries mésophiles et la signature « *16S rDNA-2 p* » pour les bactéries psychrotrophes (**Graumann et Marahiel, 1996**). Ces dernières années, l'émergence d'agents pathogènes d'origine alimentaire résistant à divers antibiotiques est l'une des menaces les plus graves pour la santé publique. La restriction des perspectives cliniques peut ainsi perturber le traitement empirique des épidémies. De nombreux rapports antérieurs ont montré que les bactéries du groupe *B. cereus* isolées de différents aliments sont résistantes à plusieurs antibiotiques tels que l'ampicilline, la pénicilline, la streptomycine, la tétracycline, le triméthoprime et la ceftriaxone (**Aklilu et al., 2016; Ankolekar et al., 2009; Fernandes et al., 2014; Yibar et al., 2017**). Il est donc important d'évaluer la résistance des bactéries du groupe *B. cereus* d'origine alimentaire à divers antibiotiques pour une meilleure gestion des maladies infectieuses. Plusieurs méthodes de typage moléculaire, basées sur les différences de séquences d'ADN, ont été utilisées pour révéler les parentés génétiques entre souches du groupe (**Valjevac et al., 2005 ; Merzougui et al., 2013a ; Hill et al.,**

2015). On peut citer les techniques d' « Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus » (ERIC-PCR) et d'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) qui se sont révélées utiles pour la discrimination et la caractérisation épidémiologique des souches du groupe *B. cereus*. La présence de *B. cereus sensu lato* dans la chaîne alimentaire peut être attribuée à l'utilisation de matières premières contaminées. De plus, les procédés technologiques tels que les traitements thermiques favorisent la sélection de *B. cereus sensu lato* en raison de la capacité de ces bactéries à former des endospores thermorésistantes. En outre, leur capacité à adhérer aux surfaces industrielles et à se développer par la suite sous la forme de biofilms extrêmement difficiles à éliminer, leur confère une résistance aux procédés de nettoyage et de désinfection (Andersson et al., 1995). En effet, la matrice extracellulaire du biofilm, généralement composée de polysaccharides, de protéines et parfois d'ADNe extracellulaire (Branda et al., 2005), agit comme barrière physique à l'entrée d'agents antimicrobiens, de détergents et d'antibiotiques (Flemming et Wingender, 2010). De plus, la matrice favorise l'adhésion au sein du biofilm, ce qui augmente sa stabilité face aux perturbations environnementales. Les biofilms représentent ainsi une source potentielle de contamination croisée et de contamination post-traitement récurrente des produits finis (Rajkovic et al., 2008b). Afin d'éviter que les bactéries du groupe *B. cereus* n'atteignent un niveau dangereux dans les aliments, différentes approches ont été développées. Elles permettent d'éliminer ou de prévenir la formation de biofilms. On peut citer l'utilisation d'enzymes ou de bactériophages, l'ajout de compétiteurs microbiens, de molécules métaboliques telles que les bactériocines ou des substances naturelles telles que les huiles essentielles (Srey et al., 2013). Plusieurs bactériophages infectant le groupe *B. cereus* ont été isolés dans le sol, la boue, les déchets alimentaires et les aliments fermentés (Lee et al. 2013; Oh et al, 2017; Shin et al. 2011, 2014).

Les bactériophages, souvent appelés phages, sont des parasites obligatoires des bactéries. Ils sont omniprésents dans la nature et sont isolés de différents environnements, y compris le sol, l'eau et des produits alimentaires comme la viande, les produits laitiers et les légumes (Atterbury et al., 2003; Binetti et Reinheimer, 2000; Giuseppe et al., 2018; Hsu et al, 2002; Surekhamol et al, 2013; Whitman et Marshall, 1971). Plusieurs bactériophages infectant le groupe *B. cereus* ont été isolés dans le sol, la boue, les déchets alimentaires et les aliments fermentés (Lee et al. 2013; Oh et al, 2017; Shin et al. 2011, 2014).

Bien que plusieurs études aient été publiées sur l'utilisation des bactériophages pour maîtriser le développement de biofilms composés de bactéries comme *Escherichia coli* (Corbin et al., 2001), *Enterococcus faecalis* (Teng et al., 2009), *Listeria monocytogenes* (Hibma et al., 1997, Soni et Nannapaneni, 2010), *Pseudomonas fluorescens* (Sillankorva et al., 2008), *Staphylococcus aureus* (Resch et al., 2005), *Salmonella* (Garcia et al., 2017; Gong et Jiang, 2017; Karaca et al., 2015; Sadekuzzaman et al., 2018) ou *Streptococcus mutans* (Dalmasso et al., 2015), aucune étude n'a proposé l'utilisation des phages comme moyen de contrôle du développement du groupe *B. cereus* sous forme de biofilms.

En Tunisie, d'après nos connaissances, aucun travail n'a étudié la contamination des produits alimentaires par le groupe *B. cereus* et sa maîtrise.

Les objectifs de cette thèse sont d'une part, d'isoler et d'identifier des souches du groupe *B. cereus* dans différentes matrices alimentaires, d'étudier leur diversité génétique et d'évaluer le niveau de risque en matière de sécurité sanitaire; d'autre part, d'isoler et de caractériser les bactériophages infectant le groupe *B. cereus* dans le but d'évaluer leur efficacité dans la lutte contre l'installation des bactéries, sous forme de biofilms, à la surface des installations industrielles. Dans une approche visant la maîtrise des risques de contamination des produits alimentaires par le groupe *B. cereus*, nous avons adopté la démarche expérimentale suivante :

- Etude de l'incidence du niveau de contamination par le groupe *B. cereus* dans différents types de denrées alimentaires collectées en Tunisie ;
- Etude de la diversité des isolats sélectionnés par les méthodes de typage par ERIC-PCR et PFGE ;
- Evaluation du niveau sanitaire dans les aliments. Cette évaluation porte sur (i) l'affectation de chaque isolat à un groupe phylogénétique et à un domaine de température de croissance (mésophile vs psychrotrophe), (ii) les capacités d'adhésion des bactéries sur les surfaces industrielles, (iii) la distribution des facteurs de virulence au sein de la collection et l'évaluation de l'activité cytotoxique sur des cellules Caco-2 ainsi que (iv) la sensibilité aux antibiotiques ;
- Isolement et caractérisation des bactériophages infectant des souches du groupe *B. cereus*. Cette caractérisation porte essentiellement sur l'analyse des spectres d'hôtes, la morphologie révélée par microscopie électronique à transmission (MET), ainsi que les profils protéiques et de restriction de l'ADN ;

- Evaluation du potentiel des bactériophages isolés pour prévenir la formation de biofilms du groupe *B. cereus* des ou les éliminer une fois formés sur des surfaces en inox.

Etude Bibliographique

1. Etiologie des maladies d'origine alimentaire

Les maladies d'origine alimentaire font partie des problèmes de santé publique les plus graves aussi bien pour les pays industrialisés que pour les pays en voie de développement. L'OMS estime que dans le monde, une personne sur dix tombe malade à cause d'une infection d'origine alimentaire (OMS, 2015).

Plusieurs facteurs contribuent à accroître l'incidence des maladies d'origine alimentaire dans le monde (WHO, 2008). L'intensification des pratiques agricoles actuelles comme les systèmes d'élevage, où certaines situations de stress, vécues par les animaux pendant leur transport et leur manipulation, affaiblissent leur système immunitaire et semblent responsables d'une augmentation de la contamination des produits finis (Bhunia, 2007). Le fait de rassembler des matières premières d'origine différentes, au cours d'une production à large échelle, peut augmenter aussi le risque de contamination des produits finis (Nyachuba, 2010). La globalisation du marché alimentaire et les échanges massifs de produits alimentaires à l'échelle mondiale, dans de mauvaises conditions d'hygiène, sont autant de facteurs qui contribuent à accroître l'incidence des maladies d'origine alimentaire (Kalyoussef et Feja, 2014). Le nombre limité de contraintes réglementaires et l'ignorance des bonnes pratiques d'hygiène peuvent aussi entraîner une détérioration de la qualité des produits alimentaires. L'évolution des habitudes alimentaires, comme, par exemple, une préférence pour les aliments frais et peu transformés, ou alors, à l'inverse, pour des aliments préparés pour lesquels le délai est de plus en plus long entre la transformation et la consommation, constitue un réel challenge sanitaire pour les industriels (Woteki et Kineman, 2003). Un autre élément important est la tendance croissante à consommer des aliments préparés en dehors du foyer. Cela expose les consommateurs aux risques potentiels d'une mauvaise hygiène dans les établissements de restauration où ils se rendent (WHO, 2008). En effet, la sécurité sanitaire des aliments, en raison de son coût, est parfois oubliée par la restauration commerciale et aussi par l'industrie agroalimentaire.

De plus, l'accroissement et les changements démographiques ont eu pour effet d'augmenter le groupe de personnes à risque du point de vue de la santé (Newell et al., 2010). On le nomme 'YOPI' pour « les enfants (Young), les personnes âgées (Old), les femmes enceintes (Pregnant) et les personnes immunodéprimées (Immunodeficient) » (Bhunia, 2007). Enfin, on assiste à l'émergence d'une part, de bactéries résistantes aux substances antimicrobiennes et d'autre part, de nouveaux agents pathogènes incriminés

dans les maladies d'origine alimentaire qui, dans le passé, n'étaient pas liées à l'alimentation.

Les maladies d'origine alimentaire sont contractées à la suite de l'ingestion de nourriture ou de boissons contaminées soit par des microorganismes pathogènes, incluant les virus, les bactéries, les parasites et les moisissures, soit par des toxines issues de ces microorganismes, des substances chimiques (métaux lourds, pesticides etc) (**Tewari et Abdullah, 2015**). Le déclenchement d'une maladie d'origine alimentaire dépend moins de la nature de l'aliment que des conditions dans lesquelles il a été cultivé ou produit, récolté, préparé, emballé et conservé (**WHO, 2017**). Selon la nature de l'agent causal, les maladies d'origine alimentaire peuvent se différencier en intoxication, intoxication, infection ou toxi-infection (**Corpet, 2014**). Les intoxications interviennent à la suite de la consommation d'aliments contenant des composés chimiques toxiques ou des catabolites toxiques comme l'histamine résultant de la dégradation de ces aliments par des bactéries. Quant à elles, les intoxications découlent de la prise de denrées alimentaires contenant des toxines bactériennes, même en l'absence de bactéries vivantes. Pour leur part, les infections résultent de l'ingestion de microorganismes viables dans la nourriture et qui vont envahir la muqueuse intestinale, s'y multiplier et perturber sa physiologie (**Cliver et Riemann, 2002**).

Plus de 200 maladies d'origine alimentaire étaient déjà répertoriées (**OMS, 2018**). Les manifestations cliniques de ces maladies sont diverses et les plus communes sont caractérisées par celles d'une gastro-entérite (nausées, vomissements, crampes abdominales, diarrhées, et parfois fièvre et maux de tête) légère à aiguë (**Mead et al., 1999**). Mais il existe aussi des cas plus graves comportant des complications telles que des insuffisances rénales et hépatiques, des troubles neurologiques ainsi que des fausses couches et des malformations congénitales (**Altekruse et al., 1997**). Ces complications peuvent mener à la mort de la personne (**Painter et al., 2013**). Les maladies transmises par les aliments dont l'eau touchent 600 millions de personnes et font 420000 (1 %) morts par an (**OMS, 2015**).

Chaque année, de nombreux foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sont rapportés partout dans le monde (**WHO, 2015**). Une TIAC prend place lorsqu'il y a apparition d'au moins deux cas groupés d'une symptomatologie similaire, en général gastro-intestinale, et dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire (**Delmas et al., 2010**). Comme en Europe, dans les pays du Maghreb, les TIAC sont des maladies à déclaration obligatoire. En 2014, un total de 5251 TIAC ont été signalées à

travers l'Europe (EFSA, 2015b). Une diminution de 17 % a été enregistrée en 2015 avec 4362 TIAC signalées, un nombre lui-même inférieur à celui de 4786 qui a été atteint en 2016.

En France, 1310 foyers de TIAC ont été déclarés en 2017, affectant 13010 personnes, dont 646 (soit 5%) se sont présentées à l'hôpital (hospitalisation ou passage aux urgences) et 6 personnes (soit 0,05%) sont décédées. Le nombre de foyers déclarés en 2017 a diminué de 10 % par rapport à 2016 (InVS, 2017).

En Tunisie, en 2013, le nombre de TIAC déclarées à la Direction des Soins de Santé de Base au Ministère de la Santé s'est élevé à 47 foyers. L'ensemble de ces foyers a totalisé 539 personnes dont 36 ont été hospitalisées (

<https://www.proalimentarius.com/article/toxi-infections-alimentaires-collectives>).

Cette même année s'est caractérisée par une légère augmentation des TIAC par rapport à l'année 2010, où 45 foyers avaient été recensés, affectant 410 personnes (<https://www.tunisienumerique.com/tunisie-410-cas-dintoxication-alimentaire-recensees-en-2011/>).

En 2015 et 2016, la majorité des TIAC recensés en Europe et dont l'agent étiologique était connu a été associée à des bactéries qui agissent directement ou par l'intermédiaire de toxines (EFSA, 2016, 2017).

Dans plus de 90 % des cas, l'agent causal est soit *Salmonella*, soit *Campylobacter* (EFSA, 2016, 2017). La deuxième cause de TIAC est due aux toxines bactériennes, dont un tiers sont des toxines du groupe *B. cereus*, d'après les données de 2015 (EFSA, 2016). Ensuite, la troisième position revient aux virus, suivis par d'autres agents, incluant les agents chimiques, l'histamine, la lectine, les biotoxines marines et les toxines de champignon et enfin par les parasites (EFSA, 2016, 2017). En France, les agents responsables les plus fréquemment incriminés ou suspectés sont *Salmonella spp* (35 % des foyers), *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* et *B. cereus* (InVS, 2017). Si l'on se focalise sur les pays du Maghreb, les agents impliqués dans les TIAC sont *Salmonella ssp*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *C perfringens* (Anonyme, 2011; Aoued et al., 2010; Mouffok, 2011).

Les TIAC ont fait l'objet de nombreuses études, de suivis épidémiologiques et de recherche des sources et des agents responsables. Ces suivis consistent à remonter jusqu'à la source du problème et d'éviter que celui-ci ne se reproduise, en mettant en place des mesures préventives et des contrôles ou en adaptant l'existant (Vaillant et al., 2012). Dans un tiers des cas de TIAC, l'agent causal demeure inconnu et le diagnostic se limite

à la suspicion symptomatologique, ce qui entrave le contrôle et la maîtrise de ces contaminations. En raison de ces problèmes de diagnostic ainsi que de l'absence de notification et/ou de notification tardive, surtout en cas de symptômes légers, le nombre de cas de TIAC reste toujours sous-estimé par rapport aux cas effectivement survenus (**Brücker, 2003**). En effet, les TIAC ne sont déclarées que suite à des complications assez graves.

Le coût engendré par les toxi-infections alimentaires (TIA) est considérable et ce, tant au niveau humain que financier (**WHO, 2015**). Il semble dès lors très important de poursuivre la surveillance des maladies d'origine alimentaire et de continuer à mettre en oeuvre des mesures de prévention. Pour ce faire, il est essentiel d'avoir une bonne compréhension des agents associés aux TIA, ce qui passe nécessairement par leur étude.

2. Le groupe *Bacillus cereus*

2.1. Historique et incidence de *B. cereus* en tant que pathogène alimentaire

En 1887, Grace et Percy Frankland ont isolé pour la première fois une souche de *B. cereus* dans l'air d'une étable au Royaume-Uni (**Frankland et Frankland, 1887**). Cette souche isolée, appelée ATCC14579, sert encore de souche de référence aujourd'hui. Suite à sa découverte en 1887, le caractère pathogène de cette bactérie a été décrit pour la première fois en 1937, après la mort d'un cochon d'Inde ayant subi une injection d'une suspension de *B. cereus* (**Clark, 1937**). La première preuve d'une implication de *B. cereus* dans une TIAC remonte au début des années 1950. En effet, Steinar Hauge enquêta sur quatre TIAC en Norvège entre 1947 et 1949 qui ont affecté 600 personnes qui présentaient des maux de ventre ainsi que des nausées et des diarrhées. L'aliment incriminé était une crème à la vanille préparée à partir d'amidon de maïs fortement contaminé par *B. cereus*. Pour fournir les preuves que cette bactérie était bien la cause de ces TIAC, Hauge inocula une crème vanille à 10^4 cellules de *B. cereus* par mL et la servit à 16 personnes qui ont toutes présenté les symptômes de cette maladie diarrhéique (**Hauge, 1950**). Depuis, plusieurs épisodes diarrhéiques liés à *B. cereus* ont été décrits, liés à différents aliments comme des sauces, des soupes, des légumes, des viandes, des épices, des pâtes, du riz, ... (**Cadel Six et al., 201, 2014 ; EFSA, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015a, 2015b; Stenfors Arnesen et al., 2008**). En 1971, Le syndrome émétique dû à *B. cereus* a été décrit lors de maladies accompagnées de vomissements après l'ingestion de riz frit provenant de restaurants chinois au Royaume Uni (**Mortimer et McCann, 1974**).

Suite à ces événements, *B. cereus* a été considéré comme agent causal responsable de maladies d'origine alimentaire. Plusieurs pays ont enregistré des cas d'épidémies alimentaires associées à *B. cereus*. En effet, les États Unis et l'Angleterre ont enregistré 235 cas (MMWR, 2013) et 130 cas (HPA, 2012), respectivement, dans la même période (de 1998 à 2008). Les États membres de l'Union Européenne ont signalé, dans la période de 2007 à 2014, 413 foyers de TIAC à *B. cereus*, qui ont touché 6 657 personnes et donné lieu à 352 hospitalisations, aucun décès n'ayant été rapporté (EFSA Panel on Biological Hazards, 2016). En 2015, cette bactérie était impliquée dans 6,8 % des TIAC en Europe (EFSA Panel on Biological Hazards, 2016). En 2017, *B. cereus* était le deuxième agent suspecté dans 264 foyers de TIAC en France juste derrière *Staphylococcus aureus* (323 foyers) et devant le genre *Salmonella* (120 foyer) (InVS, 2017). Comme *B. cereus* ne figure pas dans la liste des bactéries à l'origine de TIAC recherchées dans les pays du Maghreb, aucun cas de TIAC associé à cette bactérie n'a été enregistré (REM, 2009; Mouffok, 2011). Cependant, deux cas suspectés épidémiologiquement, causés par *B. cereus*, ont été rapportés à Bizerte – Tunisie (2010-2011) (Anonyme, 2011). En outre, certains travaux ont permis d'isoler des souches de *B. cereus* à partir d'aliments incriminés dans des maladies d'origine alimentaire, surtout au Maroc (Merzougui et al., 2013b) et en Tunisie (Aouadhi et al., 2013). L'incidence réelle de *B. cereus* en tant que pathogène alimentaire reste difficile à évaluer pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les maladies d'origine alimentaire causées par *B. cereus* ne sont pas à déclaration obligatoire et sont donc probablement sous-estimées dans les décomptes officiels. Ensuite, la courte durée et la bénignité des symptômes liés à l'ingestion de *B. cereus* et/ou ses toxines font rarement l'objet d'un avis médical. Les TIAC dues à *B. cereus* ne sont ainsi généralement pas signalées. Enfin, les symptômes associés à ces TIAC peuvent être confondus avec ceux causés par d'autres pathogènes tels que *Clostridium perfringens* ou *Staphylococcus aureus* (Ehling-Schulz et al., 2004a).

2.2. Caractéristiques et taxonomie

B. cereus sensu lato, aussi couramment appelé le groupe *B. cereus*, appartient à la famille des Bacillées (*Bacillaceae*) et au genre *Bacillus*. Il est constitué de bactéries à coloration de Gram positive, à grande taille (>1.0 µm) ayant la forme de bâtonnets, parfois organisés en chaînette, aéro-anaérobies facultatifs et sporogènes. D'autres caractéristiques pouvant différencier les espèces du genre *Bacillus* sont la motilité, l'activité hémolytique, la production de lécithinase et la fermentation de certains hydrates de carbone (le groupe *B.*

cereus ne fermente pas le mannitol) (Stenfors Arnesen et al., 2008). La température optimale de croissance du groupe *B. cereus* se situe entre 28 °C et 37 °C (US FDA/CFSAN, 2006; WHO, 2008). Cependant, la gamme de températures de croissance varie en fonction de l'espèce étudiée et s'étend de 4 °C à 53 °C. On peut donc distinguer des souches psychrotolérantes, d'autre mésophiles et d'autres thermotolérantes au sein du groupe *B. cereus* (Guinebretière et al., 2008).

Le groupe *B. cereus* comprend 7 espèces génétiquement proches. Les études, concernant les ADNr 16S, estiment à environ 99% l'homologie existant entre les espèces *B. anthracis*, *B. cereus sensu stricto* et *B. mycoïdes*. S'agissant de l'ADN génomique, cette homologie s'élève à plus de 80% entre ces trois espèces par la technique hybridation ADN- ADN (Ash et al., 1991; Harrell et al., 1995; Seki et al., 1978).

La classification des bactéries de ce groupe était initialement basée sur des caractères phénotypiques (Tableau 1). Cependant, cette classification est très controversée car les caractéristiques phénotypiques discriminantes entre les différentes espèces ne sont pas stables et leurs déterminants génétiques peuvent être échangés, y compris au sein de matrices alimentaires (Van der Auwera et al., 2007), ce qui complique fortement l'identification des espèces appartenant à ce groupe. Ainsi, les analyses de routine effectuées en laboratoire ne permettent pas de différencier avec certitude certaines espèces du groupe. Pour des raisons cliniques ou économiques, les espèces distinctes décrites dans la bibliographie sont actuellement maintenues.

- ***B. cereus sensu stricto*** aussi appelé *B. cereus* : reconnu comme agent causal de maladies d'origine alimentaire, classées en deux types de syndromes. Il s'agit du syndrome émétique et du syndrome diarrhéique (Granum, 1994). *B. cereus sensu stricto* n'est pas qu'un contaminant alimentaire. Il est également associé à diverses infections, locales et systémiques comme la septicémie et l'endophtalmie chez les patients immunodéficients (Bottone, 2010; Logan, 2012). En effet, *B. cereus sensu stricto* constitue l'une des trois espèces du groupe dont certaines souches sont pathogènes pour l'être humain, les deux autres étant *B. anthracis* et *B. cytotoxicus* (Lindbäck et Granum, 2015). L'espèce *B. cereus sensu stricto* ne comprend pas que des souches pathogènes. En effet, des souches de *B. cereus sensu stricto*, utilisées en tant que probiotiques (John et al., 2015), sont des suppléments alimentaires qui auraient des effets positifs sur la microflore intestinale chez l'Homme et d'autres animaux (Fuller 1989, 1991).

- ***B. anthracis***: responsable de la maladie du charbon (Mock et Fouet, 2001). La maladie se présente sous trois formes distinctes : pulmonaire, gastro-intestinale et cutanée. Son

pouvoir pathogène est lié à la présence de deux facteurs de virulence qui sont la toxine tripartite et la capsule, codées par des gènes respectivement localisés sur deux grands plasmides, pXO1 et pXO2 (**Ramisse et al., 1996**). *B. anthracis* se distingue des autres membres du groupe *B. cereus* par son absence de mobilité, sa production de capsule, sa sensibilité à la pénicilline et son absence d'activité hémolytique (**Vilas-Boas et al., 2007**).

- ***B. thuringiensis***: cette espèce est utilisée massivement comme agent de lutte biologique en agriculture (**Schnepf et al., 1998**). Elle synthétise un cristal parasporal, contenant des δ -endo-toxines létales pour les insectes. Les δ -endo-toxines produites comprennent des protéines « crystal » (Cry), qui sont les facteurs de virulence obligatoires et des protéines « cytolytic » (Cyt). De plus, *B. thuringiensis* produit des protéines « Vips » (vegetative insecticidal proteins) qui sont sécrétées dans le milieu durant la phase végétative de croissance. Les gènes qui codent ces protéines sont portés par de grands plasmides (**Bravo et al., 2011; Palma et al., 2014; Vachon et al., 2012; Zheng et al., 2017**). *B. thuringiensis* possède des similarités phénotypiques avec *B. cereus sensu stricto*, incluant la mobilité, l'activité hémolytique et la résistance à l'ampicilline. La seule caractéristique qui permet de différencier ces deux espèces est la présence d'inclusions cristallines protéiques chez *B. thuringiensis*. Compte-tenu de la similarité taxonomique de *B. thuringiensis* et de *B. cereus sensu stricto*, certaines infections alimentaires généralement attribuées à *B. cereus sensu stricto* ont pu avoir été causées par *B. thuringiensis* (**Rosenquist et al., 2005**). Outre les maladies d'origine alimentaire, *B. thuringiensis* a aussi été associé à d'autres infections touchant l'être humain, telles que la nécrose de tissus associés à des plaies, des infections oculaires et des périodontites (**Callegan et al., 2006; Helgason et al., 2000a; Hernandez et al., 1999**).

- ***B. weihenstephanensis***: elle est caractérisée par sa capacité à croître à des températures comprises entre 4 °C et 7 °C et son incapacité à croître au-delà de 42 °C (**Lechner, et al., 1998**). De plus, elle possède des séquences signatures spécifiques au niveau du gène *ARNr 16S* et du gène *cspA* qui code la protéine majeure de réponse à un stress au froid (**Lechner et al., 1998**). Néanmoins, il a été montré que certaines souches psychrotolérantes du groupe *B. cereus* n'appartiennent pas à l'espèce *B. weihenstephanensis* (**Bartoszewicz et al., 2009; Stenfors et Granum, 2001**). De plus, il a été montré que certaines souches ayant la capacité de se développer à 43 °C possèdent la signature *cspA* (**Bartoszewicz et al., 2009; Lechner et al., 1998; Stenfors et Granum, 2001**). Bien qu'à ce jour et à notre connaissance, *B. weihenstephanensis* n'ait jamais été identifiée comme étant à l'origine de TIAC, certaines souches peuvent produire les toxines décrites chez *B. cereus sensu*

stricto (Stenfors et al., 2002). Une étude menée par Thorsen et al. (2006) a montré que certaines souches de *B. weihenstephanensis* hébergent les gènes relatifs à la production du céréulide similaire aux souches émétiques de *B. cereus sensu stricto* et pouvant être actifs à 7 °C. Baron et al. (2007) ont montré qu'une souche de *B. weihenstephanensis* isolée d'ovoproduits altérés était capable de produire des toxines, même à faible température. En outre, cette espèce est connue pour causer des problèmes dans l'industrie en raison de sa capacité à altérer les aliments et en particulier les aliments réfrigérés (Baron et al., 2007; Hoton et al., 2009; Samapundo et al., 2011a; Stenfors et al., 2002; Thorsen et al., 2009).

- ***B. mycoides* et *B. pseudomycoides***: ces espèces ont la particularité d'être des bactéries saprophytes, non mobiles et dont la morphologie des colonies est à croissance rhizoïdale (Figure 1). Outre cette distinction phénotypique avec les autres espèces du groupe *B. cereus*. La composition en acides gras de leurs parois permet de distinguer ces deux espèces des cinq espèces du groupe *B. cereus* mais aussi entre elles (Nakamura, 1998). Un autre moyen pour distinguer ces deux espèces est la capacité que possède *B. mycoides* à produire de l'acétanilide (Jensen et al., 2003; Nakamura, 1998; Nakamura et Jackson, 1995). Ces bactéries ne sont pas, jusqu'à présent, reconnues comme des agents pathogènes pour l'Homme contrairement à la plupart des autres membres du groupe *B. cereus* (Guinebretière et al., 2008).

- ***B. cytotoxicus***: cette espèce est décrite en 2013 (Guinebretière et al., 2013). *B. cytotoxicus* se distingue des autres espèces du groupe par son incapacité à croître à des températures inférieures à 17 °C. Cependant, elle est capable de se multiplier à des températures entre 48 °C et 53 °C, c'est une espèce thermotolérante (Auger et al., 2008; Guinebretière et al., 2013). *B. cytotoxicus* constitue l'une des trois espèces du groupe connues pour être pathogène pour l'Homme (Auger et al., 2008; Guinebretière et al., 2013). La pathogénicité particulièrement élevée de cette souche a été attribuée à la production d'une nouvelle toxine, formeuse de pores, appelée cytotoxine K-1 (CytK-1) (Fagerlund et al., 2004; Lapidus et al., 2008; Lund et al., 2000). Cette toxine est responsable de la lyse des cellules épithéliales dans l'intestin, provoquant alors une diarrhée (Guinebretière et al., 2010; Hardy et al., 2001).

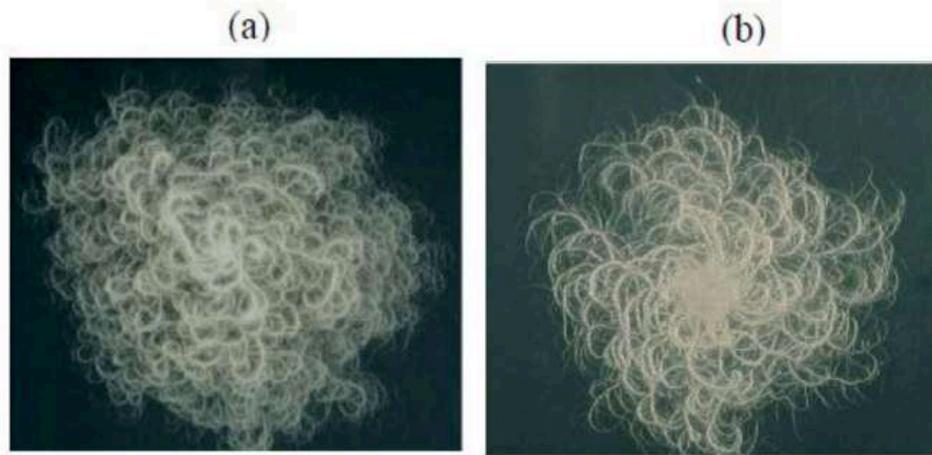


Figure 1: Colonies de *B. mycoides* (Di Franco et al., 2002). Les colonies sont formées par des cellules bacillaires reliées bout à bout et formant des filaments qui fonctionnent comme des faisceaux, avec une direction de courbure génétiquement déterminée.

(a): Les colonies s'étendent dans le sens des aiguilles d'une montre. **(b):** Les colonies s'étendent avec une courbure opposée (dans le sens inverse des aiguille d'une montre).

Tableau 1: Principaux caractères communs et distinctifs des espèces du groupe *B. cereus* (Biomérieux, 2016; Guinbretière et Sanchis, 2003).

Caractère ^a	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. pseudomycooides</i>	<i>B. cytotoxicus</i>
Lécithinase	+	+	+	+	+	+F	+F
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-
Croissance en anaérobiose	+	+	+	+	+	+	+F
Résistance au lysosymes	+	+	+	+	+	+	+
Fermentation de glucose	+	+	+	+	+	+	+
Réaction VP	+	+	+	+	+	+	+
CC Réduction des nitrates	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
oxydase	-	-	-	-	-	-	-
Production d'indole	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	+	+	+	+	+	+	+
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+
Hémolyse	+	+	+	+	+	+	+
Colonies rhizoïdales	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à T° < 7°C et absence de croissance à 43°C	-	-	-	-	-	-	-
T° min de croissance	10°C	10°C	>10°C	4°C	5°C	10°C	17°C
T° max de croissance	45°C	45°C	<50°C	37°C	37°C	40°C	53°C
CD Cristal parasporal	-	+	-	-	-	-	-
Sensibilité à la pénicilline	-	-	+	-	-	-	-
Toxines impliquées dans la maladie du charbon	-	-	+	-	-	-	+
Entérotoxines	+	+	+	+	+	+	+

^aCC: Caractères communs ^bCD: Caractères distinctifs F: Faiblement positif ND: Non déterminé

En conclusion, la classification du groupe *B. cereus*, basée sur des caractères phénotypiques et/ou sur leurs facteurs de virulence, mènent à plonger la compréhension de ce groupe au cœur de nombreuses confusions. Ceci est illustré par le fait qu'au sein du groupe *B. cereus*, il existe des souches psychrotolérantes qui ne sont pas des *B. weihenstephanensis* (Bartoszewicz et al., 2009; Stenfors et Granum, 2001). De plus, des facteurs de virulence, codés par des gènes qui sont portés par des plasmides et étant connus pour être spécifiques à une espèce, ont été découverts dans d'autres espèces du groupe (Van der Auwera et al., 2007; Zwick et al., 2012).

En outre, certaines méthodes moléculaires actuelles comme les combinaisons de typage par séquençage multilocus (MLST) (Oh et al., 2012) ainsi que la comparaison de génomes complets (Liu et al., 2015), ont démontré que cette classification est sujette à de nombreuses controverses, en raison de la grande proximité génotypique entre les différentes espèces de ce groupe. En effet, les membres de chaque espèce peuvent être mélangés, ce qui conforte l'idée que les différents taxons devraient être vus comme une seule espèce (Priest et al., 2004). C'est pourquoi on a pu assister dernièrement, à de nombreuses propositions quant à l'ajout de nouvelles espèces au sein du groupe, comme *B. toyonensis* (Jiménez et al., 2013; Pfrunder et al., 2016), *B. wiedmannii* (Miller et al., 2016), *B. gaemokensis* (Jung et al., 2010), *B. bingmayongensis* (Liu et al., 2014) et *B. manliponensis* (Jung et al., 2011).

Afin de mieux s'entendre sur le périmètre de ce groupe bactérien, une classification a été proposée par Guinebretière et al. (2008). Elle a permis d'élaborer des hypothèses phylogénétiques robustes à propos des relations évolutives entre les différents membres du groupe. Cette classification est basée sur des données moléculaires (les profils AFLP, les séquences des gènes ribosomiaux et la séquence du gène *panC*) ainsi que sur des données descriptives et phénotypiques, comme la gamme de températures de croissance et les niches thermiques. Dans une étude ultérieure, Guinebretière et al. (2010) ont montré qu'un séquençage partiel du gène de ménage *panC* permettait d'affecter précisément une souche de *B. cereus sensu lato* à son groupe phylogénétique. Les différentes espèces du groupe *B. cereus* mentionnées précédemment se répartissent ainsi en sept groupes phylogénétiques (I-VII) (Tableau 2). Selon cette classification, une espèce peut être présente dans plusieurs groupes à la fois. En effet, l'espèce *B. cereus sensu stricto* se retrouve à la fois dans les groupes II, III, IV et V, tandis que l'espèce *B. thuringiensis* est observée dans les groupes II, III, IV, V et VI. Cependant, les espèces *B. pseudomycooides*, *B. anthracis* et *B. cytotoxicus* se retrouvent uniquement dans les groupes

I, III et VII, respectivement. Les espèces *B. weihenstephanensis* et *B. mycoides* correspondent au groupe VI. Ainsi, cette classification révèle la complexité du groupe *B. cereus*. Chaque groupe est caractérisé, en outre, par un profil thermique de croissance particulier et par des capacités de virulence spécifique (Thorsen et al., 2015). On trouve un groupe thermophile (VII) dont la température de croissance varie de 17 °C à 53 °C, deux groupes mésophiles (III, IV) dont les gammes de températures de croissance sont respectivement comprises entre 15 et 45 °C et 10 et 45 °C, deux groupes intermédiaires (I, V) ayant des températures de croissance comprises entre 10 et 43 °C et 8 et 40 °C, respectivement et enfin deux groupes psychrotrophes (II, VI). Ces deux groupes psychrotrophes se différencient par leur gamme de températures de croissance : Les souches du groupe II sont incapables de croître à des températures inférieures à 7 °C mais elles le peuvent jusqu'à 40 °C, alors que celles du groupe VI sont capables de croître dès 5 °C mais sont incapables de le faire au-delà de 37 °C. Un autre moyen pour distinguer ces deux groupes est la présence de la signature de psychrophilie dans la séquence du gène *cspA*. En effet, seules les souches du groupe VI la possèdent. Le groupe phylogénétique VII serait le plus proche d'un ancêtre commun. En effet, Guinebrière et al. (2008) suggèrent que *B. cereus sensu lato* soit issu d'un ancêtre thermophile et qu'il évolue vers la psychrophilie. La coexistence de deux groupes psychrotrophes, les groupes II et VI, indique que *B. cereus sensu lato* a subi des évolutions, lui permettant une adaptation à de nouvelles niches écologiques. Les souches appartenant au groupe VI sont plus fortement marquées par le caractère psychrotrophe que les souches du groupe phylogénétique II. Ces dernières semblent être en cours de différenciation des groupes mésophiles. Les souches impliquées dans des cas de TIAC sont regroupées majoritairement dans les groupes III, IV et VII. Les souches psychrotrophes du groupe VI n'ont pas été associées à des TIAC et possèdent un faible potentiel cytotoxique *in vitro* (Cadot et al., 2010). Certaines souches du groupe VI pourraient toutefois héberger des gènes qui coderaient la toxine émétique (Thorsen et al., 2006). Comme ces gènes sont portés par le plasmide pCERE01 (Hoton et al., 2005), ils pourraient être transférés d'une souche à une autre (Van der Auwera et al., 2007; Zwick et al., 2012). Au contraire du groupe VI, le groupe phylogénétique II regroupe des souches isolées de TIAC. Il existe donc un risque d'émergence de souches psychrotolérantes capables de produire des toxines aux températures de réfrigération. De plus, l'espèce *B. cytotoxicus*, qui correspond au groupe phylogénétique VII, est connue pour être pathogène pour l'Homme (Auger et al., 2008; Guinebrière et al., 2013). La pathogénicité particulièrement

élevée de cette souche a été attribuée à la production de la cytotoxine K-1 (CytK-1) (Fagerlund et al., 2004; Lapidus et al., 2008; Lund et al., 2000).

2.3. La contamination des produits alimentaires par le groupe *B. cereus*

Le groupe *B. cereus* peut être qualifié d'ubiquitaire car on le retrouve dans un grand nombre d'environnements. On a pu isoler des souches du groupe *B. cereus* à partir d'échantillons d'eau douce ou salée, d'air, de sols, de plantes, d'animaux (Pignatelli et al., 2009) et d'une large gamme d'aliments, allant d'aliments réfrigérés à des aliments déshydratés (Guinebrière et al., 2008; Merzougui et al., 2013b, 2014). Les sols constituent le réservoir primaire de cette bactérie. De ce fait, le groupe *B. cereus* est retrouvé, sous sa forme végétative ou sporulée, dans de nombreuses matières agricoles provenant du sol. En conséquence, de nombreuses contaminations alimentaires peuvent se manifester, soit directement sur le lieu de production de la matière première, soit durant les processus de fabrication des aliments en IAA, en raison de la forte capacité d'adhérence des spores sur les équipements, les rendant ainsi très difficiles à éliminer du procédé (Andersson et al., 1995). En outre, il peut y avoir une nouvelle contamination et/ou une sélection de certaines souches déjà présentes, durant le procédé de transformation et/ou au cours de la conservation des aliments. En effet, une conservation prolongée des aliments traités par la chaleur à des températures réfrigérées entraîne une croissance des souches psychrotrophes du groupe *B. cereus* qui ont résisté aux traitements thermiques. D'autres souches thermorésistantes peuvent supporter des températures supérieures à 55 °C et se multiplier rapidement au cours du refroidissement des aliments traités thermiquement.

Le groupe *B. cereus* est associé à plusieurs TIA liées aux produits céréaliers comme le riz et les pâtes (Cadel et al., 2012; Lee et al., 2009; Mortimer et McCann, 1974), les légumes et les fruits (Cadel et al., 2012; De Buyser et al., 2008; Stenfors Arnesen et al., 2008), les sauces et les soupes (Rosenquist et al., 2005), ainsi que les épices (Aksu et al., 2000; Kneifel et Berger, 1994). Contrairement à *Clostridium perfringens*, qui est généralement impliqué dans les TIA liées à la consommation de viandes et de produits carnés contaminés, le groupe *B. cereus* est le plus souvent décrit comme agent de TIA lié à la consommation de produits d'origine végétale (EFSA, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015a, 2015b). Le groupe *B. cereus* a été retrouvé sur de nombreux légumes présents dans un gaspacho (14 % des échantillons d'oignons et de courgettes, 33 %, 43 %, 90 % et 100 %

des échantillons de concombre, de carottes, de tomates et de poivres, respectivement (Valero et al., 2002). Même si les produits carnés restent moins fréquemment contaminés par le groupe *B. cereus*, Nortje et al. (1999) ont montré la présence de ces bactéries sur des échantillons de produits carnés transformés comme le salami et la saucisse, ainsi qu'à la surface de poulets rôtis. De plus, le groupe *B. cereus* a été mis en évidence dans des produits laitiers, comme des crèmes et des crèmes glacées, des poudres de lait ou encore du lait pasteurisé ou fermenté (EFSA Panel on Biological Hazards, 2016; Hauge, 1950; Wong et al., 1988).

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

La présence de *B. cereus sensu lato* dans les matrices alimentaires, soit sous forme végétative, soit sous forme sporulée, ne représente pas systématiquement un risque pour la santé des Hommes dans la plupart des cas. En effet les TIA liées à des souches pathogènes du groupe *B. cereus* sont le plus souvent associées à une charge bactérienne égale ou supérieure à 10^4 CFU/g ou mL d'aliments consommés (Food Standards Australia New Zealand, 2001). Néanmoins, des épidémies associées à des aliments contenant 10^3 CFU/g ou mL ont déjà été décrites (Gilbert et Kramer, 1986; Stenfors Arnesen et al., 2008). Les signes cliniques d'une maladie d'origine alimentaire, dont l'agent causal est *B. cereus*, sont généralement bénins et à résolution spontanée dans les 24 heures. En effet, la probabilité de répercussion indésirable grave est jugée faible. Cependant, si la maladie survient chez un sujet immunodéprimé, elle peut conduire à des complications sévères et même à la mort (Dierick et al., 2005; Granum, 2007; Mahler et al., 1997; Tatara et al., 2013). *B. cereus sensu lato* tire son pouvoir pathogène de sa capacité d'adaptation aux conditions environnementales et de sa capacité à sécréter des toxines. Selon la ou les toxine(s) produite(s), les souches pathogènes d'origine alimentaire du groupe *B. cereus* peuvent être à l'origine de deux types de maladies : le syndrome diarrhéique et le syndrome émétique (Granum, 1994). Le premier, causé par une ou plusieurs entérotoxines, se traduit par des diarrhées et des crampes abdominales, tandis que le second, causé par une toxine émétique, aboutit à des nausées et des vomissements. Leurs caractéristiques respectives sont reprises dans le **Tableau 3**. Les risques liés à l'ingestion de *B. cereus sensu lato* et/ou de leurs toxines dépendent fortement de la souche, du niveau de contamination et des modalités de préparation de l'aliment incriminé.

Tableau 2 : Classification du groupe *B. cereus* présentant les 7 groupes phylogénétiques et leur principales caractéristiques génétiques et écologiques (Guinebrerière et al., 2008, 2010).

Groupes	Espèces	Sous-groupes	Gamme de T° de croissance (°C)	Association à des TIA	% des souches comprenant					Résistance des spores ^a
					<i>hbl</i>	<i>CytK-2</i>	<i>CytK-1</i>	<i>nhe</i>	<i>ces</i>	
I	<i>B. pseudomycooides</i>	I-1 I-2	10-43 (Mésophiles intermédiaire)	Non	41 71	0 0	0	100	0	ND
II	<i>B. cereus II</i> <i>B. thuringiensis II</i>	II	7-40 (Psychrotolérantes) (Absence du gène <i>cspA</i>)	Oui	61	13	0	100	0	++
III	<i>B. cereus III</i> <i>B. thuringiensis III</i> Souches émétiques	III-1 III-2 III-3	15-45 (Mésophiles)	Oui	67 12 14	73 31 57	0	100	0 31 7	+++
	<i>B. anthracis</i> <i>B. cereus III-4</i> <i>B. thuringiensis III-4</i>	III-4			14	39			0	
IV	<i>B. cereus IV</i> <i>B. thuringiensis IV</i>	IV-1 IV-2 IV-3	10-45 (Mésophiles)	Oui	97 97 86	79 97 79	0	100	0	++
V	<i>B. cereus V</i> <i>B. thuringiensis V</i>	V	8-40 (Mésophiles intermédiaires)	Oui	88	6	0	100	0	++
VI	<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycooides</i> <i>B. thuringiensis VI</i>	VI-1 VI-2	5-37 (Psychrotolérantes) (Présence du gène <i>cspA</i>)	Non	83 60	0 0	0	100 100	0	+
VII	<i>B. cytotoxicus</i>	VII	17-53 (Thermotolérantes)	Oui	0	0	100	100	0	+++

ND: Non déterminé

^aClassement établi par Afchain et al. (2008); Carlin et al. (2006, 2010)

Tableau 3: Caractéristiques des deux types de maladies d’origine alimentaire liées au groupe *B. cereus* (Stenfors Arnesen et al., 2008).

Caractéristiques	Syndrome diarrhéique	Syndrome émétique
Toxines produites	Entérotoxine(s)	Céréulide
Lieu de production	Intestin grêle de l’hôte	Préformée dans l’aliment
Dose infectieuse	10 ⁵ - 10 ⁸ CFU	8-10 µg/kg de masse corporelle
Temps d’incubation	8-16 h	0,5-6 h
Durée de l’infection	12-24 h	6-24 h
Symptômes	Crampes abdominales, diarrhées profuses	Nausées, vomissements et malaises
Aliments impliqués	Produits carnés, soupes, légumes, sauces, lait et produits laitiers	Riz cuisiné ou frit, pâtes et nouilles

2.4.1. Syndrome diarrhéique

Le syndrome diarrhéique fait suite à la consommation d’aliments contaminés par des spores et/ou des cellules végétatives de *B. cereus* (Stenfors Arnesen et al., 2008). Les aliments riches en protéines tels que les viandes, les légumes, les sauces et les produits laitiers sont le plus souvent liés à ce type de syndrome (Stenfors Arnesen et al., 2008). Suite à leur ingestion, comme le montre la **Figure 2**, les spores et/ou cellules végétatives qui ont survécu au passage de l’estomac vont reprendre leur croissance et produire des entérotoxines au niveau de l’intestin grêle de l’hôte (Clair et al., 2010). Les souches diarrhéiques du groupe *B. cereus* agissent par un mécanisme de toxi-infection qui est un processus classiquement observé chez d’autres bactéries entériques avec plusieurs phases successives (Granum et Lund, 1997) : (i) une mobilité flagellaire, orientée par le chimiotactisme, qui permet à la bactérie de se rapprocher des cellules intestinales. (ii) une adhésion aux cellules intestinales. (iii) une multiplication cellulaire directe ou après germination s’il s’agit d’une cellule végétative ou d’une spore, respectivement. (iv) une production de toxines. Le transit des cellules dans l’estomac dure au minimum 6 heures et 4 heures dans l’intestin grêle (Granum et al., 1995). Les symptômes liés à ces entérotoxines se traduisent par des douleurs, des crampes abdominales et une diarrhée profuse (Stenfors Arnesen et al., 2008). Ces symptômes surviennent 8 à 16 heures après l’ingestion d’aliments contenant entre 10⁵ et 10⁸ cellules ou spores/g et durent au maximum une journée (Stenfors Arnesen et al., 2008).

L’ingestion de toxines diarrhéiques préformées dans les aliments n’est que rarement directement à l’origine d’intoxinations (Bourgeois et Larpent, 1996). En effet, ces

toxines sont thermolabiles et ne résistent ni aux enzymes protéolytiques ni au pH acide lors du passage dans l'estomac (**Dromigny, 2008**).

Les entérotoxines responsables du syndrome diarrhéique causé par les bactéries du groupe *B. cereus* ne sont pas clairement identifiées. En effet, divers entérotoxines sont proposées comme étant la cause du syndrome diarrhéique : HBL, NHE, BceT, EntFM et CytK (**Tableau 4**). Cependant, les candidates les plus probables sont les entérotoxines HBL, NHE et CytK (**Guinebertière et al. 2002; Granum, 2007; Samapundo et al., 2011b; Stenfors Arnesen et al., 2008**). Les gènes codant pour ces entérotoxines sont retrouvés dans quasiment tous les groupes phylogénétiques composant le groupe *B. cereus sensu lato* (**Guinebretière et al., 2008; Guinebretiere et al., 2010**), avec des prévalences différentes selon les toxines (**Tableau 2**). D'autres facteurs de virulence, tels que d'autres hémolysines et diverses enzymes peuvent aussi contribuer à la pathogénicité des bactéries du groupe *B. cereus*. Actuellement, on ne sait toujours pas si le syndrome diarrhéique est causé par l'une de ces molécules ou par la combinaison et l'action synergique de plusieurs toxines et enzymes hydrolytiques (**Bottone, 2010; Castiaux et al., 2016; Doll et al., 2013; Haug et al., 2010; Stenfors Arnesen et al., 2008**).

L'hémolysine BL (HBL): c'est un complexe protéique composé de trois sous-unités comprenant deux composants lytiques, L2 et L1 codées respectivement par les gènes *hblC* et *hblD* et la protéine de liaison B, codée par le gène *hblA* (**Beecher et Macmillan, 1990, 1991; Granum et al., 1993; Heinrichs et al., 1993; Ryan et al., 1997**). Un quatrième composant, HblB, dont la fonction est inconnue, codé par le gène *hblB*, est produit chez la souche ATCC 14579 (**Clair et al., 2010**). Les 3 composantes du HBL sont secrétées indépendamment pendant la phase exponentielle de croissance, avec un maximum en fin de phase (**Dromigny, 2008**). Cependant, la combinaison des trois composantes est nécessaire à l'activité biologique maximale de la toxine. L'interaction des trois composantes avec les cellules d'épithélium de l'hôte entraîne la formation de pores transmembranaires qui conduit à la lyse cellulaire (**Ceuppens et al., 2011**). L'entérotoxine HBL est une toxine hémolytique, cytotoxique, dermonécrotique et elle entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire (**Beecher et Wong, 1997**).

L'entérotoxine non hémolytique (NHE): c'est un complexe protéique non hémolytique comprenant les protéines NheA, NheB et NheC, codées respectivement par les gènes *nheA*, *nheB* et *nheC* (**Granum et al., 1999; Moravek et al., 2004**). Contrairement à HBL, NHE ne dispose pas d'activité hémolytique, mais d'une autre activité toxique. La complexation des trois composantes de l'entérotoxine NHE est indispensable pour que

l'activité biologique de la toxine soit maximale (**Lund et Granum, 1996**). En outre, un ratio molaire entre NheA, NheB et NheC de 10:10:1, respectivement, permet d'atteindre une activité cytotoxique maximale sur les cellules épithéliales (cellules Vero) (**Lindbäck et al., 2004**). La faible quantité de NheC, par rapport à celle de NheA et de NheB, est due à la présence d'un atténuateur de transcription situé en amont du gène *nheC*. Cet élément stoppe la transcription 9 fois sur 10 (**Lindbäck et al., 2004, 2010**). Les modes d'action de HBL et NHE sont comparables (**Lund et Granum, 1997**). En effet, le complexe NHE entraîne la lyse cellulaire suite à la perturbation de l'intégrité des membranes plasmiques épithéliales par la formation de pores transmembranaires (**Fagerlund et al., 2008; Haug et al., 2010; Lindbäck et al., 2004**).

La cytotoxine K (CytK): contrairement aux toxines HBL et NHE, la cytotoxine K (CytK) n'est pas un complexe protéique tripartite mais une protéine simple de 34 kDa codée par le gène *cytK*. Elle possède une activité dermonécrotique, cytotoxique et hémolytique vis-à-vis de l'épithélium intestinal (**Hardy et al., 2001; Lund et al., 2000**). L'activité entérotoxique de CytK se traduit par la création de pores transmembranaires dans les cellules épithéliales de l'intestin (**Senesi et al., 2010**). En 1998, CytK a été mise en évidence pour la première fois comme étant à l'origine d'une TIAC en France. Elle a été isolée à partir de NVH391-98, la souche type de l'espèce *B. cytotoxicus* (**Lund et al., 2000; Ramarao et Sanchis, 2013; Samapundo et al., 2011b**). Initialement désignée CytK, cette protéine a été renommée CytK-1 après la découverte de CytK-2, un variant dont la séquence en acides aminés montre 89 % de similarité avec celle de CytK-1 (**Brillard et Lereclus, 2004; Guinebretière et al., 2006**). Le gène *cytK-1* correspondant au variant original n'est présent que chez *B. cytotoxicus* (groupe phylogénétique VII), tandis que le gène *cytK-2* est présent chez la majorité des souches des autres groupes phylogénétiques (**Brillard et Lereclus, 2004**). Ces caractéristiques constituent ainsi une méthode d'identification de *B. cytotoxicus* (**EFSA Panel on Biological Hazards, 2016**). Il a été montré que la cytotoxine CytK-1 est cinq fois plus toxique que la cytotoxine CytK-2 vis-à-vis de cellules épithéliales de type Caco-2 et Vero (**Fagerlund et al., 2004**).

L'entérotoxine T (BceT): c'est une protéine cytotoxique de 41 kDa, codée par le gène *bceT* (**Agata et al., 1995**). Cette entérotoxine n'est pas hémolytique mais elle présente une activité cytotoxique vis-à-vis de des cellules Vero. En effet, lorsqu'elle est administrée dans une anse iliaque ligaturée de souris, BceT augmente la perméabilité capillaire et provoque une accumulation de liquide. Cependant, la proposition du BceT comme entérotoxine diarrhéique a été désapprouvée après qu'il ait été suggéré que la

construction clonique du *bceT* était un artefact de clonage (Choma et Granum, 2002; Hansen et al., 2003). En effet, cette entérotoxine est dépourvue de séquence signal et elle serait libérée après une lyse des cellules bactériennes.

L'entérotoxine FM (EntFM): elle est constituée d'une seule sous-unité d'une masse moléculaire de 45 kDa. Cette entérotoxine semble identique à l'entérotoxine EntFM décrite par Asano et al. (1997) chez la souche FM1. Elle est inactivée par la trypsine, la pepsine, les pH acides et elle est thermolabile. Son pouvoir entérotoxique n'a cependant pas été démontré.

Autres facteurs de virulence: les autres facteurs de virulence spécifiques au groupe *B. cereus*, permettant l'établissement et le développement des infections comprennent d'autres hémolysines (céréolysine O, hémolysine II,...) et diverses enzymes. les métalloprotéases confèrent à la bactérie la capacité d'échapper aux macrophages, les phospholipases spécifiques de la phosphatidylcholine et du phosphatidylinositol, les sphingomyélinases et les collagénases (Beecher et al., 2000; Cadot et al., 2010; Gohar et al., 2002; Guillemet et al., 2010; Pomerantsev et al., 2003; Ramarao et Lereclus, 2005).

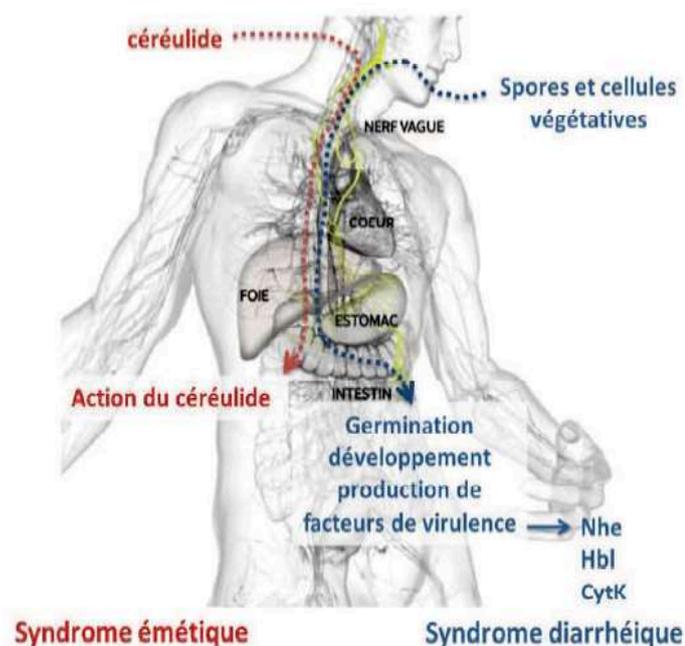


Figure 2: Schéma représentant les deux types de maladies d'origine alimentaire dues aux bactéries du groupe *B. cereus* (Guérin, 2016).

Tableau 4: Caractéristiques des différentes toxines du groupe *B. cereus*.

Toxines	Caractéristiques	Déterminants génétiques	Masse Moléculaire (kDa)	Toxicité	Kits de détection	Références
Hémolysine BL (HBL)	Protéine tripartite	B codée par le gène <i>hblA</i>	38		-	
		L1 codée par le gène <i>hblD</i>	38,5	Cellules Vero	-	Beecher et Wong, 1997
		L2 codée par le gène <i>hblC</i>	43,2		BCET-RPLA (Oxoid)	
Entérotoxine Non Hémolytique (NHE)	Protéine tripartite	NheA codée par le gène <i>nheA</i>	41		BDE-ELISA (Tecra)	Lund et Granum, 1996; Granum et al., 1999; Lindbäck et al., 2004
		NheB codée par le gène <i>nheB</i>	39,8	Cellules Vero	-	
		NheC codée par le gène <i>nheC</i>	36, 5		-	
Entérotoxine T (BceT)	Une seule protéine	codée par le gène <i>bceT</i>	41		-	Agata et al., 1995
Entérotoxine FM (EntFM)	Une seule protéine	codée par le gène <i>entFM</i>	45		-	Asano et al., 1997
Cytotoxine K (CytK)	Une seule protéine Variant 1 (CytK-1)	codée par le gène <i>cytK-1</i>	34	Cellules Vero et Caco-2	-	Lund et al., 2000; Fagerlund et al., 2004
	Une seule protéine Variant 2 (CytK-2)	codée par le gène <i>cytK-2</i>			-	Guinebretière et al., 2006
Céréulide	Dodécadepsipeptide Cyclique	codée par le cluster <i>ces</i>	1,2	Cellule Hep-2	-	Biesta-Peters et al., 2010

2.4.2. Syndrome émétique

Le syndrome émétique est le deuxième type de maladie d'origine alimentaire due au groupe *B. cereus*. Les souches responsables du syndrome émétique sont désignées « souches émétiques ». Néanmoins, plusieurs études montrent que ces souches produisent aussi les toxines diarrhéiques (Guinebretiere et al., 2010). Les souches émétiques sont assez rares dans l'environnement, représentant environ 1,5 % des souches de *B. cereus* isolées (Ceuppens et al., 2011; Hoton et al., 2009). Elles sont généralement mésophiles et appartiennent au groupe phylogénétique III (Carlin et al., 2006; Guinebretière et al., 2008; Guinebretiere et al., 2010).

Le syndrome émétique est caractérisé par une crise aiguë de nausées et de vomissements qui surviennent 0,5 à 6 heures après l'ingestion du repas incriminé (Ehling-Schulz et al., 2004a). Ces symptômes sont bénins et ne durent pas plus de 24 heures (Dromigny, 2008). Cependant, des complications, voire des cas de mort soudaine, sont toujours à craindre chez les individus fragiles en raison de la brutalité des vomissements (Mahler et al., 1997; Naranjo et al., 2011; Posfay-Barbe et al., 2008). La rapidité de l'apparition des symptômes suggère que la toxine est préformée dans l'aliment avant d'être ingérée (Agata et al., 2002; Ehling-Schulz et al., 2004a). L'agent étiologique du syndrome émétique est le céréulide, qui est un petit dodécapeptide cyclique de 1,2 kDa, constitué d'une séquence de deux acides aminés et de deux oxyacides répétée trois fois (D-O-Leu-D-Ala-D-O-Val-D-Val)₃ (Agata et al., 1994). Sa structure est présentée dans la **Figure 3**. Les matrices alimentaires le plus souvent associées au syndrome émétique sont riches en amidon, telles que les nouilles, les pâtes et le riz, et n'auraient pas été conservées dans des conditions de températures appropriées après leur cuisson (Kramer et Gilbert, 1989; Schoeni et Lee Wong, 2005). Les aliments contaminés ont des propriétés organoleptiques non modifiées malgré le nombre élevé de bactéries qu'ils hébergent (Agata et al., 1996; Pirttijärvi et al., 1999). En effet, les souches émétiques sont incapables d'hydrolyser l'amidon et, la plupart du temps, aucun impact de leur développement n'est noté sur le goût, l'odeur et l'aspect de l'aliment. La quantité de céréulide produite dépend des phases du cycle de vie de la souche, de la matrice alimentaire ainsi que de facteurs externes comme la température, le pH et la disponibilité en oxygène (Ehling-Schulz et al., 2004a; Häggblom et al., 2002; Jääskeläinen et al., 2004; Thorsen et al., 2009). La production du céréulide démarre à la fin de la phase exponentielle de croissance et atteint son maximum pendant la phase stationnaire de

croissance (**Thorsen et al., 2009**). La dose minimale de céréulide requise pour provoquer le syndrome se situe entre 8 et 10 ng de céréulide/ kg de masse corporelle (**Stenfors Arnesen et al., 2008**). Une telle quantité de céréulide peut être produite dans les aliments lorsque la charge microbienne atteint une concentration supérieure ou égale à 10^5 UFC/g (**EFSA Panel on Biological Hazards, 2005**). Sachant que les températures permettant la synthèse du céréulide sont comprises entre 12 et 37 °C, avec un maximum allant de 12 à 22 °C, une conservation trop longue de l'aliment à température ambiante peut permettre aux spores qu'il contient de germer et aux cellules végétatives de proliférer et d'atteindre rapidement ce seuil. Cependant, certaines souches psychrotolérantes appartenant au groupe phylogénétique VI (*B. weihenstephanensis*) ont été décrites comme émétiques et sont donc capables de se développer et de produire le céréulide à des températures comprises entre 4 °C et 7 °C (**Guinebretière et al., 2008; Guinebretiere et al., 2010; Thorsen et al., 2006**). Ces souches représentent un risque important au niveau de la sécurité microbiologique des denrées stockées au réfrigérateur. En effet, **Guérin et al. (2017)** ont montré que certaines souches psychrotolérantes de *B. cereus* sont capables de produire du céréulide à partir de 8 °C et cette production peut atteindre des concentrations pouvant causer des intoxications à partir de 10 °C.

Le céréulide est une molécule extrêmement stable, capable de résister à une large gamme de pH, allant de 2 à 11, à des traitements thermiques permettant d'éliminer les bactéries sous leur forme végétative (121 °C pendant 30 min) (**Pirhonen et al., 2005; Rajkovic et al., 2008a**) et à l'hydrolyse par des enzymes telles que la pepsine et la trypsine (**Agata et al., 1995; Agata et al., 2002; Rajkovic et al., 2008a; Shinagawa et al., 1996**). Le céréulide est ainsi difficile à éliminer de l'aliment et contamine directement l'individu au moment de l'ingestion, même si la bactérie n'est plus présente (**Stenfors Arnesen et al., 2008**). Une fois ingéré, il est très probable que le céréulide reste intact dans le tractus gastro-intestinal (**Figure 2**). En effet, il n'est détruit ni par l'acide gastrique ni par les enzymes protéolytiques du tractus intestinal (**Agata et al., 1994; Shinagawa et al., 1996**). Cette toxine serait capable de se lier, sous sa forme active, au récepteur 5-HT3 des terminaisons vagues du tube digestif entraînant une stimulation du nerf vague afférent et provoquant les vomissements (**Agata et al., 1995**). De plus, sa structure étant semblable à celle de la valinomycine produite par *Streptomyces tsusimaensis*, le céréulide agirait en provoquant la formation d'un canal ionophore spécifique au potassium (**Teplova et al., 2006**). Par conséquent, on assiste à une perturbation de l'activité mitochondriale des cellules hépatiques, par blocage de la phosphorylation oxydative, ce qui est très néfaste

pour le foie (Ehling-Schulz et al., 2004a; Kotiranta et al., 2000; Mahler et al., 1997; Mikkola et al., 1999). Il a aussi été montré qu'une exposition chronique à de faibles concentrations de céréulide peut être impliquée dans des cas de diabète (Vangoitsenhoven et al., 2015).

La synthèse du céréulide se fait par une voie indépendante de l'intervention des ribosomes, via une synthétase peptidique non ribosomale (NRPS) codée par le cluster de gènes *ces* (Ehling-Schulz et al., 2005). Ce cluster de gènes est le plus souvent porté par un méga-plasmide nommé pCERE01 ou pCER270, qui ressemble au plasmide pXO1 de *B. anthracis* (Hoton et al., 2005). Cependant, chez de rares souches émétiques du groupe, les déterminants génétiques du céréulide sont localisés sur d'autres plasmides ou sur le chromosome (Hoton et al., 2009; Mei et al., 2014). Cette variation d'emplacement suggère une mobilité génétique et/ou la présence de transferts génomiques.

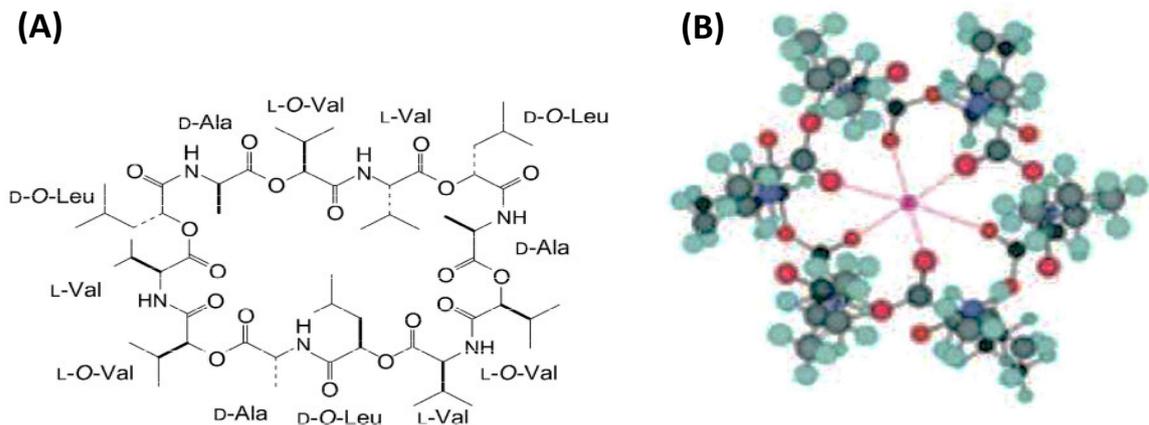


Figure 3: Structure du céréulide (A) et structure en 2D (B) (Pitchayawasin et al., 2003).

2.5. La régulation de la toxinogénèse chez le groupe *B. cereus*

Bien que les souches du groupe *B. cereus* soient phylogénétiquement apparentées, elles sont potentiellement différentes au niveau phénotypique. Pour preuve, le niveau de production des entérotoxines HBL et NHE est variable chez des souches cultivées dans les mêmes conditions (Guinebretière, et al., 2002; Moravek, et al., 2006). Cette différence de pathogénicité entre les souches du groupe *B. cereus* est due au système complexe de régulateurs permettant à ces bactéries d'affiner, de moduler et d'adapter facilement leur comportement en réponse à différents signaux environnementaux, nutritionnels et intrinsèques. La complexité de ce système résulte du nombre de régulateurs et de leurs interactions. Le régulateur pléiotrope PlcR (Phospholipase C Regulator, 34 kDa) est impliqué notamment dans l'activation de nombreux gènes de

pathogénicité incluant *hbl*, *nhe*, *cytK*, des gènes codant pour la cereolysine O, l'hémolysine III, la métalloprotéase *InhA2*, ainsi que les gènes codant pour les trois phospholipases C (PCPLC, PI-PLC, SMase) (Gohar et al., 2002). *PlcR* régulerait potentiellement d'autres régulateurs, des protéines de dégradations, des enzymes du métabolisme, des protéines de motilité et de chimiotactisme, des peptides antibactériens ainsi qu'une variété de protéines impliquées dans le transport actif dont des pompes à efflux d'antibiotiques (Ivanova, et al., 2003). Le régulateur *PlcR* déclenche la transcription des gènes codant pour les entérotoxines pendant la phase de transition entre la phase de latence et la phase exponentielle en réponse à l'augmentation de la densité cellulaire (Gohar et al., 2008). Il a été montré également que la toxicité est maximale pendant la phase de croissance exponentielle (Duport et al., 2004; Zigha et al., 2006). Afin de faire face aux variations des signaux de l'environnement tels la variation de l'aération, du pH, de la source de carbone ou du fer, les bactéries du groupe *B. cereus* régulent l'expression de nombreux gènes, dont leurs facteurs de virulence, en réponse à ces signaux perçus. Ceci implique des protéines régulatrices telles que *Fnr*, *ResDE*, *CcpA* et *CodY* (Duport et al., 2006; Zigha et al, 2007; van der Voort et al, 2008; Esbelin et al, 2009, 2012; Messaoudi et al. 2010) ainsi que d'autres systèmes de régulation à deux composants, jusqu'ici moins caractérisés (Ceuppens et al., 2011). La Figure 4 synthétise le rôle des différents régulateurs sur l'expression des facteurs de pathogénicité ainsi que les signaux environnementaux auxquels ces régulateurs répondent.

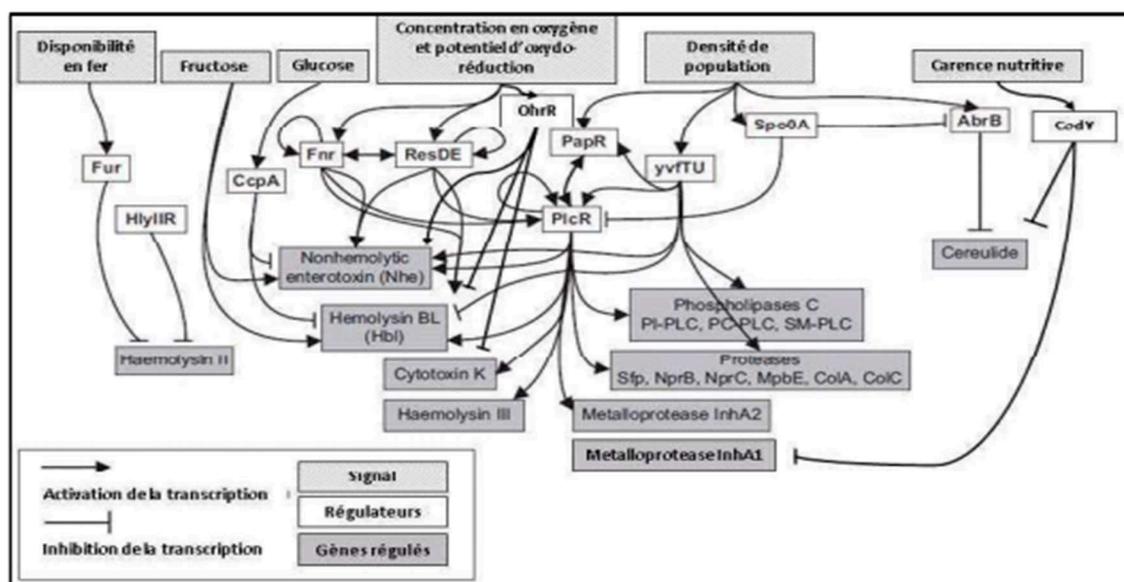


Figure 4: Représentation schématique des réseaux de régulations des facteurs de pathogénicité chez le groupe *B. cereus* (Ceuppens et al., 2011).

2.6. La résistance des membres du groupe *B. cereus* aux agents antimicrobiens

Dans le cas où il existe un cas suspect d'infection dû au groupe *B. cereus*, un traitement empirique peut être nécessaire dans l'attente du profil de sensibilité aux antibiotiques. La pénicilline G, appartenant à la famille des β -lactames, est le premier antibiotique à avoir été largement utilisé en médecine (Fluit et al., 2001). Elle est à proscrire dans le traitement des toxi-infections alimentaires dues au groupe *B. cereus*. En effet, une utilisation fréquente et inappropriée de cet antibiotique a favorisé la résistance de la plupart des souches du groupe *B. cereus*. En effet, ces souches développent des mécanismes de défense contre la pénicilline G et d'autres antibiotiques de la famille des β -lactamines telles que l'ampicilline et l'oxacilline, en sécrétant une β -lactamase capable d'hydrolyser l'antibiotique avant même qu'il n'atteigne sa cible (Chon et al., 2012; Fernandes et al., 2014; Luna et al., 2007; Park et al., 2009). L'espèce *B. anthracis* représente une exception notable au sein du groupe *B. cereus*, en raison de sa sensibilité aux β -lactamines (Chen et al., 2003). En effet, au sein de cette espèce, l'expression des gènes codant pour la β -lactamase est réprimée, ce qui entraîne une sensibilité aux β -lactamines. Par conséquent, une antibiothérapie précoce est efficace pour prévenir la maladie du charbon chez les personnes exposées. De plus, le groupe *B. cereus* a montré une résistance aux céphalosporines de troisième génération (Chon et al., 2012; Fernandes et al., 2014; Luna et al., 2007; Park et al., 2009; Weber et al., 1988) ainsi qu'à l'association de la ticarcilline et de l'acide clavulanique (Fernandes et al., 2014; Weber et al., 1988). La résistance des souches du groupe *B. cereus* aux autres antibiotiques est variable et dépendante de la souche (Chaves et al., 2011; Chon et al., 2012; Ikeda et al., 2015; Luna et al., 2007; Turnbull et al., 2004). Les trois résistances les plus fréquentes sont celles à la clindamycine (jusqu'à 60 % des souches), à la tétracycline (10–33 %) et à la lévofloxacine (environ 10 %). Les résistances à la vancomycine et à l'érythromycine sont rares. Enfin, les résistances à la ciprofloxacine, au chloramphénicol, à la gentamicine, à la rifampicine, à la streptomycine ou à la kanamycine n'ont à ce jour pas été observées pour les espèces *B. cereus sensu stricto* et *B. thuringiensis*. La résistance des bactéries du groupe *B. cereus* aux antibiotiques pourrait compliquer le choix d'un traitement empirique (Bottone, 2010). Selon Weber et al. (1988), le médicament de choix pour soigner les infections dues au groupe *B. cereus* semble être la vancomycine. D'après ces auteurs, les céphalosporines à large spectre et l'association de la ticarcilline et de l'acide clavulanique devraient être évités dans le

traitement empirique des patients suspectés d'infections dues au groupe. Les gènes responsables des résistances aux antimicrobiens sont généralement situés sur le chromosome, bien que certains soient inclus sur des éléments mobiles tels que les plasmides. Dès 1978, **Bernhard et al.** ont décrit pBC16, un petit plasmide de *B. cereus* résistant à la tétracycline. De même, les gènes *tetA* et *tetB*, associés à des plasmides, ont été rapportés dans une souche de *B. cereus* d'origine alimentaire (**Rather et al., 2012**). Dans le cas où les gènes de résistance aux antimicrobiens sont situés sur des plasmides conjugatifs ou mobilisables, un transfert horizontal peut avoir lieu, entraînant une variabilité de la résistance aux antibiotiques qui dépend de la souche. D'où la nécessité d'un traitement antibiotique prudent et rationalisé en fonction des résultats des cultures microbiologiques et permettant de prévenir l'émergence et la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques (**Carling et al., 2003; Davey et al., 2005; de Man et al., 2000; Lepper et al., 2002**).

3. Détection, identification et caractérisation des membres du groupe *B. cereus*

3.1. Méthodes d'isolement, de dénombrement ou de détection

Exceptées les espèces *B. mycoides* et *B. pseudomycoides*, la majorité des membres du groupe *B. cereus* forment des colonies de même morphologie sur milieu gélosé. Les colonies sont grandes (de 3 à 8 mm de diamètre), blanches, d'aspect mat ou granuleux, de forme circulaire à asymétrique, et présentent souvent des contours irréguliers (**Logan et de Vos, 2015; Stenfors Arnesen et al., 2008**). Les méthodes d'isolement et d'énumération, à partir d'échantillons d'origine environnementale, clinique ou alimentaire, se réalisent en utilisant des milieux de cultures sélectifs (**Fricker et al., 2008**). Une coloration de Gram est souvent effectuée pour confirmer le statut Gram positif de la bactérie. De même, la présence de spores est également étudiée par observation visuelle au microscope (présence de corps réfringents sous lumière à contraste de phase ou de corps verts après coloration à la malachite).

L'organisation internationale de normalisation spécifie, dans sa norme ISO 7932:2004, exige une méthode horizontale pour le dénombrement des colonies de *B. cereus* présumptifs. Cette méthode s'applique aux produits destinés à la consommation humaine et à l'alimentation des animaux, ainsi qu'aux échantillons environnementaux dans le domaine de la production et de la manipulation des denrées alimentaires. Elle est basée sur l'apparence typique des colonies sur la gélose « mannitol, egg yolk, polymyxin »

(MYP) et sur une confirmation grâce à un test d'hémolyse sur de la gélose au sang frais de mouton. Le milieu MYP a été recommandé par **Mossel et al. (1967)** pour le dénombrement du groupe *B. cereus* dans les matrices alimentaires. Le principe est basé sur l'absence de fermentation du mannitol et la production de lécithinase, caractéristiques partagées par la plupart des souches du groupe *B. cereus*. Ainsi, les colonies apparaissent de couleur rose et sont généralement entourées d'un halo blanchâtre dû à l'activité lécithinase (**Figure 5**).



Figure 5: Colonies issues du développement de bactéries du groupe *B. cereus* sur milieu MYP, après 24h d'incubation à 30 °C (**Fricker et al., 2008**).

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

L'ajout de polymyxine B inhibe la microflore secondaire en grande partie et est censé conférer sa sélectivité au milieu. Une variante de ce milieu, le milieu polymyxin egg yolk mannitol bromothymol blue agar (PEMBA) a été développé par **Holbrook et Anderson (1980)** et donne naissance à des colonies entourées d'un halo blanc-bleu. La gélose au sang frais de mouton sert à confirmer l'activité hémolytique (**Ehling-Schulz et al., 2004a; ISO, 2004; Mossel et al., 1967**). Deux grands types d'hémolyse, α ou β , sont provoqués par *Bacillus* (**Figure 6**) mais il existe aussi des situations intermédiaires entre ces deux types. L'hémolyse- β se manifeste, sur milieu gélosé au sang, sous forme d'une large zone claire entourant la colonie. Cette zone transparente produite est due à la dégradation complète des globules rouges. L'hémolyse- α se manifeste, quant à elle, par une légère zone floue et granuleuse de couleur verdâtre à brunâtre entourant la colonie. Cet aspect est dû à une perte de potassium des globules rouges (**Adams et al., 2015; Madigan et al., 1997**).



Figure 6: Confirmation de l'activité hémolytique du groupe *B. cereus* sur gélose au sang de mouton.

(a): Hémolyse- α dans la partie supérieure et hémolyse- β dans la partie inférieure sur de la gélose au sang (Andersson et al., 2004).

(b): Neuf types d'hémolyse mis en évidence chez 198 souches de *B. cereus* et de *B. thuringiensis* (Vilas-Boas et al., 2002).

Comme la norme ISO 7932:2004, utilisée de façon routinière dans les laboratoires, ne permet pas de différencier les membres du groupe *B. cereus*, elle est considérée comme "présomptive". En conséquence, la prévalence précise de chaque espèce ne peut pas être déterminée avec cette méthode.

D'autres tests peuvent être mis en œuvre pour permettre cette discrimination. Nous pouvons citer les tests de mobilité permettant de discriminer *B. anthracis* des autres espèces du groupe. Il existe aussi des tests biochimiques, tels que les galeries API50CH et API20T, dont les milieux contiennent des substances dont la couleur est modifiée en présence d'activités enzymatiques spécifiques. Cependant, comme ces tests reposent sur la mise en évidence d'activités sous le contrôle du régulateur pléiotropique PlcR, des mutations, du régulateur ou des enzymes peuvent conduire à des résultats faussement négatifs (Fricker et al., 2008).

En outre, deux autres méthodes, AFNOR BKR-23/06-02-02/10 et AFNOR ARES-10/10-07/10, basées respectivement sur la gélose Compass® *Bacillus cereus* Agar et *Bacillus Cereus* Rapid Agar (BACARA®), ont été validées en tant que méthodes "alternatives" pouvant être utilisées par les laboratoires de routine en remplacement de la norme ISO 7932:2004. De plus, la norme ISO 21871:2006 spécifie une méthode horizontale pour la détection ou le dénombrement d'un petit nombre de *B. cereus* présumés viables au moyen

de la technique du nombre le plus probable (NPP). L'utilisation de techniques moléculaires s'est avérée utile pour l'identification des membres du groupe *B. cereus*. Par exemple, un test PCR ciblant la séquence du gène de la protéine structurale des spores (*sspE*), spécifique au groupe *B. cereus*, permet de vérifier l'appartenance de chaque isolat au groupe *B. cereus* (Kim et al., 2005; Merzougui et al. 2014). Les membres du groupe *B. cereus* peuvent être détectés à l'aide d'amorces spécifiques de leur ARNr 16S et/ou de gènes de ménage par PCR conventionnelle ou par PCR en temps réel (qPCR) (Cremonesi et al., 2014; Dzieciol et al., 2013; Fernandez-No et al., 2011; Martinez-Blanch et al., 2010).

La PCR multiplex proposée par Park et al. (2007) pour l'identification des espèces du groupe *B. cereus* ne s'avère utile que pour l'identification du groupe et pas pour la discrimination de ses membres (Forminska et al., 2012).

3.2. Méthodes de caractérisation moléculaire

3.2.1. Analyses génomiques comparatives des espèces du groupe *B. cereus*

La taxonomie du groupe *B. cereus* est très complexe, ce qui complique fortement l'identification des espèces appartenant à ce groupe.

Des études génomiques approfondies menées sur des souches de *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis* et *B. anthracis* à l'aide de différentes techniques, comme l'électrophorèse multilocus des isoenzymatique (MLEE) (Helgason et al. 1998), les polymorphismes de longueur de fragments amplifiés (AFLP) (Ticknor et al. 2001) et le typage par séquençage multilocus (MLST) (Helgason et al. 2004; Priest et al., 2004), ont suggéré que la parenté génétique entre les membres du groupe *B. cereus* est si proche que, d'un point de vue strictement phylogénétique, ils peuvent être considérés comme une seule espèce. Ces études reposent sur le fait que la distinction entre ces espèces se base principalement sur des caractères phénotypiques dont les gènes sont localisés sur des plasmides.

Une analyse génomique récente de 224 souches basés sur les données MLST, AFLP et les données du séquençage du génome complet (Anonymous, 2016; Ehling-Schulz et al., 2019; Guinebrière et al., 2018; Méric et al., 2018) montre que les membres du groupe *B. cereus* sont divisés en 5 clades principaux (Figure 7): le clade I comprend la plupart des souches de *B. thuringiensis* commercialisées et des souches types de *B. cereus* et *B. thuringiensis*; le clade II comprend la plupart des souches de *B. thuringiensis*

commercialisées ainsi que des souches types de *B. cereus* et *B. thuringiensis*; le clade III comprend des souches de *B. weihenstephanensis* et la plupart des isolats psychrotolérants du groupe *B. cereus*; le clade IV contient des bacilles non pathogènes *B. mycoïdes* et pseudomycoïdes, des souches de *B. cereus* et *B. thuringiensis* ainsi que des souches thermotolérantes appartenant à l'espèce *B. cytotoxicus*. Ces dernières se rassemblent dans un groupe distinct; enfin, le clade V comprend les bactéries appartenant aux espèces *B. cereus*, *B. thuringiensis* et *B. toyonensis*.

Cette non-concordance entre l'analyse phylogénétique génomique et les phénotypes spécifiques conduit à la conclusion que les plasmides porteurs des facteurs de virulence tels que les plasmides pXO1 et pXO2 de *B. anthracis* et les plasmides porteurs des gènes *cry* de *B. thuringiensis* ne peuvent servir de signature pour l'identification des espèces (Liu et al., 2015). Comme l'ont proposé Helgason et al. (2000b) et Rasko et al. (2005), il est plus utile de considérer le groupe *B. cereus* comme une espèce unique composée de souches extrêmement diverses dont les propriétés diffèrent en raison du contenu plasmidique ou de l'expression génétique.

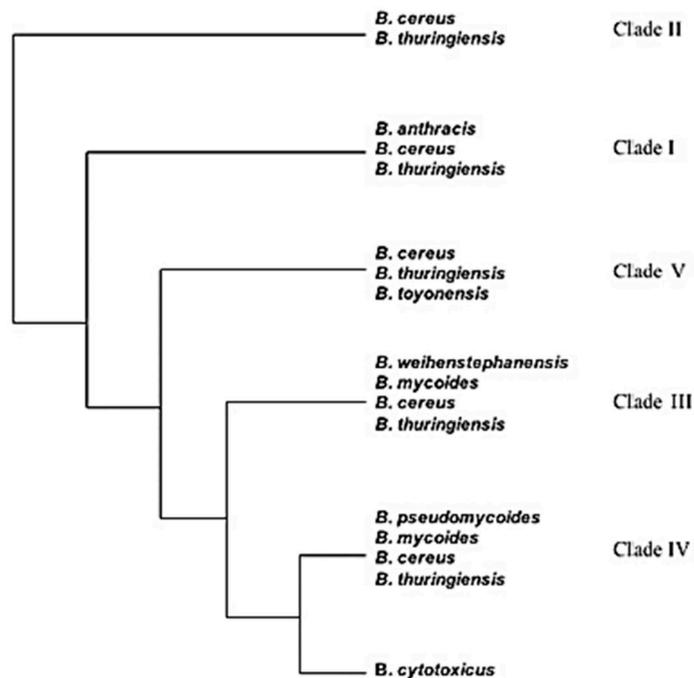


Figure 7: Les 5 clades phylogénétiques majeurs du groupe *B. cereus* (Ehling-Schulz et al., 2019).

Cette classification en clades est basée sur les données MLST, AFLP et les données du séquençage du génome complet (Anonymous, 2016; Guinebretière et al., 2018; Méric et al., 2018).

Les séquences nucléotidiques d'ADNr 16S et d'ADNr 23S des différentes espèces du groupe *B. cereus* présentent des niveaux très élevés de similarité de séquence (Ash et al. 1991; Harrell et al., 1995).

Bien que les méthodes basées sur le séquençage de gènes uniques comme *gyrB* (codant pour la gyrase B), *aroE* (codant pour la shikimate déshydrogénase) et *panC* soient plus discriminantes que celles basées sur le séquençage des régions intergéniques variables entre les ARNr 16S et 23S, des études montrent ainsi que cette méthode ne permet pas de différencier les espèces du groupe *B. cereus* (Guinebretière et al., 2008; Soufiane et Cote, 2009). L'analyse phylogénétique basé sur les séquences des gènes *gyrB* et *aroE* ont permis de rapprocher les sérotypes *bolivia* et *vazensis* de *B. thuringiensis* de l'espèce *B. weihenstephanensis*, plus que d'autres souches de *B. thuringiensis*. Également, l'analyse phylogénétique basée sur la séquence du gène *panC* a permis de regrouper le sérotype *navarrensis* de *B. thuringiensis* avec des souches de *B. weihenstephanensis* (Guinebretière et al., 2008). Sachant que les souches de *B. thuringiensis* sont connues pour être mésophiles alors que les souches de *B. weihenstephanensis* sont connues pour être psychrotolérantes, il devient intéressant de comparer les caractéristiques physiologiques et génétiques des serotypes *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* de *B. thuringiensis* à celles des souches de *B. weihenstephanensis*.

Bien qu'il n'y ait pas encore de consensus dans la littérature, certains articles font déjà état de la discrimination entre *B. anthracis* par rapport à *B. cereus sensu stricto* et *B. thuringiensis* (Harrell et al. 1995; Keim et al. 1997; Radnedge et al. 2003). Ces résultats sont dus à la faible variabilité génétique caractéristique de *B. anthracis*, contrairement à la forte variabilité génétique de *B. cereus sensu stricto* et *B. thuringiensis*. Ce faible niveau de variabilité génétique est probablement dû au fait que *B. anthracis* reste dans l'environnement sous forme de spores dormantes, ainsi qu'au cycle de vie de cette espèce dans l'hôte, où la phase de croissance végétative a une nature explosive. En raison de sa rapidité, le nombre de recombinaisons génétiques diminue ou même cesse entre souches de *B. anthracis* ou avec d'autres espèces (Schupp et al. 2000). Le polymorphisme génétique des souches de *B. cereus sensu stricto* et *B. thuringiensis* et la grande similitude de leurs ensembles génétiques sont les principaux facteurs qui compliquent la résolution du problème taxonomique entre ces deux espèces. Une grande variabilité génétique a été observée au sein des deux espèces et entre elles et plusieurs auteurs ont suggéré que *B. cereus sensu stricto* et *B. thuringiensis* devraient être considérés comme une seule espèce (Carlson et al., 1994; Helgason et al., 1998, 2000a,

2000b). Cependant, les résultats des analyses de séquences d'ADNr AFLP, MLEE et 16S (Ticknor et al., 2001) démontrent que *cereus sensu stricto* et *B. thuringiensis* sont hautement polymorphes et qu'une simple analyse d'un nombre limité de souches n'est pas suffisante pour caractériser ces espèces. Une différenciation génétique entre *B. cereus sensu stricto* et *B. thuringiensis* a également été obtenue par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) (Harrell et al., 1995). Une étude de Priest et al. (1994) pour comparer des souches de *B. anthracis*, *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis* (43 souches de 10 sérotypes) en se basant sur le ribotypage, a montré que les quatre souches de *B. anthracis* constituaient un groupe distinct, les profils de « Restriction Fragment Length Polymorphism » RFLP des souches de *B. thuringiensis* étaient bien corrélés entre eux tandis que les trois souches de *B. cereus sensu stricto* étaient dispersées sur l'arbre phylogénétique.

- **Séquencage du génome complet (Whole Genome Sequencing– WGS)**

Les résultats du séquençage du génome complet ont révélé de nouvelles perspectives sur l'évolution des modes de vie des bactéries, y compris des stratégies d'adaptation à de nouvelles niches et d'autres pour faire face aux compétiteurs.

Dans le cadre du développement de l'exploitation des bactéries du genre *Bacillus* dans les processus industriels, les génomes complets de plusieurs espèces de *Bacillus* ont été séquencés afin de comprendre leur biochimie, leur physiologie et leur génétique. *B. subtilis* a été la première bactérie Gram positif dont le génome a été séquencé et depuis lors, les génomes de plusieurs espèces de *Bacillus* ont été séquencés.

Le séquençage du géome complet de *B. cereus* révèle la présence des séquences codantes des protéines (Protein coding sequences– CDSs) visant la pathogénicité. Ces CDSs indiquent la parenté de *B. cereus* avec *B. anthracis* et *B. thuringiensis*. Près de 75% à 80% des gènes sont conservés entre *B. cereus* ATCC 14579 et *B. anthracis* A2012, ce qui montre une similarité entre les souches et signifie qu'elles ont un ancêtre commun (Ivanova et al., 2003). L'analyse du potentiel métabolique codé par les ensembles de gènes commun remet en question l'hypothèse selon laquelle l'ancêtre du groupe *B. cereus* est une bactérie du sol.

Parmi les particularités des bactéries du sol (*Streptomyces spp.* ou *B. subtilis*) est l'existence de multiples voies cataboliques d'une variété de glucides qui représente la principale source de nutriments et qui est présente dans le sol et la matière végétale. Au total, 41 gènes de dégradation des polymères glucidiques ont été identifiés dans le génome de *B. subtilis*, contre seulement 14 et 15 CDSs dans *B. cereus* et *B. anthracis*,

respectivement. En outre, un total de 51 et 48 CDSs codant pour la protéase ont été identifiés chez *B. cereus* et *B. anthracis*, respectivement, contre seulement 30 chez *B. subtilis* (Sharma et Satyanarayana, 2013).

▪ **Transfert horizontal des gènes (Horizontal Gene Transfer– HGT)**

Le transfert génétique horizontal entre les membres du groupe *B. cereus* est un mécanisme évolutif important. La présence de dix prophages et de leurs résidus dans le génome de *B. subtilis* a montré le rôle évolutif de la HGT, principalement dans la propagation de la pathogénicité bactérienne.

La présence de HGT peut être démontrée par la découverte d'îlots de pathogénicité, c'est-à-dire des éléments génétiques extrachromosomiques mobiles capables de se transférer et/ou de se maintenir par intégration ou des éléments en dérivant, qui possèdent des déterminants de la pathogénicité (caractère de pathogénicité) chez les bactéries parasites et des îlots de symbiose similaires chez les bactéries symbiotiques (Ochman et al., 2000; Ochman et Moran, 2001).

L'analyse des caractères de pathogénicité et des éléments extrachromosomiques qui reflètent le spectre de virulence de l'espèce joue un rôle central dans l'identification des membres du groupe *B. cereus*. En effet, les plasmides déterminant les profils de pathogénicité dans le groupe *B. cereus* peuvent être mobilisés avec l'aide d'autres plasmides portant des homologues d'éléments clés d'un système de sécrétion conjugatif (Van der Auwera et Mahillon, 2005).

La transduction (transfert horizontal de gènes par transmission phagique) représente aussi un mécanisme potentiellement important du transfert des gènes. Le bactériophage CP-51, un phage transducteur généralisé pour *B. cereus*, *B. anthracis* et *B. thuringiensis*, assiste la transduction de l'ADN plasmidique (Ruhfel et al., 1984).

Les séquences d'insertion (Insertion Sequence – SI) sont un autre type d'élément mobile pouvant participer au transfert génétique horizontal. Les éléments SI sont composés de répétitions inversées flanquant un gène de transposase (De Palmaer et al., 2004) et ont été trouvés chez divers membres du groupe *B. cereus*.

Même si les séquences d'insertion sont des éléments génétiques autonomes, elles peuvent également contribuer à créer un transposon composite. Dans ce type de transposon, deux séquences d'insertion flanquant un ou plusieurs gènes pas transposable (tels que les gènes de résistance aux antibiotiques, par exemple) la création d'une structure complexe capable de transposer (De Palmaer et al., 2004)

Des introns du groupe II ont aussi été identifiés dans le génome des membres du groupe *B. cereus* (chromosome et plasmides). Même s'ils ne contiennent aucun gène de pathogénicité, ces introns sont des rétroéléments autoépisseurs mobiles participant au transfert génétique (**Tourasse et Kolsto, 2008**).

Divers cas de transfert de plasmides entre les membres du groupe *B. cereus* ont été rapportés dans plusieurs niches, y compris le sol (**Vilas-Boas et al., 2000**), la rhizosphère végétale (**Saile et koehler, 2006**), l'eau (**Thomas et al., 2001**) et les produits laitiers (**Van der Auwera et al., 2007**). Une banque croissante de séquences génétiques provenant des isolats cliniques et environnementaux révèle également la présence de nombreux échanges génétiques dans le groupe *B. cereus*. Dans certains cas, des isolats cliniques provenant d'humains et d'animaux ont été trouvés avec des combinaisons nouvellement découvertes de gènes potentiels de virulence plasmidique. Par exemple, la souche G9241 de *B. cereus*, isolée chez un patient atteint d'une pneumonie potentiellement mortelle, contient deux mégaplasmides, pBCXO1 et pBC218. Ces plasmides sont analogues aux plasmides pXO1 et pXO2 de *Bacillus anthracis* Ames qui codent respectivement pour les toxines de l'anthrax et les capsules (**Hoffmaster et al., 2004**).

Les éléments extrachromosomiques peuvent aussi varier entre les souches d'une même espèce. Bien que la présence de pXO1 ait été constatée dans certaines souches de *B. cereus* comme G9241 et que d'autres portent pCER270, ces éléments extrachromosomiques ne sont pas caractéristiques de la souche ATCC 14579, qui ne contient qu'un seul élément extrachromosomique, pbclin15 (**Ivanova et al. 2003**). Le plasmide pbclin15 ne contient aucun gène associé à des traits de pathogénicité connus.

Certains rapports ont également décrit des échanges génétiques entre des membres du groupe *B. cereus* et d'autres bactéries. En effet, la présence des gènes *cry* codant pour les toxines insecticides dans *Bacillus popilliae* (**Zhang et al., 1997**) et *Clostridium bifermentans* (**Qureshi et al., 2014**) suggère fortement un transfert horizontal des plasmides de *B. thuringiensis* à d'autres bactéries Gram-positives sporulées.

En conclusion, le groupe *B. cereus* est une population hautement dynamique et le transfert génétique entre les espèces du groupe est un mécanisme évolutif important. Ainsi, il s'avère plus pertinent d'identifier les souches à l'échelle du groupe phylogénétique (**Guinebrière et al., 2008**) qu'à l'échelle de l'espèce car elle permet une prédiction rapide de leur potentiel toxigénique et une meilleure estimation du risque sanitaire des aliments.

3.2.2. Méthodes de différenciation des membres du groupe *B. cereus*

3.2.2.1. ERIC-PCR

L'ERIC-PCR est une technique basée sur l'amplification d'un élément répétitif hautement conservé (Niemann et al., 1999), nommé « Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus » (ERIC), localisé dans les régions intergéniques non codantes du génome bactérien.

Cet élément a été décrit et utilisé de façon universelle pour la caractérisation des populations bactériennes du fait de son ubiquité et de la grande variabilité de sa position et sa fréquence de répétition dans les génomes bactériens (Hulton et al., 1991).

Une amorce unique spécifique de ces régions permet l'amplification de fragments d'ADN de taille variable (amplicons). Les produits de ces PCR aléatoires sont séparés par électrophorèse, produisant un profil de bandes. L'ERIC-PCR a été utilisée à plusieurs reprises pour le typage des espèces du groupe *B. cereus* (Shangkuan et al., 2000 et 2001).

3.2.2.2. Amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD)

Cette technique a été décrite pour la première fois par Williams et al. (1990). Elle nécessite une seule amorce choisie au hasard, formée d'environ une dizaine de nucléotides et s'hybridant à plusieurs endroits du génome. Les profils des produits amplifiés ainsi obtenus peuvent être caractéristiques de la souche et permettre une bonne discrimination au sein d'une même espèce bactérienne (Hilton et al., 1996) puisque le nombre et la localisation des séquences amplifiées sont spécifiques à chaque souche (Olive et Bean, 1999). La RAPD a été utilisée dans de nombreuses études épidémiologiques (Guinebretiere et Nguyen-The, 2003; Manzano et al., 2009) et pour la différenciation des souches psychrotrophes du groupe *B. cereus* (Lechner et al., 1998). Elle s'est avérée efficace pour tracer l'origine de la contamination d'échantillons de lait pasteurisé par *B. cereus sensu stricto* (Eneroth et al., 2001).

3.2.2.3. Electrophorèse en Champ Pulsé (PFGE)

La PFGE est une technique moléculaire hautement discriminatoire, basée sur la comparaison des profils d'ADN génomique digérés par des enzymes de restriction (Otlewska et al., 2013). Cette technique consiste à digérer l'ADN total dans une matrice d'agarose appelée « plug » grâce à une enzyme de restriction à faible fréquence de coupure. Ces fragments sont ensuite soumis à des champs électriques alternés. A chaque changement de direction du champ électrique, les fragments vont migrer tout en se réorientant plus ou moins rapidement en fonction de leur taille (Schwart et Cantor,

1984). Les profils obtenus, appelés aussi pulsotypes, sont comparés au moyen d'un logiciel informatique, afin de déterminer les relations entre les souches étudiées. Cette technique a été mise en œuvre à plusieurs reprises pour la réalisation de cartes génétiques (Carlson et al., 1994; Kolsto et al., 1990) et pour l'étude de la diversité génomique entre souches à des espèces *B. cereus* et *B. thuringiensis*. Harell et al. (1995) ont mis au point un protocole de PFGE adapté au groupe *B. cereus*. Même si ce protocole est long, il s'est avéré efficace pour caractériser ces souches et a été repris pour plusieurs investigations épidémiologiques (Dubouix et al., 2005; Liu et al., 1997).

3.2.2.4. Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP)

L'AFLP a été mise au point par la société Keygene (Wageningen, Pays-Bas) et est protégée par un brevet (Vos et al., 1995). Cette technique consiste à digérer l'ADN génomique par deux enzymes de restriction présentant des fréquences de coupure différentes. Suivant le génome étudié, la taille des fragments obtenus peut varier en jouant sur la combinaison des enzymes de restriction. Des adaptateurs (oligonucléotides doubles brins) sont ensuite ajoutés aux extrémités des fragments de restriction pour que les amorces puissent se fixer sur les fragments. Afin d'augmenter la quantité d'ADN, une pré-amplification est effectuée sur tous les fragments par des amorces dégénérées. Une amplification PCR sélective permet ensuite d'augmenter le nombre de fragments. Sur gel d'acrylamide, plusieurs dizaines de fragments (généralement entre 500 pb et 100 pb) peuvent donc être séparés et visualisés. L'AFLP a été utilisée pour une étude épidémiologique portant sur *B. cereus* (Van Der Zwet et al., 2000) et pour la caractérisation de souches de *B. cereus* et de *B. thuringiensis* isolées de sols (Ticknor et al., 2001).

3.2.2.5. MALDI-TOF MS

Depuis quelques années, MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) est largement utilisé pour l'identification systématique des micro-organismes (Clark et al., 2013). Cette méthode est extrêmement robuste, rapide et adaptée à l'utilisation par le personnel de laboratoire sans connaissance approfondie de la technique en soi, car les résultats sont générés automatiquement par un logiciel statistique très sophistiqué. La méthode MALDI-TOF MS a été considérée comme une approche prometteuse et rapide pour la présélection des souches. Elle est également considérée comme une méthode entièrement fiable pour distinguer les souches

de *B. cereus* émétiques des souches non émétiques (Fiedoruk et al., 2016; Ulrich et al., 2019).

3.3. Méthodes d'identification du pouvoir pathogène du groupe *B. cereus*

Au fil des ans, plusieurs publications ont suggéré que les facteurs de virulence potentiels produits par le groupe *B. cereus* (NHE, HBL, CytK et céréulide) sont associés aux infections d'origine alimentaire causées par *B. cereus* (voir paragraphe 2.4). Il est toutefois important de souligner qu'aucune démonstration définitive du rôle de ces composants au sein de l'hôte (seuls ou en combinaison) n'a été fournie. Des systèmes de PCR et de PCR en temps réel ont été mis au point pour l'identification de diverses combinaisons de gènes de virulence dans le groupe *B. cereus* (Ehling-Schulz et al., 2005; Ehling-Schulz et al., 2006; Guinebrière et al., 2002; Hoton et al., 2005; Wehrle et al., 2010). Néanmoins, la seule observation de la présence de gènes de virulence par PCR n'est pas suffisante, du moins en ce qui concerne les entérotoxines, pour prédire le caractère pathogène de la souche concernée : celui-ci dépend du contexte génétique de la souche et des conditions environnementales. En effet, il n'existe pas d'association évidente entre la présence de gènes de virulence, l'expression des protéines et la toxicité des isolats (Bassi et al., 2016; Jeßberger et al., 2015). Ainsi, la capacité de production de toxines et la régulation de cette production sont fortement dépendantes de la souche. A titre d'exemple, des souches provenant d'intoxications alimentaires produisent en moyenne significativement plus de NheB que des souches alimentaires/environnementales (Moravek et al., 2006). De plus, Cui et al. (2016) ont rapporté que le céréulide d'une souche isolée de lait cru chinois a été produit avec une toxicité 7-15 fois supérieure à celle de la souche émétique de référence du groupe *B. cereus*. Pour confirmer la production de toxines, plusieurs méthodes ont été développées. Des tests immunologiques ont en effet été mis au point pour mettre en évidence la production d'entérotoxines, soit dans le surnageant de cultures de *B. cereus* en milieu liquide, soit dans les produits alimentaires contaminés eux-mêmes. Ces tests sont, au mieux, semi-quantitatifs, mais ils ne détectent généralement qu'une partie des composants des complexes d'entérotoxines (Tableau 4). Ceci limite fortement la valeur de ces tests (Moravek et al., 2006). Plusieurs tests commerciaux sont disponibles depuis plusieurs décennies, tels que :

- le kit BDE-ELISA de Tecra © pour la détection de la production de la toxine NHE : ce test ELISA cible spécifiquement les sous-unités NheAB du complexe NHE, avec seuil de détection de plus de 1 ng/mL d'échantillon.

- le kit BCET-RPLA de Oxoid © pour la toxine HBL : les anticorps de ce test reconnaissent la composante *hblC* (L2) du complexe HBL, avec une sensibilité comprise entre 2 et 4 ng/mL de l'extrait.

- L'entérotoxine Duopath® Cereus met en œuvre un dosage immuno-sorbide marqué à l'or (GLISA) pour la détection qualitative des deux principaux complexes d'entérotoxines de *B. cereus*, NHE et HBL (les composants *nheB* et *hblC* sont ciblés). Sa limite de détection est de 1 UFC/g ou mL d'échantillon, ce qui correspond à une concentration d'entérotoxine comprise entre 6 et 20 ng/mL (**Krause et al., 2010**).

- Les anticorps monoclonaux pour l'entérotoxine HBL ou NHE sont décrits (**Dietrich et al., 2005**), mais ne sont pas disponibles sous forme commerciale.

La réaction de perméabilité vasculaire du lapin (VPR) a également été utilisée par plusieurs auteurs (**Christiansson et al., 1989; DeBuono et al., 1988; Granum et al., 1993; Portnoy et al., 1976**) pour détecter l'entéropathogénicité des souches de *B. cereus*. La VPR est réalisée par injection intradermique de la (des) toxine(s) en modèles cobaye ou lapin, et l'observation de la libération de protéines plasmatiques (via le colorant bleu Evans) dans les tissus dermiques, en raison de la modification de la perméabilité vasculaire.

De plus, pour détecter l'activité entérotoxinique des isolats du groupe *B. cereus*, des tests de cytotoxicité sur des lignées cellulaires humaines et animales telles que les cellules CHO, Vero, Hep-2, Caco-2, HUVEC et A549 (**Castiaux et al., 2016; Choma et al., 2000; Jan et al., 2010; Jessberger et al., 2014; Stenfors et al., 2002**) sont souvent réalisés. Un test comparatif avec différentes lignées cellulaires, effectué par **Jessberger et al. (2014)**, a révélé que la sensibilité aux entérotoxines différait d'une lignée cellulaire à l'autre. Les cellules endothéliales primaires (HUVEC) se sont révélées très sensibles à NHE, tandis que les cellules hépatocellulaires humaines (Hep-2), Vero (*Cercopithecus aethiops*) et A549 (cellules épithéliales humaines) étaient plus sensibles à une combinaison de NHE et HBL. Ainsi, les résultats de la cytotoxicité globale des souches entérotoxigènes obtenus par ces méthodes dépendront de la présence et de la combinaison des entérotoxines et de la lignée cellulaire choisie, ce qui remet en question la pertinence de ces tests pour les diagnostics courants.

La production de céréulide peut aussi être recherchée par la mise en œuvre de tests sur cultures cellulaires. A titre d'exemple, le test de cytotoxicité sur des cellules épithéliales humaine de type 2 (Hep-2) a été réalisé pour l'analyse semi-quantitative du céréulide provenant d'échantillons bactériens ou alimentaires inactivés par la chaleur (**Finlay et al., 1999; Frenzel et al., 2011**). La valinomycine est généralement utilisée comme étalon externe pour cet essai. Cependant, une étude comparative de la valinomycine et du céréulide purifié a révélé que ce dernier n'est pas un substitut approprié pour la quantification du céréulide car il se comporte différemment dans le test de cytotoxicité Hep-2 (**Biesta-Peters et al., 2010**).

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) permet une analyse directe du céréulide (**Hägglom et al., 2002**). La valinomycine est utilisée comme étalon de substitution pour la quantification. Cependant, comme indiqué plus haut, elle n'est pas co-éluable avec le céréulide et s'est donc avéré inadaptée à l'analyse d'échantillons complexes car elle ne permet pas de contrebalancer les effets de la matrice. Ainsi, le céréulide est quantifié en utilisant, comme étalon interne, du céréulide marqué aux isotopes stables (**Bauer et al., 2010**).

Un test biologique basé sur la mobilité de spermatozoïdes de verrats a permis de détecter le céréulide dans des céréales (**Andersson et al., 1998**). En effet, en présence de céréulide, les spermatozoïdes perdent leur mobilité en quelques minutes. Bien que d'autres toxines puissent agir sur les spermatozoïdes, ce test sensible, peu coûteux et rapide, a été largement utilisé. De nouvelles sondes chimiques ont récemment été développées pour la détection du céréulide (**Garcia-Calvo et al., 2017**). Elles donnent un fort signal fluorescent en présence de cations. Le céréulide formant un complexe avec les cations disponibles, il réduit le signal de fluorescence. Cette méthode pourrait être utile pour la détection rapide du céréulide dans des produits alimentaires. Cependant, elle nécessite d'être optimisée avant de pouvoir être utilisée en routine.

4. Les bactéries du groupe *B. cereus* dans l'industrie agroalimentaire (IAA)

Le groupe *B. cereus* occupe une place de premier plan parmi les microorganismes indésirables en IAA, principalement en raison de sa capacité à sporuler et à former des biofilms (**Bartoszewicz et al., 2008**).

4.1. La question de la thermorésistance

Les bactéries du groupe *B. cereus* ont la capacité de former des spores qui sont largement répandues dans la nature et peuvent contaminer les aliments à base de matières premières végétales ou animales. Elles sont très résistantes aux conditions défavorables telles que la chaleur, la déshydratation et le dessèchement. Leur inactivation complète est souvent impossible sans altérer la qualité de l'aliment (**Daryaei et al., 2013; Smelt et al., 2008**). Elles peuvent donc survivre aux opérations de décontamination des produits alimentaires dans l'IAA, comme la pasteurisation, et être encore présentes dans le produit fini. Les traitements thermiques éliminent la majorité des cellules végétatives de la flore compétitrice et peuvent stimuler la germination des spores (**Collado et al., 2003**). Les cellules végétatives pourront, par la suite, se multiplier soit parce que les conditions de refroidissement et de conservation sont inappropriées, soit parce que les souches sont psychrotolérantes et peuvent croître durant le stockage aux températures de réfrigération. Les bactéries pourront alors atteindre des concentrations susceptibles d'altérer la qualité des denrées alimentaires et d'augmenter le risque d'aboutir à des maladies d'origine alimentaires, ayant pour conséquence une réduction de la sécurité sanitaire et de la durée de conservation (**Heyndrickx, 2011**).

La thermorésistance des spores du groupe *B. cereus* est positivement corrélée aux températures de croissance. Ainsi, elle varie en fonction du groupe phylogénétique (**Luu-Thi et al., 2014; Wells-Bennik et al., 2016**). **Carlin et al. (2006)** ont montré que les souches émétiques mésophiles du groupe III étaient plus résistantes aux traitements thermiques que les souches diarrhéiques. La résistance des spores à la chaleur est aussi positivement corrélée aux températures de sporulation. En effet, les spores produites à 30 °C sont plus résistantes que celles produites à basse température (**Planchon et al., 2011**). Il a également été montré que les spores produites en anaérobiose sont plus résistantes que celles produites en présence d'O₂ (**Abbas et al., 2014**).

4.2. La question de l'adhésion aux surfaces industrielles et de la formation des biofilms

L'aptitude des spores du groupe *B. cereus* à adhérer aux surfaces industrielles est attribuée à leurs propriétés physico-chimiques de surface, y compris la forte hydrophobicité de l'exosporium, la charge négative de sa surface ainsi que la présence d'appendices (**Tauveron et al., 2006**). Le caractère hydrophobe des spores du groupe *B. cereus*, souvent attribué à l'abondance de protéines de surface (**Doyle et al., 1984**), est à l'origine

de la forte capacité d'adhésion à différents matériaux présents dans les lignes de production des IAA, tels que l'acier inoxydable, les polymères et les plastiques (**Faille et al., 2001; Faille et al., 2002; Lelievre et al., 2001; Peng et al., 2001; Tauveron et al., 2006**). En outre, le caractère hydrophobe des spores peut être accentué lorsque la suspension sporale est exposée à un traitement thermique, favorisant ainsi l'adhérence aux surfaces (**Wiencek et al., 1990**).

Les spores adhérentes ont l'aptitude à initier le processus de formation de biofilm (**Ryu et Beuchat, 2005**). La présence de biofilms contenant des bactéries du groupe *B. cereus* est une préoccupation majeure pour la production d'aliments tels que les produits frais, la volaille, les produits laitiers et les produits issus de la transformation de la viande rouge (**Majed et al., 2016**). Les biofilms représentent en effet une source potentielle de contamination croisée et de contamination post-traitement récurrente des produits finis (**Rajkovic et al., 2008b**). Les différentes étapes et le mécanisme de formation des biofilms ont été largement décrits dans la littérature (**Bridier et al., 2011; Liaqat et al., 2013; Verstraeten et al., 2008**). **Pace et al. (2006)** ont rapporté que le mode de formation des biofilms est indépendante de l'environnement colonisé. Il est généralement schématisé en cinq étapes principales : l'adhésion réversible puis irréversible, l'accumulation, la maturation et la dispersion des cellules (**Figure 8**). La formation du biofilm commence par un pré-conditionnement de la surface par les molécules présentes dans le milieu. Le contact avec la surface est favorisé par la présence d'appendices bactériens filamenteux ou d'organelles bactériens comme les pili et les flagelles (**Klausen et al., 2003**). Dans le cas du groupe *B. cereus*, il a été montré que les flagelles étaient nécessaires pour l'initiation du biofilm dans des conditions statiques, à l'interface air-liquide, mais pas à l'interface entre la surface colonisée et le liquide (**Houry et al., 2010**). Les microorganismes planctoniques se déposent ensuite sur la surface, de façon réversible. Les interactions initiales développées entre les cellules bactériennes et la surface sont favorisées par des liaisons non-covalentes ou faibles, telles que les forces de Van der Waals, les forces électrostatiques et les interactions hydrophobes. Il s'ensuit une adhésion irréversible des bactéries, qui est l'étape cruciale dans le développement du biofilm. Elle est caractérisée par des changements physiologiques des bactéries qui mènent à la production des polymères extracellulaires (**Allison et Sutherland, 1987; Bridier et al., 2015**). Une fois adhérentes à la surface, les cellules se divisent de manière active et s'agrègent pour former des microcolonies (**Characklis et Marshall, 1990**). Les cellules se divisent et accumulent des polymères extracellulaires. L'ensemble forme une

matrice cohésive dans laquelle l'accroissement de la biomasse contribue au développement de structures tridimensionnelles complexes, formant ainsi un biofilm mature. L'acheminement de l'oxygène et des nutriments vers les cellules et l'élimination des déchets sont assurés par un phénomène de convection et de diffusion des molécules selon le gradient de concentration (Ma et al., 2009). Après maturation, des cellules peuvent se décrocher du biofilm et coloniser de nouvelles surfaces sur lesquelles elles peuvent former un nouveau biofilm. Différents facteurs extrinsèques peuvent initier le détachement des cellules, y compris les perturbations mécaniques, la carence en nutriments, en oxygène ou en monoxyde d'azote ou encore la température (An et al., 2010; Hunt et al., 2004; Kaplan et Fine, 2002). D'autres facteurs intrinsèques sont également susceptibles d'engendrer l'étape de dispersion, tels que la production d'enzymes et/ou d'agents tensioactifs capables de dégrader la matrice extracellulaire (Manuel et al., 2007; Schooling et al., 2004).

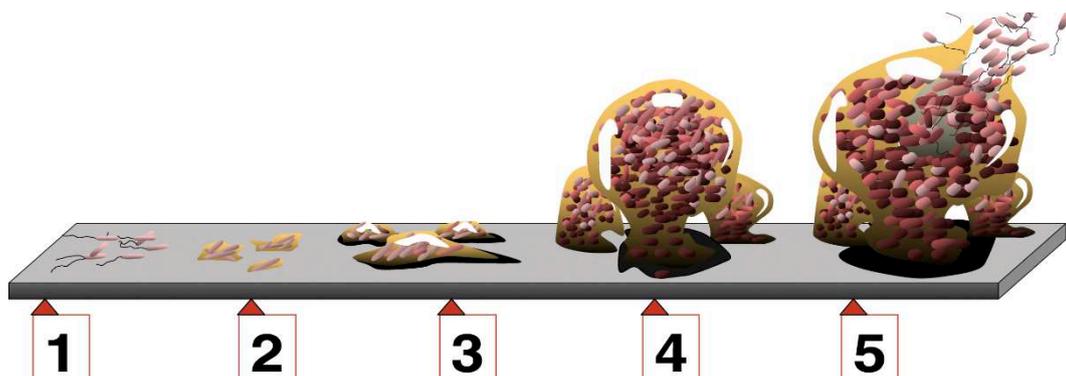


Figure 8: Représentation schématique des 5 étapes de formation du biofilm: (1) adhésion réversible, (2) adhésion irréversible, (3) accumulation, (4) maturation et (5) dispersion (Monroe, 2007).

La formation de biofilms peut mener à des problèmes d'hygiène et à des pertes économiques lourdes dans l'IAA (Andersson et al., 1995; Faille et al., 2013; Poulsen, 1999; Ryu et Beuchat, 2005; Somers et Wong, 2004; Srey et al., 2013; Stewart, 2015) (Figure 9). Elle constitue une source de contamination persistante au niveau des lignes de production, pouvant entraîner l'altération des aliments, la réduction de leur durée de conservation et/ou la transmission de maladies (Agarwal et al., 2006; Brooks et Flint, 2008; Carpentier et Cerf, 1993; Dunne, 2002; Tauveron et al., 2006; Zottola et Sasahara, 1994). Ces biofilms peuvent en effet s'enrichir de bactéries pathogènes telles que celles des genres *Bacillus*, *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus* ou *Escherichia*

(Akbas, 2015) et causer de graves problèmes de santé publique (Cerf, 2002; Tauveron et al., 2006). D'autre part, les biofilms peuvent entraver la rentabilité des lignes de production. En effet, les microorganismes sessiles présents dans les biofilms peuvent catalyser des réactions chimiques et biologiques à l'origine de problèmes de corrosion des cuves et des canalisations. De plus, si les biofilms présents sur les échangeurs thermiques deviennent épais, on assiste à une réduction de l'efficacité du transfert de chaleur (Costerton et Lappin-Scott, 1989; Mittelman, 1998; Vieira et al., 1993). Les biofilms constituent donc un problème récurrent et sérieux pour l'IAA et la confrontent à des charges importantes liés à des pertes d'énergie et de productivité, et à la nécessité d'investir pour remplacer le matériel détérioré.

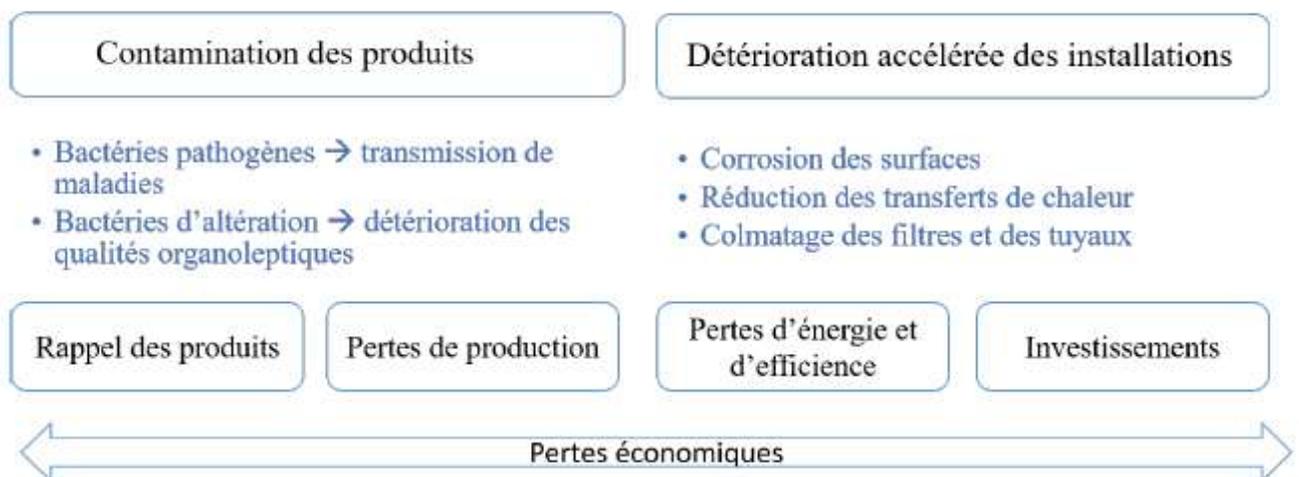


Figure 9 : Conséquences liées à la présence de biofilms dans l'IAA (Tournay, 2018).

Les biofilms s'avèrent hautement résistants aux procédures de nettoyage et désinfection, ce qui fait de leur élimination, à partir des équipements, un défi important pour l'industriel (Peng et al., 2002; Simões et al., 2006; Simões et Vieira, 2009). Les microorganismes en biofilms sont plus résistants aux désinfectants et aux agents antimicrobiens que les cellules planctoniques (Simões et al., 2006; Simões et Vieira, 2009), en raison de la nature multicellulaire du biofilm et de la présence d'une matrice qui protège les bactéries des attaques extérieures (Wijman et al., 2007). Les procédures de nettoyage deviennent donc compliquées pour assurer une bonne hygiène. Cette résistance aux procédures de nettoyage augmente avec l'âge du biofilm et dépend de la densité de la charge bactérienne à l'intérieur du biofilm, de l'état physiologique des cellules, de la nature et de l'importance de la matrice extracellulaire, de la nature de la surface colonisée et de la disponibilité

des nutriments (Simões et al., 2006; Simões et Vieira, 2009). Compte-tenu des facteurs décrits précédemment, les biofilms jouent un rôle important dans l'émergence de bactéries résistant aux agents antimicrobiens conventionnels. D'où la nécessité de développer de nouvelles stratégies de prévention (Simões et al., 2006; Simões et al., 2009; Singh et al., 2002).

5. Stratégies de contrôle des biofilms formés de bactéries du groupe *B. cereus* dans les IAA

Le nombre de publications portant sur le décrochage des biofilms de *B. cereus* et leur élimination en AA a augmenté de façon exponentielle au cours des 20 dernières années (Majed et al. 2016). Ces études peuvent aider à mieux cerner et quantifier les facteurs de risque de contamination des aliments et les problèmes de salubrité liés à ces biofilms. Elles peuvent aussi contribuer à la conception de nouvelles approches, souvent combinées, visant à prévenir leur formation et/ou leur éradication.

5.1. Les procédures de nettoyage de routine

La meilleure stratégie pour lutter contre les biofilms formés de bactéries du groupe *B. cereus* est d'empêcher leur formation, soit en réduisant la charge de spores dans les matières premières, soit en détectant et en éradiquant rapidement les biofilms en développement (Andersson et al. 1995; Simões et al. 2010). Une conception hygiénique de l'équipement et la mise en place de procédures de nettoyage efficaces avec une fréquence appropriée aideront à réduire le risque de formation de biofilms. Cependant, pour l'élimination des biofilms établis, les procédures de nettoyage de routine ne sont pas toujours efficaces (Andersson et al. 1995; Salustiano et al. 2009; Sharma et Anand 2002; Simões et al. 2010; Storgårds et al. 2006). En effet, les spores et les cellules végétatives incrustées dans les biofilms sont protégées contre l'inactivation par les désinfectants chimiques couramment utilisés pour contrôler les pathogènes d'origine alimentaire, comme l'hypochlorite de sodium, le peroxyde d'hydrogène et les ammoniums quaternaires, qui sont faciles à manipuler, peu coûteux, solubles dans l'eau et relativement stables sur une longue période de conservation (Srey et al., 2013). Par exemple, les deux désinfectants à double usage, l'ammonium quaternaire et l'hypochlorite de sodium ne permettent pas de détruire les bactéries du groupe *B. cereus* adhérentes sur une surface ou installées sous forme de biofilms à des concentrations induisant pourtant une réduction supérieure à 5 log CFU/mL de leurs équivalents planctoniques. De plus, l'efficacité des deux désinfectants est encore plus faible lorsque le biofilm est formé sur

de l'acier inoxydable sur lequel des résidus organiques comme ceux du lait sont présents (Peng et al., 2002). Le peroxyde d'hydrogène ou l'acide peracétique montrent également peu d'activité sur les spores adhérentes de *B. subtilis* et du groupe *B. cereus* (Dequeiroz et Day, 2008; Faille et al., 2001). A des températures plus élevées et pour des expositions plus longues, ces réactifs sont efficaces mais posent des problèmes de corrosion et de toxicité (Dequeiroz et Day, 2008; Langsrud et al., 2000).

Dans les biofilms, les spores de *Bacillus* présentent aussi une plus grande résistance au chlore et au dioxyde de chlore que les cellules végétatives (Kreske et al., 2006a). En outre, plusieurs études ont montré que les spores adhérentes sont plus résistantes aux hautes températures et aux désinfectants que les spores en suspension (Faille et al., 2001; Kreske et al., 2006b; Sagripanti et Bonifacino, 1999). En effet, on note la persistance de la contamination par *Bacillus* après les procédures de nettoyage et/ou de désinfection des lignes de production de l'industrie laitière (Mattila et al., 1990; Salustiano et al., 2009; Sharma et Anand, 2002). Par conséquent, il est essentiel de développer des méthodes alternatives aux moyens de maîtrise traditionnels des microorganismes pathogènes et des biofilms.

5.2. Les protocoles de nettoyage en place (NEP)

Dans les IAA, la désinfection des lignes de production est précédée d'une étape de nettoyage permettant d'éliminer tous résidus organiques pouvant favoriser l'attachement des bactéries. Dans le cas où le biofilm est déjà formé, l'étape de nettoyage garantit une destruction partielle de la matrice organique pour permettre aux désinfectants d'accéder aux cellules bactériennes (Chmielewski et Frank, 2003). Pour ce faire, les IAA ont mis en place des protocoles de Nettoyage en Place (NEP ou CIP en anglais pour Cleaning in place) permettant de contrôler la formation des biofilms dans les équipements de transformation alimentaire. Ces procédés sont utilisés pour nettoyer et désinfecter régulièrement et rapidement les lignes de production sans démontage ou ouverture de l'équipement.

Bien que le nettoyage par l'addition d'acides caustiques/nitriques et en augmentant la turbulence et le flux soit resté la méthode standard utilisée pour l'élimination des salissures dans de nombreuses industries alimentaires (Srey et al., 2013), les protocoles NEP varient selon les industries ou la chaîne alimentaire et les résidus à nettoyer. En effet, l'efficacité du NEP dépend de plusieurs facteurs tels que la nature et l'âge de la couche d'encrassement ; la concentration et la composition en produits de nettoyage, le temps et

la température de nettoyage, le degré de turbulence, et les caractéristiques de la surface à nettoyer (**Boulangue-Petermann et al., 2004; Changani et al., 1997; Lelievre et al., 2001; Lelievre et al., 2002; Stewart et Seiberling, 1996**). Dans le cas des biofilms de *B. cereus*, l'efficacité de ces procédures était relativement faible comme le cas des industries laitières où le process NEP induit une réduction de moins de 2 log des cellules et des spores de *B. cereus*, ce qui est largement insuffisant (**Kumari et Sarkar, 2016**). Plusieurs études ont signalé également une efficacité faible du régime NEP de référence (1 % de NaOH à 65 °C, un rinçage à l'eau de 10 min, 1 % de HNO₃ à 65 °C et un rinçage à l'eau de 10 min), mais elles ont montré que l'élimination était améliorée en augmentant la concentration de NaOH ou la durée du nettoyage (**Bremer et al., 2006; Flint et al., 1997; Kumari et Sarkar, 2014**). De plus, **Lemos et al. (2015)** ont montré que l'action combinée d'un traitement mécanique ou l'ajout d'un biocide est nécessaire pour promouvoir l'élimination des biofilms de *B. cereus*. En outre, les procédures NEP sont généralement paramétrées pour la lutte contre les cellules végétatives et les spores ne sont que légèrement affectées (**Bremer et al., 2006**). En effet, **Andersson et al. (1995)** ont rapporté que le NEP dans l'industrie laitière ne réduit que seulement de 40 % des spores viables. Ainsi, L'ajout d'une étape de germination avant le NEP peut réduire le nombre de spores dans les lignes de production (**Hornstra et al., 2007**). De plus, l'utilisation de soude à 1 % (généralement utilisé à 0,5-2 % dans les industries alimentaires et des boissons) ou d'un cocktail enzymatique sensibiliserait les spores de *Bacillus* à l'action des désinfectants oxydants comme les désinfectants à base de peroxygène (**Langsrud et al., 2000**).

5.3. Les stratégies de biocontrôle

Ces derniers 20 années ont vu un intérêt grandissant pour le développement des stratégies « vertes » de traitements des biofilms. Ces stratégies visent à remplacer totalement ou en partie les produits chimiques qui peuvent avoir des répercussions environnementales à cause de leur toxicité. Parmi les stratégies de biocontrôle développées pour lutter contre les agents pathogènes y compris le groupe *B. cereus*, on peut mentionner :

- La pré-exposition de biofilms à un mélange de bactéries nageuses et productrices de composés antimicrobiens qui s'infiltrer dans la matrice, inactive les agents pathogènes installés et occupe le nouvel espace libéré sur la surface (**Houry et al., 2010**).
- L'utilisation des bactériocines, qui sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire produites principalement par les bactéries lactiques (**Garry et al., 2008**),

comme agents améliorant l'efficacité de nettoyage et de désinfection. Néanmoins, afin d'affirmer leur efficacité contre des biofilms, des études doivent être menées.

- L'utilisation des agents chélateurs en combinaison avec le nettoyage et la désinfection permettant d'augmenter l'efficacité du nettoyage. **Hong et Elimelech (1997)** ont montré que l'EDTA facilite l'élimination des matières organiques encrassant les membranes de nanofiltration. De plus, **Kamiya et al. (2012)** ont montré que la lactoferrine est capable de perturber les biofilms préformés de *Pseudomonas*. Cependant, cette stratégie aurait très probablement un rôle préventif qui inhibe la formation du biofilm de *B. cereus* plutôt que d'éliminer le biofilm déjà formé (**Hayrapetyan, 2017**).
- L'élimination de l'air à l'intérieur des lignes de production permet la réduction des interfaces air liquide où *B. cereus* notamment forme préférentiellement ses biofilms (**Hayrapetyan, 2017**).
- L'exploration de biocides générés sur place, tels que l'ozone ou de l'eau acide électrolysée pour lutter contre les agents pathogènes (**Ashraf et al., 2014**)
- L'utilisation de substances naturelles telles que les huiles essentielles qui ont été trouvées notamment actives contre les biofilms industriels papetiers (**Neyret et al., 2014**).
- L'incorporation de produits antimicrobiens dans les matériaux extérieurs des surfaces de contact avec l'aliment (**Weng et al., 1999; Park et al., 2004**) et la modification des leurs propriétés physico-chimiques (**Agarwala et al. 2014; Rosmaninho et al., 2007; Whitehead et al., 2004**) sont également une voie de progrès permettant de prévenir la formation de biofilms et empêcher leur établissement. C'est ainsi que le pré-conditionnement des surfaces avec des agents tensio-actifs empêche l'adhérence bactérienne (**Chen, 2012; Choi et al., 2011; Cloete et Jacobs, 2001**). En effet, après conditionnement avec un agent tensio-actif, la surface devient plus hydrophile, ce qui induit une réduction du risque de colonisation des surfaces par des spores de *Bacillus* (**Zeraik et Nitschke 2010**). Par exemple, l'albumine du lait a été testée avec succès pour empêcher l'adhésion bactérienne sur des plastiques (**Muller et al., 2009**). Cette activité antiadhésive des agents tensio-actifs a attiré l'attention comme nouvel outil pour empêcher et perturber les biofilms formés dans des surfaces des chaînes de production (**Nitschke et Costa, 2007**).
- L'utilisation de détergents enzymatiques est l'approche de biocontrôle des biofilms la plus étudiée. Certains industriels dont les procédés de nettoyage traditionnels

deviennent inefficaces, ont choisi de développer des cocktails enzymatiques capables de décomposer partiellement les différentes composantes de la matrice. Ce traitement présente plusieurs intérêts par rapport aux solutions de nettoyage traditionnelles, par exemple, un faible risque toxicologique et risque écologique, une facilité de rinçage des résidus externes et une compatibilité avec les différents matériaux de surface (Thallinger et al., 2013). En raison de l'hétérogénéité des substances polymériques extracellulaires (EPS), une formulation contenant plusieurs enzymes peut être nécessaire pour réussir à contrôler le biofilm (Simões et al., 2010). D'après Parkar et al. (2004), une combinaison d'enzymes protéolytiques avec des agents tensio-actifs a amélioré l'efficacité de nettoyage des biofilms d'une espèce de *Bacillus* thermophile tout en augmentant leur mouillabilité. Certains cocktails enzymatiques commercialisés ont fait preuve de leur efficacité contre les biofilms produits par *B. cereus* ou *B. mycoides*, mais aussi contre les spores adhérentes de *B. cereus* (Langsrud et al., 2000; Lequette et al., 2010; Parkar et al., 2004). L'utilisation de ces détergents enzymatiques est proposée comme solution complémentaire aux procédés de nettoyage actuels puisqu'elles sont plus coûteuses que les produits conventionnels.

- L'utilisation des bactériophages, qui sont des virus infectant spécifiquement les bactéries, suscite un intérêt croissant en ce qui concerne la prévention et l'éradication des biofilms de plusieurs espèces bactériennes telles que : *Escherichia coli* (Corbin et al., 2001), *Enterococcus faecalis* (Teng et al., 2009), *Listeria monocytogenes* (Hibma et al., 1997; Soni et Nannapaneni, 2010), *Pseudomonas fluorescens* (Sillankorva et al., 2008), *Staphylococcus aureus* (Resch et al., 2005), *Salmonella* (Garcia et al., 2017; Gong et Jiang, 2017; Karaca et al., 2015; Sadekuzzaman et al., 2018), et *Streptococcus mutans* (Dalmaso et al., 2015). Les caractéristiques et les applications des bactériophages comme agent de biocontrôle dans les IAA feront l'objet de la prochaine section.

6. Les bactériophages en tant que moyens de contrôle des bactéries du groupe *B. cereus*

6.1. Caractéristiques génétiques et morphologiques des bactériophages du groupe *B. cereus*

L'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) classe les bactériophages en un ordre, 13 familles et 30 genres (contre 3 ordres, 61 familles et 241 genres pour

l'ensemble des virus). Plus de 5300 phages ont été examinés à ce jour et 96 % d'entre eux ont une queue et appartiennent à l'ordre des *Caudovirales*. Les *Caudovirales* se scindent en 3 familles sur la base de leur morphologie (**Tableau 5, Figure 10**), (**Ackermann, 2003; King et al., 2012**).

Tableau 5: Morphologie des *Caudovirales* (**Ackermann, 2003; Gillis et Mahillon, 2014**).

Famille	Morphologie
<i>Myoviridae</i>	Queue contractile avec une gaine et un tube central, tête isométrique, petit disque de base
<i>Siphoviridae</i>	Longue queue non contractile, tête isométrique (parfois allongée)
<i>Podoviridae</i>	Courte queue, tête isométrique (parfois allongée)

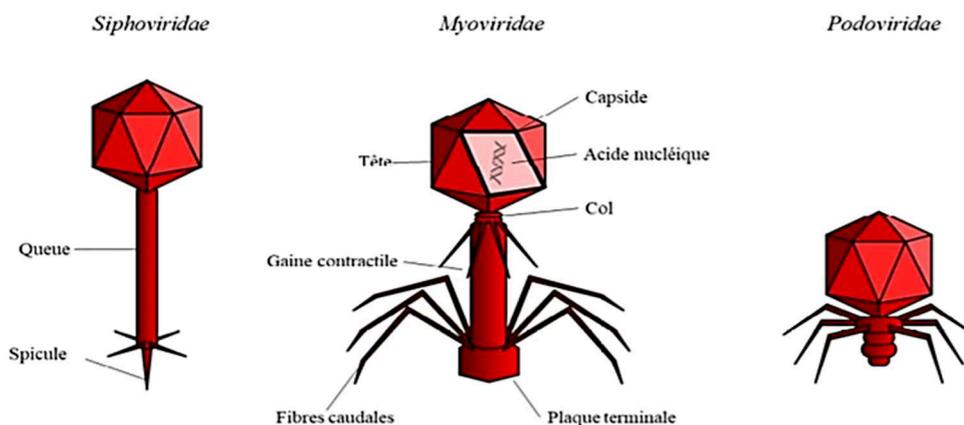


Figure 10: Caractéristiques morphologiques des *Caudovirales*: les *Siphoviridae*, les *Myoviridae* et les *Podoviridae* (**Tournay, 2018**).

Des études antérieures ont montré que certains bactériophages spécifiques du groupe *B. cereus* appartenaient à la famille des *Siphoviridae* (**Geng et al., 2017 ; Oh et al., 2017**) ainsi que d'autres font partie de la famille des *Myoviridae* (**Bandara et al., 2012 ; El-Arabi et al., 2013 ; Lee et al. 2011 ; Lee et al. 2013 ; Peng et Yuan., 2018 ; Shin et al. 2011**). Le phage MG-B1 est cependant le seul *Podoviridae* répertorié infectant un membre du groupe (*B. weihenstephanensis*) (**Gillis et Mahillon, 2014**). Parmi les autres familles de phages infectant les bactéries du groupe, les *Tectiviridae* sont les plus intéressants. Ces virions non caudés ne sont pas assignés à un ordre selon la base de données de l'ICTV. La famille des *Tectiviridae* comprend des phages icosaédriques avec une vésicule lipidique interne qui, par adsorption, peut agir comme une structure en forme de queue pour l'injection du génome (**Ackermann, 2006**). Différents membres de la

famille des *Tectiviridae* (P-50, Bam35, GIL01, GIL16, Emet, Sole, Sato, Sand et Wip1) ont été décrits comme infectant les bactéries du groupe *B. cereus* (El-Arabi et al., 2013; Gillis et Mahillon, 2014). Les *Tectiviridae* sont des virus rares avec un spectre d'hôte très vaste. Ils sont dépourvus de queue mais sont tapissés de pointes apicales (Ackermann, 2003). Ils possèdent une capsidie isométrique entourant une vésicule lipoprotéique (Gillis et Mahillon, 2014).

Jusqu'à présent, aucun phage filamenteux, à ADN monocaténaire ou à ARN n'a été identifié dans ce groupe bactérien (King et al., 2012).

Les caractéristiques des différentes familles de phages infectant les bactéries du groupe *B. cereus* sont présentées dans le **tableau 6**. Le spectre d'hôte est déterminé par la spécificité de la reconnaissance de la bactérie. Cette dernière est médiée par les protéines fibreuses de la queue du phage. Par exemple, les phages Wβ et BtCS33 infectant *B. thuringiensis* ont un génome très proche mais n'ont pas le même spectre d'hôte car leur queue n'ont que 65 % d'acides aminés en commun (Yuan et al., 2012).

Tableau 6: Caractéristiques des familles de phages infectant les bactéries du groupe *B. cereus* (Lee et al., 2014).

Famille	Taille du génome (intervalle)	Cycle de vie
<i>Myoviridae</i>	94 à 219 kb	Virulent
<i>Siphoviridae</i>	36 à 53 kb	Tempéré
<i>Tectiviridae</i>	14,3 à 14,9 kb	Tempéré

Une analyse phylogénétique comparative basée sur les séquences en acides aminés des protéines majeures des capsides (MCPs) et les grandes sous-unités de la terminase (TerL) de 30 phages infectant le groupe *B. cereus* ont permis de les diviser en 3 groupes évolutifs (I, II et III).

Le groupe I correspond aux *Myoviridae* hormis pour les phages 0305phi8-36 et BCD7, dont les génomes diffèrent de celui des autres phages de la famille (Lee et al., 2014). Les groupes II et III sont respectivement composés de *Siphoviridae* et de *Tectiviridae*. Cependant, un nombre important de phages infectant les membres du groupe *B. cereus* ne trouvent pas de place dans cette classification (trop éloignés des autres phages aux niveaux évolutif, génomique et /ou morphologique) (**Tableau 7**).

Tableau 7: Classification des phages du groupe *B. cereus* selon l'analyse des protéines majeures des capsides et des grandes sous-unités de la Terminase (Lee et al., 2014).

Groupe I	Groupe II	Groupe III	Autres
B4B5S	BtCS33	AP50	BMBtp2
Bastille	phIS3501	Bam35	TP21-L
W. Ph.	Wβ	GIL16C	IEBH
BPS10C		GIL01	PhBC6A51
BPS13			BCD7
vB_BceM_Bc431v3			PBC1
BCP78			BceA1
BCU4			MZTP02
			0305phi8-36
			phBC6A52
			11143

Une analyse génomique comparative des phages du groupe I, II et III a montré que l'ensemble de gènes fonctionnels (lyse bactérienne, emballage, manipulation de l'ADN) sont situés à des positions très similaires, ce qui suggère que l'arrangement du génome est identique dans tous les membres du groupe I, II et III des phages (Lee et al., 2014).

6.2. Application des bactériophages au contrôle des bactéries du groupe *B. cereus* dans les IAA

Les phages représentent un outil prometteur pour le biocontrôle des bactéries pathogènes. Ils ont non seulement un grand potentiel pour le traitement des infections bactériennes (phagothérapie), mais aussi pour améliorer la sécurité microbiologique, en particulier dans l'industrie agroalimentaire. Le biocontrôle par les phages inclut trois champs d'application principaux : (i) la prévention et la réduction de la colonisation bactérienne chez les animaux d'élevages (Endersen et al., 2004), (ii) la désinfection des équipements et des surfaces en contact avec les aliments dans les industries (Garcia et al., 2008) et (iii) leur application directe sur des produits finis ou en cours de transformation afin de prolonger leur durée de conservation (Garcia et al., 2008).

La majorité des études axées sur l'isolement des bactériophages infectant le groupe *B. cereus* ont pour objectif le contrôle de la présence des membres du groupe *B. cereus* dans les aliments. Par exemple, Lee et al. (2011) ont isolé et caractérisé deux *Myoviridae*, FWLBc1 et FWLBc2 qui, en mélange, ont la capacité de réduire de 6 log la concentration bactérienne d'une purée de pomme de terre après seulement 24 h d'incubation à température ambiante. De plus, un *Myoviridae*, JBP901, isolé à partir de chungkookjang

(produit de fermentation rapide du soja à), a pu réduire la concentration de 3 log sans affecter la croissance de *Bacillus subtilis*, nécessaire à la fermentation (Shin et al., 2011). Deux autres phages, BCP1-1 et BCP8-2, isolés à partir de chungkookjangs coréens, ont permis de contrôler le développement de bactéries du groupe *B. cereus*, mais seulement après ajout de cations divalents au milieu (Bandara et al., 2012). Ces résultats montrent que les bactériophages peuvent permettre de contrôler le développement des bactéries du groupe *B. cereus* dans les aliments.

Une autre stratégie de biocontrôle, qui n'implique pas nécessairement les phages eux-mêmes, consiste à utiliser les endolysines qui sont des enzymes produites par les phages à la fin du cycle lytique. Ces enzymes ciblent et digèrent l'intégrité de la paroi cellulaire (Fischetti, 2008). De plus, les endolysines ont un spectre d'activité généralement plus large que celui des bactériophages (Fischetti, 2010). Par conséquent, elles peuvent être appliquées comme agent de biocontrôle, seules ou en combinaison avec d'autres antimicrobiens comme les bactériocines (Schmelcher et Loessner, 2016). Certaines endolysines ont été étudiées pour être utilisées contre les souches pathogènes d'origine alimentaire du groupe *B. cereus*. Par exemple, l'endolysine LysBPS13, codée par le génome du phage BPS13, a montré une activité antimicrobienne vis-à-vis de différentes espèces de *Bacillus* et de certaines bactéries à coloration de Gram négative traitées par l'EDTA. La plus forte activité antimicrobienne s'est manifestée à l'égard de la souche ATCC 10876 du groupe *B. cereus* (Park et al., 2012). LysBPS13 présente une thermostabilité remarquablement élevée en présence de glycérol et conserve son activité lytique après incubation à 100 °C pendant 30 minutes, caractéristiques qui en font un excellent candidat pour contrôler le groupe *B. cereus* dans l'industrie agroalimentaire (Park et al., 2012). L'endolysine du phage B4 infectant le groupe *B. cereus*, appelée LysB4, a montré un large spectre d'activité, lysant des bactéries du groupe *B. cereus*, mais aussi *B. subtilis*, *Listeria monocytogenes* et certaines bactéries à coloration de Gram négative traitées par l'EDTA (Son et al., 2012). Les endolysines PlyBa, Ply21 et Ply12 provenant des phages Bastille, TP21-L et 12826 du groupe *B. cereus*, respectivement, et qui ont été produites comme protéines recombinantes, ont engendré une lyse rapide et spécifique des cellules viables de plusieurs espèces de *Bacillus*, avec une activité maximale sur les espèces *B. cereus* et *B. thuringiensis* (Loessner et al., 1997). Il a aussi été montré que les deux endolysines, Mur1 et Mur2, codées par le phage GIL01 infectant le sérotype *israelensis* de *B. thuringiensis*, ont une activité muralytique permettant la dégradation de la paroi de la cellule cible (Verheust et al., 2004). L'activité muralytique

de Mur2 est limitée à *B. thuringiensis sv. israelensis*, alors que Mur1 a un spectre d'action plus large, incluant *B. subtilis* et *Micrococcus lysodeikticus* (Verheust et al., 2004).

Malgré une production onéreuse en comparaison à celle des phages, ces exemples montrent que les endolysines représentent de bons candidats en tant qu'agents antibactériens alternatifs pour le traitement, la prophylaxie et le biocontrôle des bactéries appartenant au groupe *B. cereus*.

Pour conclure, il est important de considérer que même si la plupart des phages ne présentent a priori aucun risque pour la santé humaine ou l'environnement, ils peuvent susciter, dans certaines circonstances, des préoccupations en matière de biosécurité (Verheust et al., 2010). En effet, ce sont des entités dynamiques qui interagissent avec leur hôte bactérien en apportant et en diffusant potentiellement de nouveaux caractères génétiques. Par conséquent, une évaluation rigoureuse des risques est nécessaire avant d'utiliser des phages et des produits dérivés de phages. En général, pour qu'un phage soit sélectionné pour son application comme agent de biocontrôle dans la chaîne alimentaire, il doit répondre à un certain nombre de caractéristiques qui garantiront son innocuité et son efficacité. Parmi ces caractéristiques, on peut citer le fait qu'il soit strictement virulent, qu'il présente un large spectre d'hôte et qu'il ne soit capable ni d'effectuer une transduction généralisée ni la conversion lysogénique de son hôte (Klumpp et Loessner, 2013). La caractérisation moléculaire détaillée du génome du phage est obligatoire car elle permet d'exclure les phages présentant des gènes pouvant potentiellement coder pour des toxines ou des facteurs de résistance aux antibiotiques (Huys et al., 2013).

Objectifs et Stratégie du travail

La sécurité sanitaire des aliments constitue l'une des grandes exigences pour préserver la santé publique. La consommation d'aliments contaminés par des agents pathogènes et des sous-produits microbiens tels que les toxines pourrait entraîner des maladies graves.

Le groupe *B. cereus* a été choisi pour cette étude car c'est une bactérie reconnue comme un pathogène opportuniste pouvant contaminer un grand nombre d'aliments. De plus, cette bactérie pose de plus en plus problèmes dans l'industrie agroalimentaire. D'une part, la faculté de *B. cereus* à produire des spores à partir de la forme végétative leur permet de se déposer dans les installations en inox et développer un biofilm difficile à éliminer du procédé et très résistantes aux traitements thermiques classiques comme la pasteurisation. D'autre part, certaines souches dites psychrotrophes ou psychrotolérantes vont pouvoir se développer dans le cas d'un stockage au froid. Les membres du groupe *B. cereus* sont présents dans de nombreux aliments qui peuvent s'en trouver altérés ou contaminés par des souches pathogènes capables de provoquer des intoxications alimentaires émétiques et/ou diarrhéiques. Les maladies d'origine alimentaire causées par ces bactéries du groupe *B. cereus* sont généralement bénignes et résolues spontanément. Cependant, elles peuvent aussi occasionnellement entraîner l'hospitalisation ou même la mort de personnes immunodéprimées. En Tunisie, d'après nos connaissances, aucun travail n'a étudié la contamination des produits alimentaires par le groupe *B. cereus* et sa maîtrise.

Notre travail a été donc naturellement axé premièrement à étudier la prévalence des souches du groupe *B. cereus* dans différentes matrices alimentaires, à les caractériser afin d'évaluer leur diversité génétique et le niveau de risque en matière de sécurité sanitaire des aliments. Puis deuxièmement, à définir les capacités des bactériophages infectant le groupe *B. cereus* qu'on a déjà isolés comme moyen de lutte contre les biofilms pouvant se former à la surface des installations en industries agroalimentaires.

Dans un premier chapitre de ce travail, on s'est intéressé à étudier la prévalence et la diversité génétique des isolats du groupe *B. cereus* d'origine alimentaire. Ce travail comprend la recherche des bactéries du groupe *B. cereus* dans 687 échantillons alimentaires. Les isolats présomptifs du groupe *B. cereus* ont fait l'objet d'une identification par un test PCR ciblant la séquence du gène *sspE*, spécifique du groupe. Divers tests de caractérisation ont été réalisés. Des tests PCR ciblant des séquences signatures spécifiques des mésophiles et des psychrotrophes ont été réalisés. Les capacités d'adhésion des bactéries sur les surfaces industrielles ont été évaluées. L'analyse des séquences du gène *panC* permet d'assigner rapidement les isolats bactériens aux

différents groupes phylogénétiques. Ces derniers fournissent une prédiction du potentiel toxigénique des souches ainsi qu'une meilleure estimation du risque sanitaire des aliments. Les différents isolats du groupe *B. cereus* ont été soumis également à une étude de diversité avec les méthodes PFGE et ERIC-PCR.

Dans un deuxième chapitre de ce travail, on s'est intéressé à évaluer les risques sanitaires causés par les bactéries du groupe *B. cereus*. Les isolats du groupe *B. cereus* ont fait l'objet d'une évaluation de leur pouvoir pathogène (présence de gènes de virulence, activité cytotoxique sur cellules Caco-2 et résistance aux antibiotiques). La distribution des facteurs de virulence au sein de la collection va permettre de classer les souches en différents groupes toxigènes. Une étude statistique a été réalisée afin d'établir le lien entre les différentes combinaisons des facteurs de virulence et potentiel cytotoxique des bactéries.

Dans un troisième chapitre de ce travail, on s'est focalisé sur l'isolement, l'identification et la caractérisation des bactériophages infectant les bactéries du groupe *B. cereus* afin de les utiliser comme des agents de biocontrôle qui pourraient être utilisés pour lutter contre les biofilms de *B. cereus*. Afin de sélectionner les phages à spectre d'hôte large, des analyses des spectres lytiques de des bactériophages isolés ont été réalisées contre les 174 souches du groupe *B. cereus* de notre collection. Les bactériophages sélectionnés seront caractérisés morphologiquement par observation au microscope électronique à transmission. Puis, ils seront caractérisés par SDS-PAGE afin d'identifier leurs profils protéiques. Et enfin, par digestion enzymatique de l'ADN génomique afin d'identifier les tailles de leurs génomes et leurs profils de restriction enzymatique

Dans un quatrième et dernier chapitre de ce travail, on s'est intéressée à évaluer l'efficacité des bactériophages sur l'inhibition et l'éradication des biofilms des bactéries du groupe *B. cereus*. La capacité des bactériophages précédemment sélectionnés à différents titres (10^5 - 10^8 UFP/mL) pour lutter contre les biofilms de *B. cereus* a été évaluée. Deux traitements ont été testés : un préventif et un curatif. Pour le traitement préventif, une suspension de la souche hôte et du phage l'infectant a été déposée sur des coupons en inox contenus dans des plaques de 24 puits et incubée pendant 24, 48 et 72h. Pour le traitement curatif, différents bactériophages ont été appliqués de la même manière durant 4 h sur un biofilm déjà formé

En conclusion, ce travail vise à confirmer le risque sanitaire lié à la présence du groupe *B. cereus* et le rôle des bactériophages comme outil prometteur pour le biocontrôle des bactéries pathogènes au sein de la filière agro-alimentaire.

Matériels et Méthodes

Le présent travail était réalisé au Laboratoire de Recherche Toxicologie Microbiologie Environnementale et Santé, Université de Sfax, Tunisie et à l'Unité Mixte de Recherche STLO - Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, Equipe Microbiologie, Agrocampus-Ouest de Rennes, France. La phase d'isolement et d'identification présomptive du groupe *B. cereus* était réalisée au centre d'hygiène publique de Sfax (Sud-Est de la Tunisie).

1. Prélèvement des échantillons

Entre avril 2014 et avril 2015, une sélection de 687 échantillons alimentaires était collectée à partir de supermarchés, d'hôtels, de restaurants et d'IAA. Parmi ces échantillons, on compte des produits céréaliers (n = 103), des épices (n = 59), des produits de pâtisserie (n = 80), des aliments cuits (n = 103), des produits en conserve (n = 93), des produits de la mer (n = 34), des produits laitiers (n = 84), des légumes coupés frais (n = 99), des viandes de volaille crue (n = 85) et des viandes de volaille cuite (n = 55). Les produits céréaliers sont composés de farine de blé et d'orge, de semoule, de pâtes et de couscous. Les échantillons d'épices comprennent du paprika, du cumin, du poivre noir, de la coriandre et du curcuma. Les produits de pâtisserie comprennent des gâteaux, des croissants au chocolat et des glaces. Les aliments cuits comprennent des échantillons de soupe, des pâtes cuites, des omelettes, de la sauce à la viande hachée, de la sauce aux poivrons grillés et des frites. Les conserves sont composées de thon, de jus et d'harissa. Les produits de la mer comprennent des poissons (dorades et loups) et des palourdes. Les produits laitiers sont soit du lait, du beurre ou des fromages. Les légumes frais coupés comprennent des salades composées de légumes et de légumes mélangés crus tels que l'oignon, le persil, le basilic et la coriandre. L'ensemble des volailles comprend des échantillons de viande crue et cuite de poulet et de dinde. Les échantillons de viande de volaille cuite sont composés de poulet rôti et grillé (viande et saucisses). Les différents échantillons d'aliments sont transportés dans des conditions d'asepsie complète dans un conteneur de transport frais jusqu'au centre public d'hygiène de Sfax (Sud-Est de la Tunisie). Les échantillons sont analysés dans les 24 h suivant le jour de prélèvement.

2. Souches de référence

Dans cette étude, la souche *B. cereus* LMA 1038 est utilisée pour l'identification du groupe *B. cereus* par amplification du gène *sspE*. Cette souche est aussi utilisée comme témoin positif pour le test de cytotoxicité sur les cellules Caco-2. Pour la recherche des signatures « *16S rDNA-1 m* », « *16S rDNA-2 p* » et « *cspA* », les souches C43

(Guinebretière et al., 2002) et BW1 (Baron et al., 2007) sont utilisées comme témoins pour les tests d'adhésion sur coupons en inox. La souche C43 est aussi utilisée pour la mise en évidence des gènes *hblA*, *hblB*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC* et *cytK*. La souche TIAC 1095 (Techer et al., 2014) est utilisée comme témoin positif pour la mise en évidence du gène *ces* (céréulide), responsable de la sécrétion de la toxine émétique. La souche *E. coli* ATCC 8739 est utilisée pour le contrôle de la qualité de l'antibiogramme.

3. Isolement et dénombrement des bactéries du groupe *B. cereus*

3.1. Milieux de culture et tampons utilisés

Tous les milieux de cultures et solutions préparés sont autoclavés pendant 20 min à une température de 121 °C. Après autoclavage, les milieux de cultures solides contenus dans des flacons sont coulés dans des boîtes de Pétri stériles de 92 mm de diamètre et de 16 mm de hauteur (Starstedt, Nümbrecht, Allemagne) et laissés à refroidir et à sécher à température ambiante pendant 24 h avant d'être placés au réfrigérateur à 4 °C.

3.1.1. Milieu d'enrichissement : Eau Peptonée Tamponnée (EPT) + Chlorure de Lithium (LiCl)

L'eau peptonée tamponnée (EPT) est un milieu liquide jaune clair, non-sélectif, utilisé pour l'enrichissement des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. Sa composition (VWR, Strasbourg, France) est indiquée dans le **Tableau 8**.

Pour isoler les bactéries du groupe *B. cereus*, il est nécessaire de réaliser une étape d'enrichissement dans un milieu contenant de l'eau peptonée tamponnée additionnée de chlorure de lithium (LiCl) (Prolabo, Fontenay sur bois, France) à 5 g/L. Ce dernier permet d'inhiber la croissance des bactéries à coloration de Gram négative au profit des bactéries à coloration de Gram positive.

La solution de LiCl et le milieu d'EPT + LiCl se préparent le jour de leur utilisation et ne se conservent pas.

Tableau 8: Composition de l'eau peptonée tamponnée.

Composants	Concentration (g/L)
Bacto peptone	20
Phosphate dibasique de sodium (Na ₂ HPO ₄)	9
Phosphate monobasique de potassium (KH ₂ PO ₄)	1,5
Chlorure de sodium	5
pH (25 °C) final = 7,0 ± 0,2	

3.1.2. Le Bouillon Tryptone Soja (TSB)

La préparation du TSB consiste à mettre en suspension 30 g de milieu TSB déshydraté (AES Laboratory, Combourg, France) dans 1 litre d'eau distillée suivi d'un autoclavage. La composition du milieu TSB est indiquée dans le **Tableau 9**.

Tableau 9: Composition du milieu TSB.

Composants	Concentration (g/L)
Hydrolysate pancréatique de caséine	17
Peptone de soja	3
Chlorure de sodium	5
Phosphate dibasique de potassium (K ₂ HPO ₄)	2,5
Glucose	2,5
pH (25 °C) final = 7,3 ± 0,2	

3.1.3. Le Tryptone Sel (TS)

Le Tryptone Sel (TS) est un liquide isotonique contenant 8,5 g/L de chlorure de sodium (Merck, Darmstadt, Allemagne) et 1 g/L de tryptone (Oxoid, Basingstoke, Angleterre), utilisé pour effectuer les dilutions décimales des prélèvements alimentaires.

3.1.4. Le Bouillon BHI-YE

Un des milieux utilisés pour la culture des bactéries est le milieu Brain Heart Infusion-Yeast Extract (BHI-YE). Sa préparation consiste à dissoudre 37 g de poudre BHI (Fisher Bioblock, Illkirch, France) et 10 g d'extrait de levure (Fisher Bioblock) dans 1 L d'eau distillée. Les différents composés de la poudre BHI sont indiqués dans le **Tableau 10**.

Tableau 10: Composition de la poudre BHI.

Composants	Concentration (g/L)
Peptone pancréatique de gélatine	10
Infusion de cervelle de veau	12,5
Infusion de cœur de bœuf	5
Glucose	2
Chlorure de sodium	5
Phosphate dibasique de sodium (Na ₂ HPO ₄)	2,5
pH (25 °C) final = 7,4 ± 0,2	

3.1.5. Le milieu BHI-YE Agar

Sa préparation consiste à dissoudre 37 g de la poudre BHI (Fisher Bioblock), 10 g d'extrait de levure (Fisher Bioblock) et 15 g d'Agar (VWR) dans 1 L d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition tout en agitant. Après autoclavage, la gélose BHI-YE est coulée dans des boîtes de Pétri.

3.1.6. Le milieu « Mannitol, egg Yolk, Polymyxin » (MYP)

Le milieu « Mannitol, egg Yolk, Polymyxin » (MYP) est une gélose sélective pour le groupe *B. cereus* conçue par Mossel (Mossel et al., 1967). Il est utilisé pour la détection et le dénombrement des cellules végétatives et des spores du groupe *B. cereus* dans les produits alimentaires. Sa spécificité est basée sur la mise en évidence de l'incapacité du groupe *B. cereus* à fermenter le mannitol et de l'activité lécithinase de certaines souches. La composition de la base Mossel (Biokar, Allonne, France) est indiquée dans le **Tableau 11**. Afin de préparer du MYP, 950 mL d'eau distillée sont additionnés à 46 g de milieu de base déshydraté (le volume est alors de 980 mL) et l'ensemble est stérilisé. Une fois la température de 48°C atteinte, 20 mL d'une émulsion stérile de jaune d'œufs avec polymyxine B (Sigma ref P1004 à 6000 unités/mg) (Sigma, St Quentin Fallavier, France) sont ajoutés. La concentration finale en polymyxine B est de 0,01 g/L (60 000 unités/L) et la concentration en jaune d'œuf de 1 % (v/v). L'homogénéisation s'est effectués en agitant le flacon et la solution est ensuite coulée dans des boîtes de Pétri.

La gélose ainsi obtenue est supposée être sélective grâce à l'ajout de polymyxine B qui inhibe la flore secondaire et à laquelle le groupe *B. cereus* est résistant.

L'identification des colonies présumées du groupe *B. cereus* est basée (i) d'une part sur l'activité lécithinase, permettant la dégradation de la lécithine du jaune d'œuf en produits insolubles et qui se traduit par un précipité visible autour de la colonie ; (ii) d'autre part sur l'incapacité du groupe *B. cereus* à fermenter le mannitol, qui se traduit par une coloration rose-rouge autour de la colonie, signe que l'indicateur coloré n'a pas viré au jaune et que le mannitol n'est pas fermenté.

Tableau 11: Composition de la base Mossel.

Composants	Concentration (g/L)
Peptone	10
Extrait de viande	1
Mannitol	10
Rouge de phénol	0.025
Chlorure de Sodium	10
Agar	14
pH (25 °C) final = 7,2 ± 0,2	

3.2. Méthodologie

3.2.1. Préparation de la suspension et mise en culture

Pour cette étude, la suspension mère des échantillons liquides est obtenue en prélevant après homogénéisation, dans un tube à essai stérile, une aliquote de 10 mL auprès de la flamme d'un bec Bunsen. Pour les échantillons solides, une suspension au dixième est préparée en plaçant 10 g d'échantillon en présence de 90 mL d'eau peptonée additionnée de chlorure de lithium dans un sachet Stomacher et en homogénéisant le mélange pendant 3 min à l'aide d'un Stomacher (Colworth 400) (A.J. Seward Ltd., London, Angleterre). Un volume de 10 mL du surnageant est recueilli dans un tube à essai et a constitué la suspension mère qui a servi à la préparation des dilutions décimales. À partir de chacune des suspensions mères obtenues (échantillons liquides et solides), des dilutions décimales successives en TS sont réalisées jusqu'à la dilution 10^{-4} .

Un millilitre de la suspension mère ainsi que de chacune des dilutions décimales successives sont étalées à la surface de boîtes de Pétri contenant 15 mL de gélose Mossel (Merck), préalablement coulées et séchées. Les boîtes inoculées sont incubées à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18-24 h. Les suspensions mères et les dilutions décimales successives sont ensemencées en double.

3.2.2. Comptage des colonies présumées de *B. cereus*

Après incubation, les boîtes contenant moins de 150 colonies sont retenues, et si possible, sur deux dilutions successives. Les colonies caractéristiques du groupe *B. cereus* sont entourées puis comptées et notées. Celles-ci sont rugueuses, de couleur rose (mannitol-négatives) et entourées d'un halo de précipité indiquant la production de lécithinase. Le dénombrement est effectué à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n1 + 0.1n2)d}$$

Où

n1 est le nombre des boîtes retenues à la première dilution.

n2 est le nombre de boîtes retenues de la dilution qui précède la toute première dilution.

d est le taux de dilution de la première dilution retenue.

N est le dénombrement moyen de bactéries du groupe *B. cereus* en UFC/g ou en UFC/mL.

ΣC est la somme des colonies dans toutes les boîtes retenues des dilutions effectuées.

V est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en mL.

.

3.2.3. Obtention et conservation des isolats

A partir des boîtes de Pétri ayant servi au dénombrement, une seule colonie caractéristique bien isolée de chaque échantillon positif était repérée et récupérée. Chaque colonie prélevée est repiquée sur milieu BHI-YE agar et incubée pendant 24 h à 30°C. A partir de cette culture, une colonie par boîte est par la suite transférée individuellement dans un tube contenant 6 mL de bouillon Tryptone de Soja (TSB) (AES) et incubée pendant 24 h à 30°C. Pour la conservation des isolats présomptifs du groupe *B. cereus*, 700 µL de chaque culture sont congelés à -80°C en cryotubes, en présence de 700 µL de glycérol à 50 %.

4. Identification des isolats par PCR

Au total, 191 isolats présomptifs du groupe *B. cereus* ont fait l'objet d'une identification moléculaire. Cette identification a été décrite en cinq étapes, notamment l'extraction de l'ADN génomique, l'amplification d'un fragment spécifique du gène *sspE* codant pour une protéine structurale caractéristique des spores du groupe *B. cereus* (Kim et al., 2005), l'amplification des deux signatures spécifiques, la signature « *16S rDNA-1 m* » des bactéries mésophiles et la signature « *16S rDNA-2 p* » des bactéries psychrotrophes au niveau du gène *16S rDNA* (codant pour la petite sous-unité ribosomale de l'ARN 16S) (Von Stetten et al., 1998) et l'amplification d'une signature spécifique aux bactéries psychrotrophes sur le gène *cspA*, qui code pour une protéine majeure liée au choc froid (Francis et al., 1998).

4.1. Préparation de l'ADN génomique

4.1.1. Préparation de l'inoculum bactérien

Les isolats présomptifs du groupe *B. cereus* sont décongelés par ensemencement à 2 % dans 10 mL de BHI-YE et incubation pendant une nuit à 30°C. Le bouillon de culture de chaque isolat ainsi obtenu est repiqué à 2 % dans 10 mL de BHI-YE puis incubé à 30°C pendant 18-24 h.

4.1.2. Extraction de l'ADN

L'ADN génomique est extrait par la méthode mettant en œuvre des billes Chelex, telle que décrite par Walsh et al. (1991). Elle consiste à transférer 5 mL de culture dans un tube Falcon de 15 mL contenant 300 µL de tampon de lyse (solution à 25 % de billes Chelex (Sigma)). L'ensemble est vortexé puis centrifugé à 10000 g pendant 7 min à 4°C. Après élimination du surnageant au Pipetman, le culot, qui contient les cellules adsorbées sur les billes Chelex, est repris dans 200 µL d'eau milliQ stérile (Sigma). Le tube est

chauffé au bain-marie à 100°C pendant 10 min pour lyser les cellules. Après centrifugation à 10000 g pendant 7 min à 4°C, 150 µL du surnageant, qui contient l'ADN, est transféré dans un tube Eppendorf. Une dernière centrifugation à 10000 g pendant 7 min à 4°C permet d'éliminer les derniers débris cellulaires. Cent microlitres du surnageant sont transférés dans un nouveau tube Eppendorf.

4.1.3. Quantification et vérification de la pureté de l'ADN

La concentration (ng/µL) et la pureté de l'ADN sont déterminées respectivement à 260 nm et à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop ND-1000) (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA). La détermination des rapports A260 nm/A280 nm et A260 nm/A230 nm permet de vérifier la nature du contaminant. La valeur du rapport A260 nm/A280 nm d'un ADN permet d'évaluer la contamination par les protéines. La valeur du rapport A260 nm /A280 nm d'un ADN pur est comprise entre 1,8 et 2. En outre, la valeur du rapport 260 nm/A230 nm est déduite à titre secondaire pour renseigner sur une éventuelle contamination par les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques ou tout produit qui absorbe à 230 nm. Ce rapport doit être proche de 2,2.

L'ADN est dilué avec de l'eau Milli-Q stérile afin d'obtenir une concentration voisine de 100 ng/µL. L'ADN dilué a été conservé à -20°C et a servi de matrice pour les réactions de polymérisation en chaîne (PCR).

4.2. Préparation du mélange réactionnel (Mix)

Pour effectuer une PCR, il est nécessaire de préparer, pour chaque souche, un microtube contenant un mélange réactionnel de 28 µL dans lequel se trouvent 5 µL de matrice d'ADN et les réactifs mentionnés dans le **Tableau 12**. Un témoin négatif contenant 5 µL d'eau Milli-Q stérile à la place de la matrice d'ADN et l'ADN des souches de référence utilisées pour le contrôle positif sont inclus dans chaque réaction PCR.

Les différentes amorces utilisées ainsi que les tailles des amplicons sont indiquées dans le **Tableau 13**.

Tableau 12: Composition de 20 μ L de mélange réactionnel commun de la PCR.

Composant	Concentration initiale	Concentration finale	Volume pour 1 réaction (μ L)
Tampon Buffer Taq	10X	0,9X	2,5
Amorce F	10 μ M	0,71 pmol/ μ L	2
Amorce R	10 μ M	0,71 pmol/ μ L	2
MgCl ₂	50 Mm	2 mM	1,2
dNTPs	10 Mm	0,178 mM	0,5
H ₂ O milliQ stérile			14,5
Taq polymérase	5000 U/Ml	53,57 U/mL	0,3
ADN (dilué au 1/10 ^{ème})			5

Tableau 13: Amorces pour la détection de *sspE* et des signatures « *16S rDNA-1 m* », « *16S rDNA-2 p* » et « *cspA* ».

Gènes cibles	Amorces	Séquence nucléotidique des amorces (5'-3')	Taille des amplicons (pb)	Température d'hybridation (°C)	Références
<i>SspE</i>	sspE1-F sspE1-R	GAAAAAGATGAGTAAAAACAACAA CATTGTGCTTTGAATGCTAG	71	59	Kim et al. (2005)
<i>16S rDNA-1 m</i>	Mf Ur	ATAACATTTTGAACCGCATG CTTCATCACTCACGCGGC	250	55	Von Stetten et al. (1998)
<i>16S rDNA-2 p</i>	Pr Uf	GAGAAGCTCTTATCTCTAGA CAAGGCTGAAACTCAAAGGA	130	55	Von Stetten et al. (1998)
<i>CspA</i>	BcAPF1 BcAPR1	GAGGAAATAATTATGACAGTT CT(C/T) TTGGCCTTCTCTAA	160	50	Francis et al. (1998)

4.3. Détection du groupe *B. cereus*

La détermination de l'appartenance au groupe *B. cereus* s'est effectuée par amplification d'une séquence de 71 pb du gène *sspE* spécifique du groupe, codant pour une protéine structurale des spores. Sur les 191 isolats présomptifs 174 se sont avérés positifs.

L'amplification du gène *sspE* s'est effectuée à l'aide du couple d'amorces *sspE1-F* et *sspE1-R* (Tableau 13). Elle est réalisée selon la méthode décrite par kim et al. (2005) dans un thermocycleur iCycler optical module 584BR (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) selon le programme suivant : une dénaturation de 4 min à 95°C suivie d'une phase cyclique répétée 30 fois. Chaque cycle d'amplification est constitué d'une étape de dénaturation de 30 s à 95°C, d'une étape d'hybridation des amorces de 30 s à 59°C et d'une étape d'élongation d'une min à 72°C. La réaction est terminée par une élongation finale de 7 min à 72°C. Les échantillons sont conservés à +10°C jusqu'à l'arrêt du thermocycleur.

4.4. Recherche des signatures « *16S rDNA-1 m* » et « *16S rDNA-2 p* »

Von Stetten et al. (1998) ont montré que le ciblage PCR du gène codant pour l'ARNr 16S permet de distinguer les souches du groupe *B. cereus* mésophiles et psychrotrophes puisqu'il existe une signature spécifique pour chaque groupe thermique de bactéries, à savoir la signature « *16S rDNA-1 m* » pour les mésophiles et la signature « *16S rDNA-2 p* » pour les psychrotrophes. En effet, une première paire d'amorces (mf-ur) ciblant la signature « *16S rDNA-1 m* » permet l'amplification d'un fragment d'ADN de 250 pb alors qu'une seconde paire d'amorces (uf-pr) ciblant la signature « *16S rDNA-2 p* » permet l'amplification d'un fragment d'ADN de 130 pb (Tableau 13).

Le cycle PCR adapté de Von Stetten et al. (1998) est utilisé comme suit : 2 min de dénaturation à 94°C, 27 cycles de 15 s à 94°C, 15 s à 55°C et 15 s à 72°C et un cycle d'extension finale de 72°C à 2 min.

4.5. Recherche de la signature « *cspA* »

Un test PCR a été adapté du protocole de Francis et al. (1998), permet de détecter, tout en les différenciant, les souches psychrotrophes et mésophiles du groupe *B. cereus*. Ce test cible le gène *cspA*, codant pour une protéine majeure de choc froid et qui n'existe que chez les souches psychrotrophes. Ainsi, en utilisant les amorces discriminantes BcAPF1 et BcAPR1 définies par Francis et al. (1998) (Tableau 13), la PCR permet l'amplification exclusive de la signature psychrotrophe qui correspond à un fragment de 160 pb et par la suite, les 2 groupes thermiques.

Le cycle PCR adapté de Francis et al. (1998) est utilisé : 5 min de dénaturation à 95 °C, 30 cycles de 15 s à 95 °C, 30 s à la température d'hybridation, 30 s à 72 °C et un cycle d'extension finale de 7 min à 72 °C. La température d'hybridation utilisée est de 50 °C.

4.6. Analyse électrophorétique des produits PCR

Les produits PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % Le gel est préparé en diluant 1 % d'agarose (Sigma) dans le tampon TAE 1X (Promega, Madison, US). La solution est ensuite portée à ébullition pour assurer la dissolution de l'agarose. Après un refroidissement jusqu'à environ 60°C, 2 µL de bromure d'éthidium (BET) (solution stock de 20 mg/mL) (Sigma) sont ajoutés pour 100 mL de solution. Après agitation, la solution est versée dans un moule où un peigne est ajouté pour former les puits de charge. Le gel solidifié est alors placé dans une cuve d'électrophorèse (Bio-Rad) contenant du TAE 1X (Promega). Le premier puits est rempli par 2 µL d'un marqueur de masse moléculaire (Smart Ladder SF) (Eurogentec, Seraing, Belgique) afin d'estimer la taille des bandes

d'ADN. Un volume de 10 µL de produit PCR et 1 µL de tampon de charge sont placés dans les puits suivants. Le tampon de charge utilisé est une solution 6 fois concentrée (6 X) de bleu de bromophénol et de saccharose, dans les proportions suivantes : 0,25 % (w/v) de bleu de bromophénol et 40 % (w/v) de saccharose. Après une migration de 30 min à 80 V, les ADN sont révélés sous UV (UVP Table UV 8 Watt M-26V) (Fisher Bioblock). Les photos des gels sont traitées avec le logiciel Infinity capture (Lumenera Corporation, Ottawa, Canada).

5. Affiliation phylogénétique des isolats

5.1. Principe

Le séquençage du gène *panC* permet de regrouper les souches du groupe *B. cereus* en sous-groupes selon plages de température de croissance.

La première étape consiste à extraire de l'ADN génomique à partir d'une culture bactérienne. L'amplification s'effectue par PCR, suivie par une purification, un séquençage, pour terminer par un BLAST permettant d'attribuer l'un des groupes phylogénétiques définis par **Guinebrière et al. (2008)** à chaque isolat.

5.2. Méthodologie

Les mêmes étapes d'obtention des cellules, d'extraction des ADN génomiques, de préparation du mélange réactionnel ainsi que de révélation des produits PCR sur gel d'agarose susmentionnées respectivement dans le **paragraphe (4.)** ont été suivies.

Pour amplifier le gène *panC*, les séquences des amorces définies par **Guinebrière et al. (2008)** qui ont été utilisées sont les suivantes :

5'-TYGGTTTTGTYCCAACRATGG-3' pour l'amorce sens dégénérée et

5'-CATAATCTACAGTGCCTTTCG-3' pour l'amorce antisens.

L'amplification de la séquence du gène *panC* est effectuée selon le cycle décrit par **Techer et al. (2014)**, comme suit : 5 min de dénaturation à 94°C, 30 cycles de 15 s à 95°C, 30 s à 55°C, 30 s à 72°C et une extension finale de 7 min à 72°C. Les produits PCR sont, par la suite, analysés sur gel d'Agarose. Le fragment du gène *panC* amplifié est identifié en fonction de sa longueur apparente (651 pb).

La purification et le séquençage de ce fragment sont réalisés par GATC Biotech AG (Constance, Allemagne) en utilisant l'amorce 5'-ATAATCTACAGTGCCTTTCG - 3'. La forme Fasta de chaque séquence obtenue est blastée avec la base de données de Sym'Previus (<https://www.tools.symprevius.org/Bcereus/>). Les résultats aboutissent à l'affiliation des souches du groupe *B. cereus* selon **Guinebrière et al. (2008)**.

6. Typage moléculaire des isolats

6.1. Protocole de l'ERIC-PCR

L'ERIC-PCR est une méthode de caractérisation moléculaire permettant d'évaluer la diversité génétique des souches et de vérifier si certaines d'entre elles sont clonales. L'ERIC-PCR est, de point de vue de la réalisation, très similaire à la PCR, mais constitue une variante de cette dernière car une seule amorce, l'amorce ERIC1R (**Versalovic et al.,1991**), est utilisée. Sa séquence est la suivante : 5'-ATGTAAGCTGGGGATTAC-3'. Elle est utilisée pour amplifier les séquences « ERIC » localisées dans les régions intergéniques non codantes du génome bactérien.

Les concentrations en ADN sont ajustées à 20 ng/μL après dosage au Nanodrop (Nanodrop ND-1000) (Nanodrop Technologies). Le mélange réactionnel est préparé selon la méthode de **Versalovic et al. (1991)**. Les réactions sont réalisées chacune dans un volume total de 50 μL dont la composition est reprise dans le **Tableau 14**.

Le cycle PCR est utilisé tel que décrit par **Shangkuan et al. (2000)**. Il consiste en une dénaturation initiale de 10 min à 95°C, suivie de 4 cycles de 5 min à 94°C, 5 min à 40°C et 5 min à 72°C. Par la suite, 40 cycles sont réalisés, comme suit : 1 min à 94°C, 1 min à 55°C et 2 min à 72°C. Une extension finale de 10 min à 72°C est réalisée à la fin des cycles. Dix microlitres de chaque produit d'amplification sont visualisés sous lumière UV sur gel d'agarose à 2 % après migration à 80 V pendant 120 min dans du TAE 1X (Promega). Le gel visualisé sous UV est photographié.

Tableau 14: Composition de 50 μL de mélange réactionnel pour ERIC-PCR.

Composant	Concentration initiale	Concentration finale	Volume pour 1 réaction (μL)
Tampon buffer Taq	10X	1X	5
Amorce ERIC	10 μM	1 pmol/μL	5
MgCl ₂	25 Mm	1,5 Mm	3
DNTPs	10 Mm	0,25 Mm	1,25
H ₂ O milliQ stérile			25,45
Taq polymérase	5000 U/MI	30 U/MI	0,3
ADN	20 ng/μL	4 ng/μL	10

6.2. Protocole de la PFGE

6.2.1. Milieux et Solutions Tampons pour PFGE

- Tampon TE : Il est composé de Tris (10 mM) et d'EDTA (1 Mm), généralement au pH égal à 8.

- Tampon TES : Il est obtenu en ajoutant du saccharose (200 g/L) au tampon TE.

- Solution d'EDTA pour agarose des blocs : c'est une solution aqueuse d'EDTA (125 mM), généralement au pH égal à 7.
- Solution de déprotéinisation (pH= 8) (à préparer extemporanément) : elle est composée de Tris (10 Mm), EDTA (100 Mm), SDS 1 % et du Protéinase K (20 mg/ml) (Qiagen, Hilden, Allemagne).
- Tampon pour protéinase K : il est composé de Tris (10 Mm) et d'EDTA (100 Mm), généralement au pH égal à 7.
- Tampon de migration TBE (Tris-Borate-EDTA) :
TBE 10X (solution stock) : cette solution stock est composée de Tris (0,89 M), d'acide borique (0,89 M) et d'EDTA (0,02 M), généralement au pH égal à 8,3.
TBE 0,5X : cette solution est préparée en diluant 20 fois la solution 10X dans l'eau osmosée à pH compris entre 6,5 et 7.
- Tampon de restriction : Il est obtenu en transférant 20 unités de l'enzyme *SmaI* (New England Biolabs, Hitchin, UK) dans son tampon dilué au 1/10^{ème}.
- Agarose pour électrophorèse en champs pulsé PFGE (Gibco BRL, Paisley, Ecosse)
- Marqueur de taille (lambda DNA cI857 ind 1 Sam7, GelSyringeTM) (New England Biolabs).
- Solution aqueuse de BET à 1 µg/mL pour la coloration du gel.

6.2.2. Méthodologie

Nous avons utilisé le système d'électrophorèse en champs pulsé CHEF-DR II (Bio-Rad) qui permet la migration des fragments d'ADN de taille allant de 5 kb à 6 Mb. L'électrophorèse en champ pulsé a été réalisée selon le protocole décrit par **Merzougui et al. (2014)**. Après une culture d'une nuit (avec une DO à 650 nm comprise entre 0,3 et 0,45) issues d'une colonie pure mise en suspension dans 5 ml de BHI-YE, une centrifugation à 10000 g pendant 10 min est effectuée. Le culot est par la suite récupéré dans 5 mL du tampon TES. Après une deuxième centrifugation, le culot est repris dans 400 µL du tampon TE (pH= 8) contenant 10 mg/mL de lysozyme et incubé pendant 1 h à 37°C. Entre temps, une solution d'agarose 1 % est préparée dans une solution d'EDTA; (pH= 7). Les 400 µL de la suspension bactérienne sont par la suite mélangés avec 700 µL d'agarose 1 %, puis les blocs sont coulés. Après leur solidification, les blocs sont déposés dans la solution de déprotéinisation (1 mL par bloc) et incubés 2 h à 55°C. La solution de déprotéinisation est aspirée et les blocs rincés par de l'eau distillée à 50°C pendant 10 min. Les blocs sont par la suite transvasés dans 10 mL de la solution de lavage TE et

agités légèrement. Au total, 5 lavages sont effectués. Les blocs sont transférés dans des tubes contenant 600 µL du tampon de l'enzyme *SmaI* et incubés pendant 1 h à 4°C. Les blocs sont ensuite transvasés dans 300 µL du tampon de l'enzyme avec 20 U de *SmaI* et incubés à 25°C pendant 4 h. Cent-vingt millilitres de gel d'agarose 1 % dans du TBE 0.5 X sont préparés et déposés sur les dents du peigne. Le gel est coulé délicatement. Une fois ce dernier solidifié, le peigne est extrait. Deux marqueurs lambda sont inclus dans chaque essai. Dans la cuve de migration, 2 L de TBE 0.5 X à 14°C sont placés et le programme suivant est utilisé :

Initial A time: 2 s, Final A time: 20 s, Run time: 18 h.

Après migration, le gel est coloré avec une solution aqueuse de BET à 1 µg/mL. Le gel est visualisé sous lumière UV et photographié.

6.3. Analyse et interprétation des profils de migration

Les profils ERIC-PCR et PFGE sont analysés par le logiciel Bionumerics version 6.5 (Applied Maths, Gand, Belgique). Le coefficient Dice est utilisé pour mesurer la similarité entre les profils. Les paramètres de tolérance et d'optimisation sont fixés à 1 %. La construction des dendrogrammes s'est basée sur la *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean* (UPGMA).

A l'aide du logiciel BioNumerics, des représentations hiérarchiques des profils ERIC-PCR et PFGE sont réalisées sous la forme de dendrogrammes. Cette représentation illustre les relations génétiques entre les souches caractérisées et permet de les différencier.

Le but étant de discriminer les souches, une limite de similarité a été choisie, à partir de laquelle les souches sont considérées comme distinctes. Nous avons choisi de placer cette « limite » à 80 % puisque le pourcentage de similarité génétique entre les marqueurs de taille inclus sur chaque gel était de 80 %. Ainsi, après avoir déterminé un pourcentage de similarité, on a pu définir des clusters de souches.

7. Evaluation du pouvoir d'adhésion aux coupons en inox

L'adhésion aux surfaces représente une étape primordiale dans le processus de formation des biofilms. Cette étape est sous l'influence de nombreux paramètres propres aux bactéries, dont l'état physiologique des cellules et les propriétés de surface des spores, ainsi que des paramètres environnementaux, dont la présence de nutriments sur les surfaces. Dans cette partie, l'intérêt est porté sur l'état physiologique des bactéries (spores et cellules végétatives). Le pouvoir d'adhésion des isolats du groupe *B. cereus* à des

surfaces en inox est mesuré par la quantification des spores ou des cellules végétatives capables d'adhérer par unité de surface (cm²).

7.1. Traitement des coupons en inox

Le test d'adhésion est réalisé sur des coupons en inox de 2 mm d'épaisseur et 15 mm de diamètre (Bretagne Laser, Guer, France). Comme décrit précédemment par **Jan et al. (2011)**, les coupons sont immergés dans une solution de RBS 35 (Chemical Products R. BORGHGRAEF, Bruxelles, Belgique) à 2 % (v/v dans de l'eau distillée) et à 50°C. Les coupons subissent par la suite 2 séries de rinçage à l'eau distillée, la première série à 50°C et la deuxième à température ambiante. Chaque série comporte 5 rinçage de 5 min chacun. Après rinçage, les coupons sont autoclavés 20 min à 121°C et, séchés sous flux laminaire en conditions stériles et finalement conservés stérilement jusqu'à leur utilisation. Les coupons nécessaires à chaque expérimentation sont répartis dans des microplaques de 24 puits (P24) à raison d'un coupon par puits.

7.2. Préparation de l'inoculum bactérien

Les souches conservées à -80°C sont décongelées par ensemencement à 2 % dans du bouillon BHI-YE et incubation à 30°C pendant une nuit puis repiquées à 2 % dans du BHI-YE et incubées à 30°C pendant 18-24 h. Ces cultures vont servir pour la préparation des suspensions sporales et des cellules végétatives.

7.2.1. Préparation des cellules végétatives

Les cultures de 18- 24 h sont centrifugées à trois reprises à 10000 g pendant 10 min. A chaque reprise, le surnageant est jeté et le culot récupéré est suspendu dans une solution saline à 9 g/L de NaCl, au même volume que celui du surnageant. Les suspensions de cellules végétatives ainsi obtenues sont dénombrées et conservées à 4°C.

Le dénombrement est effectué à l'aide de la microméthode de comptage sur plaque (**Baron et al., 2006**). Cette dernière est basée sur le même principe que la méthode classique mais elle utilise des plaques 96 puits (P96) pour la phase de dilution décimale des échantillons et des P24 pour la phase d'ensemencement des dilutions dans le milieu gélosé. Elle consiste à faire des dilutions sur une P96. Pour chaque dilution, 50 µL sont transférés dans une P24, puis 400 µL de BHI-YE agar sont ajoutés ; les plaques sont ensuite incubées à 30°C pendant 24 h. La microméthode favorise le traitement d'un grand nombre d'échantillons en gardant la même facilité de comptage et d'interprétation des colonies. Elle permet donc des réductions de coût et de temps de manipulation avec la

même fiabilité que la méthode classique. Les résultats sont exprimés en UFC par mL, selon l'équation suivante :

$$N \text{ (UFC/mL)} = \frac{\text{nombre de colonies par puits} \times \text{Facteur de dilution} \times 1000}{50}$$

7.2.2. Préparation des suspensions sporales

Les cultures de 18- 24 h (1 mL) sontensemencées par étalement au râteau sur des boites contenant de la gélose LB fortifiée (additionnée de Mg⁺⁺ (40 mg) et de CaCl₂ (100 mg) /L de milieu. L'ajout de ces sels stimule le phénomène de sporulation. Les boites sont incubées pendant 5 j à 30 °C. Après 5 j d'incubation, le tapis cellulaire présent à la surface des boites de Pétri est inondé d'une solution saline à 9 g/L de NaCl et raclé à l'aide d'un râteau stérile. La suspension ainsi obtenue est chauffée 10 min à 80°C pour détruire les formes végétatives puis elle subit une série de 3 centrifugations à 10000 g pendant 10 min à température ambiante. Le surnageant est ainsi éliminé et le culot est suspendu dans 50 mL d'eau distillée stérile. A l'issue de cette série de centrifugations, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 30 mL d'eau distillée stérile. Un deuxième chauffage à 80°C pendant 10 min permet de s'assurer que la forme végétative des isolats est totalement détruite. Enfin et après dénombrement par microméthode, les suspensions sporales sont conservées à 4°C en vue de leur utilisation.

7.3. Test d'adhésion des cellules végétatives/ des spores sur coupons en inox

Pour commencer le test d'adhésion, les cultures bactériennes (cellules végétatives ou spores) subissent une série de dilutions jusqu'au obtenir une concentration de 10⁶ UFC/mL environ. Par la suite, 300 µL sont prélevés de chaque suspension bactérienne puis introduits dans l'un des puits de la P24 contenant un coupon en inox. Finalement, les plaques sont incubées à 30°C pendant 2 h. Les tests sont faits en triplicat dans la même microplaque pour chaque suspension bactérienne. Sur chaque plaque, 2 souches témoin de *B. cereus* sont ajoutées, les souches C43 et BW1. Au bout de 2 h d'incubation à 30°C, les suspensions sont éliminées et les coupons sont soumis à une série de 3 lavages avec 300 µL d'une solution saline à 9 g/L de NaCl afin d'éliminer les cellules non-adhérentes.

7.4. Décrochage et dénombrement des cellules adhérentes

Pour le test d'adhésion des cellules végétative, 300 µL d'une solution saline à 9 g/L de NaCl sont ajoutés dans chaque puits et la surface du coupon est grattée avec une spatule stérile (Dutscher, Brumath, France) pendant 45 s afin de décoller les cellules adhérentes.

Pour le test d'adhésion des spores, 300 µL d'une solution aqueuse de Tween 80 (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litthuania) à 0,02 % sont ajoutés pour l'ensemble des puits de la plaque afin de modifier les propriétés de surface des spores et de faciliter leur décrochage par un sonicateur à tige. Le nombre de cellules adhérentes est déterminé après croissance sur milieu BHI-YE agar à 30°C pendant 24 h, à l'aide de la microméthode de comptage (**Baron et al., 2006**) Les résultats sont exprimés en UFC par cm², selon l'équation suivante :

$$N \text{ (UFC/cm}^2\text{)} = \frac{\text{nombre de colonies/puits} \times \text{Facteur de dilution} \times F \times 300}{50}$$

Où

N est le nombre de bactéries adhérentes par cm²

F est l'inverse de la surface du coupon (cm⁻²) ; $F = 1/A \text{ cm}^{-2}$; avec $A = \pi \times r^2 = 1,77 \text{ cm}^2$ ($r = 0,75 \text{ cm}$).

8. Recherche des gènes de virulence du groupe *B. cereus*

Les 174 isolats du groupe *B. cereus* sont testés pour la mise en évidence des gènes codant pour les entérotoxines responsables du syndrome diarrhéique (*hblA*, *hblB*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytK*, *cytK-1*, *cytK-2* et *bceT*) et le céréulide (*ces*) responsable du syndrome émétique. Les amplifications sont réalisées par PCR dans un thermocycleur (iCycler optical module 584BR) (Bio-Rad).

Les mêmes étapes d'obtention des cellules, d'extraction d'ADN génomiques, de préparation du mélange réactionnel ainsi que la révélation de produits de PCR sur gel d'agarose susmentionnée respectivement dans le **paragraphe (4.)** ont été suivies. Pour les isolats qui hébergeaient le gène *cytK*, une discrimination des deux formes différentes de la cytotoxine K, constituées par les gènes *cytK-1* et *cytK-2*, est effectuée en utilisant la méthode décrite par **Guinebretiere et al. (2006)**. Pour la détection du gène *ces* codant pour la toxine émétique, deux paires d'amorces sont utilisées. La première, EMIR/F, cible les régions conservées du gène de la "non-ribosomal peptides synthetase" (NRPS) impliqué dans la synthèse de peptides indépendante des ribosomes (**Ehling-Schulz et al., 2004b**). La deuxième, CesF1/R2, cible les déterminants génétiques directement impliqués dans la production du céréulide (**Ehling-Schulz et al., 2005**). Toutes les amorces (Sigma) utilisées et les programmes d'amplification ainsi que les tailles des amplicons sont consignés dans le **Tableau 15**.

Tableau 15: Amorces et programmes PCR utilisés pour la détection des gènes de virulence au sein du groupe *B. cereus*.

Gènes cibles	Amorces	Séquence nucléotidique des amorces (5'-3')	Programme d'amplification	Taille des amplicons (pb)	Température d'hybridation (°C)	Références
<i>nheB</i>	NB F NB R	TTAGTAGTGGATCTGTACGC TTAATGTTTCGTTAATCCTGC		743		Guinebretière et al. (2002)
<i>NheC</i>	NC F NC R	TGGATTCCAAGATGTAACG ATTACGACTTCTGCTGTGTC	30 x [95 °C, 30 s ; 54 °C, 30 s ; 72 °C, 1 min] 72 °C, 7 min	683	54	Guinebretière et al. (2002)
<i>CytK</i>	CK F CK R	ACAGATATCGG(G,T)CAAAATGC TCCAACCCAGTT(A,T)(G,C)CAGTTC		809		Guinebretière et al. (2006)
<i>HblA</i>	HA F HA R	AAGCAATGGAATACAATGGG AGAATCTAAATCATGCCACTGC	30 x [95 °C, 30 s ; 56 °C, 30 s ; 72 °C, 1 min] 72 °C, 7 min	1154	56	Guinebretière et al. (2002)
<i>NheA</i>	NA F NA R	GTTAGGATCACAATCACCGC ACGAATGTAATTTGAGTCGC		755		Guinebretière et al. (2002)
<i>cytK-1</i>	CK1 F CK1 R	CAATTCCAGGGGCAAGTGTC CCTCGTGCATCTGTTTCATGAG	30 x [95 °C, 30 s ; 57 °C, 30 s ; 72 °C, 1 min] 72 °C, 7 min	426		Guinebretière et al. (2006)
<i>cytK-2</i>	CK2 F CK2 R	CAATCCCTGGCGCTAGTGCA GTGIAGCCTGGACGAAGTTGG		585	57	Guinebretière et al. (2006)
<i>bceT</i>	bceT-f bceT-r	GCTACGCAAAAACCGAGTGGTG AATGCTCCGGACTATGCTGACG		679		Agata et al. (1995)
<i>hblB</i>	HA F HB R	AAGCAATGGAATACAATGGG AATATGTCCCAGTACACCCG	10 x [94 °C, 10 s ; 58 °C, 30 s ; 68 °C, 2 min] 20 x [94 °C, 10s ; 58 °C, 30 s ; 68 °C, 2 min (Plus 20 s par cycle)]	2684	58	Guinebretière et al. (2002)
<i>HblC</i>	HC F HC R	GATACTCAATGTGGCAACTGC TTGAGACTGCTCGTCTAGTTG	30 x [95 °C, 30 s ; 58 °C, 30 s ; 72 °C, 1 min] 72 °C, 7 min	740	58	Guinebretière et al. (2002)
<i>hblD</i>	HD F HD R	ACCGGTAACACTATTCATGC GAGTCCATATGCTTAGATGC		829		Guinebretière et al. (2002)
<i>Ces</i>	EM1F EM1R	GACAAGAGAAATTTCTACGAGCAAGTA AT GCAGCCTTCCAATTACTCCTTCTGCCAC AGT	30 x [95 °C, 15 s ; 58 °C, 30 s ; 72 °C, 30 s] 72 °C, 7 min	635		Ehling-Schulz et al. (2004b)
	CesF1 CesR1	GGTGACACATTATCATATAAGGTG GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA		1271	58	Ehling-Schulz et al. (2005)

9. Evaluation de l'activité cytotoxique sur les cellules Caco-2

9.1. Cellules Caco-2

L'activité cytotoxique des isolats du groupe *B. cereus* est évaluée sur des cellules Caco-2. Cette lignée cellulaire dérive d'un carcinome humain et peut se différencier en une couche cellulaire mimant l'épithélium de l'intestin grêle (Pinto et al., 1983). Cette lignée est ainsi probablement la plus appropriée pour étudier les entéropathogènes de l'épithélium intestinal humain (Viboud et al., 1993).

Pour réaliser le test de cytotoxicité, deux ampoules contenant chacune 2.10^6 cellules Caco-2, sont fournies par le laboratoire Nutrinov (Rennes).

9.2. Réactifs pour la culture cellulaire

9.2.1. Milieu de culture des cellules Caco-2

Le milieu de culture employé pour la culture des cellules Caco-2 est le milieu synthétique Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma). Ce milieu de base est supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau Fœtal (SVF) (Cambrex, Verviers, Belgique), 100 UI/mL de pénicilline (Sigma), 100 µg/mL de streptomycine (Sigma) et 2.5 µg/mL d'amphotéricine B (Sigma) (Choma et al., 2000).

9.2.2. Tampon Phosphate Salin (PBS)

Le PBS est utilisé dans diverses applications de culture cellulaire telles que le lavage de cellules avant dissociation, le transport de cellules et de tissus, la dilution de cellules pour le comptage et la préparation de réactifs. Ce tampon est préparé avec du phosphate dibasique de sodium, du phosphate monobasique de potassium, du chlorure de sodium et du chlorure de potassium. Les concentrations des différents composés du PBS sont reprises dans le **Tableau 16**. Le PBS est autoclavé 20 min à 121 °C et stocké à 4 °C. Son pH en solution est de 7,4.

Tableau 16: Composition du PBS.

Composants	Concentration (g/L)
Phosphate monobasique de potassium (KH ₂ PO ₄)	0,2
Phosphate dibasique de sodium (Na ₂ HPO ₄ , 2 H ₂ O)	1,44
Chlorure de sodium (NaCl)	8
Chlorure de potassium (KCl)	0,2
pH (25 °C) final = 7,4 ± 0,2	

9.2.3. Préparation de la trypsine

La trypsine est un réactif de base permettant le décollement des cellules Caco-2. Les protéines d'attachement au support et de la matrice extracellulaire sont ainsi digérées par la trypsine.

9.2.4. Préparation du paraformaldéhyde

Solution de paraformaldéhyde à 10 % (m/v)

La préparation du paraformaldéhyde consiste à chauffer sous agitation 5 g de paraformaldéhyde (Sigma) dissous dans 50 mL d'eau. Lorsque la solution frémit, une goutte de NaOH (1 N) est ajoutée afin d'éclaircir la solution. Une ou deux gouttes supplémentaires sont ajoutées, si nécessaire, jusqu'à l'obtention d'une solution limpide. Après refroidissement dans la glace, la solution est aliquotée en fractions de 2 mL en tubes en verre et conservé à 4 °C.

Solution de paraformaldéhyde à 2 % (m/v)

La solution de paraformaldéhyde à 2 % représente la solution de fixation des cellules Caco-2. Sa préparation consiste à ajouter 8 mL de PBS à une aliquote de 2 mL de la solution de paraformaldéhyde à 10 %.

9.2.5. Préparation de la solution de coloration au cristal violet

Le Cristal Violet (CV) est un colorant triarylméthane qui peut se lier à des molécules de type ribose telles que l'ADN dans les noyaux. Normalement, les cellules adhérentes mortes se détacheront des plaques de culture cellulaire et seront retirées de la population des cellules viables pendant les étapes de lavage. La coloration CV peut être utilisée pour quantifier l'ADN total de la population restante et ainsi déterminer la viabilité cellulaire. L'intensité de la coloration au CV est directement proportionnelle à la biomasse cellulaire et peut être mesurée à 630 nm. La coloration au CV est un test rapide et polyvalent pour le criblage de la viabilité cellulaire dans diverses conditions de stimulation ou d'inhibition. La solution de coloration au CV est préparée selon **Choma et al. (2000)**. Un volume de 10 mL de cette solution est composé de 13 mg de Cristal violet (Sigma) (0,13 % m/v) ; 0,5 mL d'éthanol absolu (5 % v/v) ; 2 mL d'une solution de paraformaldéhyde à 10 % (2 % v/v) et 7,5 mL de PBS.

9.3. Principe

La mesure de l'activité cytotoxique consiste, pour chaque isolat, à appliquer du filtrat de culture bactérienne sur des cellules Caco-2 afin d'estimer leur pouvoir cytotoxique. Le

test choisi, décrit par **Guinebretière et al. (2002)** repose sur la perte de l'intégrité membranaire.

Les cellules, cultivées en P96, sont fixées, colorées au CV puis rincées à l'éthanol 50%. L'addition d'alcool permet la libération du CV. L'absorbance de la solution est lue à 630 nm. L'intensité de la coloration étant fonction du nombre de cellules dans le puit, la cytotoxicité des surnageants est ainsi mise en évidence par diminution de l'absorbance à 630 nm, ce qui correspond donc à la diminution du nombre de cellules viables dans le puits. Les surnageants bactériennes sont considérés comme étant cytotoxiques lorsque la l'absorbance de la solution représente moins de 50 % de l'absorbance du contrôle (pourcentage d'inhibition supérieur à 50 %).

9.4. Méthodologie

9.4.1. Préparation des surnageants bactériens

Après décongélation et repiquage des isolats comme susmentionné dans le **paragraphe (4.1.1.)**, une centrifugation des cultures (10000 g pendant 7 min à 4°C) est effectuée. Le culot est par la suite récupéré dans 10 mL de PBS. Afin d'éliminer toute trace de nutriments provenant du BHI-YE et/ou d'entérotoxines provenant de l'inoculum, un total de 3 lavages du culot au PBS (10000 g, 10 min) est réalisé. Le dernier culot est repris dans 10 mL de PBS et une série de dilutions au 1/10^{ème} est réalisée jusqu'à la dilution -3 (environ 10⁵ cellules/mL). A partir de la dilution -3, 10 mL de BHI-YE sontensemencés à raison de 2 % (pour avoir environ 2.10³ cellules/mL à t₀). Deux séries d'incubation sont effectuées pour chaque isolat (une série incubée à 30°C pendant 18 h et une autre à 30°C pendant 5 j).

Après les 18 h et 5 j d'incubation, 5 mL de chaque suspension sont transférés dans 10 mL de BHI-YE et centrifugés à 10000 g pendant 7 min à 4°C. Un millilitre environ de surnageant est filtré sur un filtre stérile de 0,22 µm pour éliminer les bactéries (Starstedt). Les filtrats obtenus sont congelés dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL, et prêts à être mis en oeuvre pour les essais de cytotoxicité.

Un témoin positifs (T+) est réalisé en ensemençant du milieu BHI-YE avec la souche LMA 1038. Le témoin positif a subit le même traitement que celui des souches à tester : croissance, lavage, inoculation, dilution, centrifugation filtration et congélation du surnageant.

Un témoins négatifs (T-) est réalisé avec le BHI-YE non ensemençé. Ce témoin négatif est filtré comme les essais après dissolution au tiers dans du BHI-YE.

9.4.2. Préparation des cellules Caco-2

La décongélation des ampoules contenant les cellules Caco-2, conservées dans l'azote liquide, est effectuée par transfert du contenu de l'ampoule dans une flasque T25 contenant 5 mL de milieu de culture thermostaté à 37°C. Les flasques sont incubées à 37°C et en présence de 5 % de CO₂ et de 100 % d'humidité dans une étuve de marque Binder (Binder GmbH, Neckarsulm, Allemagne). Le lendemain, une observation microscopique est effectuée afin de s'assurer de la viabilité et de l'adhérence des cellules au fond de la flasque. Le milieu est changé le lendemain de la décongélation puis tous les 2 j : les cellules sont trypsinées quand elles atteignent 90 % de confluence et sont réensemencées dans de nouvelles flasques T75.

9.4.3. Coloration au cristal violet (CV)

Le protocole utilisé est décrit par Choma et al. (2000). Après trypsination d'une flasque T75 dont la culture a atteint 90 % de confluence, les cellules Caco-2 sont réensemencées dans des P96 à raison de 3.10⁵ cellules/mL et incubées pendant 3 j (37°C, 5 % de CO₂, 100 % d'humidité). Après rinçage au PBS, les cellules sont incubées avec 50 µL des surnageants bactériens pendant 3 h à 37°C sous 5 % de CO₂. Les plaques sont ensuite placées 5 min sous agitation douce pour décoller les cellules mortes. Le surnageant est aspiré et un lavage avec 200 µL de PBS est effectué. Les cellules sont par la suite fixées par 100 µL de paraformaldéhyde (2 % dans le PBS) par puits pendant 30 min à 4°C. Le paraformaldéhyde est aspiré. Les cellules sont colorées par 80 µL de CV par puit pendant 20 min à température ambiante. Trois rinçage à l'eau distillée sont réalisés, permettant d'éliminer les cellules mortes. Le CV est libéré par 200 µL d'éthanol à 50 % pendant 45 min sous agitation douce. L'absorbance est mesurée à 630 nm avec un lecteur de P96 (MRX) (Dynatech Laboratoires, Saint Cloud, France) (contre le blanc : solution d'éthanol à 50 % disposée dans les puits laissés vacants).

L'absorbance mesurée est inversement proportionnelle à l'activité cytotoxique du surnageant bactérien. L'activité cytotoxique est exprimée en pourcentage d'inhibition, par comparaison au contrôle (BHI-YE non ensemencé). Ce pourcentage est calculé de la manière suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Absorbance (contrôle)} - \text{Absorbance (essai)}}{\text{Absorbance (contrôle)}} \times 100$$

Les filtrats sont considérés comme étant cytotoxiques lorsque l'absorbance représente moins de 50 % de l'absorbance du contrôle (pourcentage d'inhibition supérieur à 50 %). Les tests et le contrôle sont réalisés en triplicat.

9.4.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques, y compris les tests *t* et le test *F* (ANOVA), sont effectuées à l'aide du logiciel statistique R- 3.4.2. Une valeur $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative pour tous les paramètres évalués. Le test *F* est utilisé pour évaluer la relation potentielle entre (i) l'origine d'échantillonnage des souches et leur potentiel de cytotoxicité et (ii) les différents gènes de virulence qu'elles hébergent et leur potentiel de cytotoxicité. Les tests *t* sont utilisés pour évaluer le potentiel de cytotoxicité de chaque souche de la collection en étudiant la corrélation entre les différents gènes de virulence qu'elles hébergent et leur activité cytotoxique sur les cellules Caco-2.

10. Détermination de la résistance aux antibiotiques

10.1. Réactifs pour la réalisation de l'antibiogramme

10.1.1. La gélose Müller-Hinton

La gélose Müller-Hinton (Milieu MH) est un milieu de croissance microbiologique qui est couramment utilisé pour les tests de sensibilité aux antibiotiques. Il a quelques propriétés qui le rendent parfait pour cet usage. Tout d'abord, c'est un milieu non sélectif, non différentiel. Cela signifie que presque tous les microorganismes sont en mesure de s'y développer. De plus, il contient de l'amidon. L'amidon est connu pour absorber les toxines libérées par les bactéries, de sorte qu'elles ne puissent pas interférer avec les antibiotiques. Deuxièmement, la nature de l'agar mise en œuvre permet une diffusion facilitée des antibiotiques.

Sa préparation consiste à mettre en suspension 38 g de milieu déshydraté (Merck) dans un litre d'eau. Cette suspension est chauffée tout en agitant jusqu'à ébullition. Après autoclavage durant 20 min à 121°C, la gélose Mueller-Hinton est coulée dans des boîtes de Pétri carrées (120 mm de diamètre) (Starstedt). Ces dernières sont gardées entrouvertes afin de faciliter l'évaporation complète de toute trace d'eau durant la solidification de la gélose.

10.1.2. Les disques de diffusion d'antibiotiques

Un total de 11 disques imprégnés d'antibiotiques a été testé pour chaque isolat. Les agents antimicrobiens testés (Bio-Rad) avec la quantité des produits actifs sont les suivants: Ampicilline (10 µg), Vancomycine (30 µg), Gentamicine (10 µg), Erythromycine (15 µg),

Tetracycline (30 µg), Ciprofloxacine (5 µg), Chloramphénicol (30 µg), Novobiocine (30 µg), Streptomycine (10 µg), Kanamycine (30 µg) et Rifampicine (5 µg).

10.1.3. Témoin d'opacité équivalent au standard 0,5 de McFarland

Les standards de McFarland servent comme références de turbidité pour préparer des suspensions standardisées de microorganismes. Le standard 0,5 de McFarland est notamment utilisé lors de la préparation de l'inoculum bactérien pour les tests de sensibilité aux agents antimicrobiens. Il sert à avoir une estimation grossière du nombre de bactéries dans une suspension bactérienne de turbidité équivalant à environ $1 \text{ à } 2 \cdot 10^8$ UFC / mL. Un inoculum plus dense engendre des diamètres plus petits et inversement. Il est recommandé de mesurer l'absorbance à l'aide d'un densimat Biomérieux puis de diluer au $1/10^{\text{ème}}$ la solution mère pour ajuster l'inoculum. Cet appareil doit être calibré contre un étalon de la gamme de McFarland selon les recommandations du fabricant. Il est également possible de comparer à l'oeil nu la turbidité de la suspension bactérienne à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland. Dans ce cas, il faut vortexer l'étalon de turbidité avant usage.

Le standard est préparé par l'ajout d'acide sulfurique à une solution aqueuse de chlorure de baryum à 0,5 %, ce qui entraîne la formation d'un précipité de sulfate de baryum en suspension.

Pour 100 mL de la solution standard, 99,5 mL d'acide sulfurique 0,18 M sont mélangés avec 0,5 ml de chlorure de baryum 0,048 M. Cette solution est ensuite stockée à l'obscurité.

10.2. Principe de l'antibiogramme : Méthode des disques

Le principe de l'antibiogramme consiste à placer la culture bactérienne sur milieu MH en présence du ou des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci. Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre de la zone d'inhibition entourant le disque d'antibiotique : bactérie Résistante, Intermédiaire ou Sensible.

10.3. Méthodologie

10.3.1. Préparation de l'inoculum

Après décongélation et repiquage des souches sur BHI-YE agar, quelques colonies bien isolées sont émulsionnées dans une solution saline à 9 g/L de NaCl.

La turbidité de la suspension bactérienne est ajustée à celle du standard 0,5 de McFarland par ajout d'une solution saline à 9 g/L de NaCl.

10.3.2. Ensemencement et application des disques de diffusion

Le milieu MH est ensemencé par écouvillonnage sur toute la surface de la gélose stérile. Le procédé est répété deux fois de plus, avec une rotation de la boîte de Pétri d'environ 60° à chaque fois afin d'assurer une distribution uniforme de l'inoculum. Enfin, les disques d'antibiotiques sont distribués sur la gélose MH inoculée. Chaque disque doit être légèrement enfoncé pour assurer un contact complet avec la surface. Les disques doivent être répartis de manière uniforme en laissant au moins 24 mm entre les centres des disques voisins, de sorte que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas. Les boîtes sont séchées à température ambiante pendant 30 min pour la pré-diffusion puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 h, couvercle renversé, afin d'éviter que l'eau de condensation ne tombe dans la boîte et ne contamine et/ou ne dilue les disques imprégnés. Un contrôle négatif sans antibiotique et un contrôle positif avec les souches de référence susmentionnées, sont réalisés et incubés dans les mêmes conditions.

10.3.3. Lecture et critères d'interprétation

Après 16 à 18 h d'incubation, les gélules sont examinées. Si la plaque était convenablement striée, les zones d'inhibition résultantes apparaissent uniformément circulaires. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés devant un fond noir avec suffisamment d'éclairage. Ces mesures (en mm) sont ensuite reportées aux diamètres critiques définis par **Bauer et al. (1966)** et traduites en bactéries Résistantes, Intermédiaires ou Sensibles vis à vis de l'antibiotique testé (**Tableau 17**).

Tableau 17: Molécules d'antibiotiques, diamètres critiques et lecture interprétative pour l'antibiogramme des bactéries du groupe *B. cereus*.

Antibiotique	Charge du disque (µg)	Diamètre critique (mm)		
		Résistante (R))	Intermédiaire (I)	Sensible (S)
Ampicilline	10	≤11	12-13	≥14
Chloramphénicol	30	≤12	13-17	≥18
Erytromycine	15	≤13	14-17	≥18
Gentamycine	10	≤12	13-14	≥15
Kanamycine	30	≤13	14-17	≥18
Streptomycin	10	≤11	12-14	≥15
Tétracycline	30	≤14	15-18	≥19
Novobiocine	30	≤17	18-21	≥22
Rifampicine	5	≤16	17-19	≥20
Ciprofloxacine	5	≤15	16-20	≥21
Vancomycine	30	≤9	10-11	≥12

11. Techniques de manipulation des bactériophages

11.1. Isolement des bactériophages

11.1.1. Sources de prélèvement

Le prélèvement était réalisé en Mai 2016 au niveau de la station expérimentale de Saint Symphorien pour la production alimentaire de porcs, volailles et lapins (Sourche, France) et la station d'épuration de Cleunay (Rennes, France).

Un total de 50 échantillons contenant des effluents liés à l'activité d'élevage (23), du lisier (7), des déchets fécaux (11), des eaux de lavage (5) et des échantillons de sol (4) sont prélevés à la station expérimentale de Saint Symphorien. Les échantillons sont regroupés en 2 échantillons pools (P1 et P2). Chaque pool est composé de 25 échantillons. Le premier pool (P1) comprenait 15 échantillons d'effluents d'élevage (bassins de décantation (7), effluents de porcs (5) et effluents de volailles (3)), 6 échantillons de déchets fécaux et 4 échantillons de sol. Le deuxième pool (P2) contenait 8 échantillons d'effluents d'élevage (effluents de lapins (3) et bassins de décantation (5)), 7 échantillons de lisier, 5 échantillons de déchets fécaux et 5 échantillons d'eaux de lavage. Au niveau de la station d'épuration de Cleunay, deux prélèvements sont réalisés à partir des eaux usées non traitées (P3) et des eaux traitées (P4).

11.1.2. Phase d'enrichissement

La collection de 174 isolats du groupe *B. cereus* est utilisée pour multiplier les bactériophages dans chaque échantillon pool (P1-P4), de la manière suivante : après incubation de chaque isolat du groupe *B. cereus* dans un bouillon BHI-YE pendant 5 h à 30°C, 500 µL de chaque culture sont mélangés et ajoutés à 500 mL de bouillon BHI-YE pour constituer le bouillon de culture hôte. Après 3 h de contact, 10 mL de chaque échantillon pool (P1-P4) sont ajoutés séparément au bouillon de culture hôte. Après incubation à 30°C pendant 24 h, le surnageant de culture est récolté par centrifugation à 10000 g pendant 20 min, et stérilisé par filtration à travers un filtre de 0,22 µm (Starstedt). Les filtrats ainsi obtenus sont conservés à 4°C.

11.1.3. Isolement et propagation des phages

Les bactériophages infectant le groupe *B. cereus* sont isolés à l'aide de la technique de spot test (Giuseppe et al., 2018), avec de légères modifications. Brièvement, 5 mL de BHI-YE additionnés de gélose molle à 8 g/L maintenue en surfusion à 48°C sont inoculés avec 100 µL de chaque culture bactérienne. Le mélange est coulé à la surface d'une boîte de gélose BHI-YE (15 g/L) solidifiée. Une fois la gélose molle durcie, 10 µL de

suspension enrichie de chaque échantillon pool (P1- P4) sont déposés sur chaque boîte. Après 30 min à température ambiante, temps nécessaire pour le séchage des gouttes, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 18 à 24 h.

En cas de détection de phages (formation de plages de lyse), chaque plage de lyse est prélevée à la pipette Pasteur stérile, puis transférée dans 3 mL de bouillon BHI-YE. Après incubation à 30°C pendant une nuit, la suspension des bactériophages est filtrée à travers un filtre de 0,22 µm (Starstedt). Les bactériophages présents dans le filtrat sont dénombrés par la méthode des doubles couches (**Adams, 1959; Lee et al., 2011; Shin et al., 2011; Wommack et al., 2009**).

Cette méthode consiste à mettre en contact 100 µL de la suspension de bactériophages (solution mère ou solution obtenue après dilutions décimales) et 200 µL de la souche sensible à tester (en phase exponentielle). Après 15 min de contact, pour permettre aux phages de se fixer aux cellules bactériennes, on ajoute à ce mélange 3 mL de gélose molle (8 g/L d'agar) de BHI-YE maintenue en surfusion à 48°C. Le tout est étalé sur une boîte de BHI-YE gélosé et incubé pendant 24 h à 30°C. La présence d'un spot clair indique une activité lytique. Les plages de lyse ainsi formées sont dénombrées. Les résultats sont exprimés en unités formant de plages de lyse / mL (UFP/mL). Cette technique est répétée au moins trois fois pour confirmer les résultats obtenus. Soixante-deux bactériophages, de provenance et/ou de morphologie de plages de lyse différentes, sont sélectionnés.

11.2. Etude du spectre d'hôte des bactériophages

Des analyses des spectres lytiques de ces 62 bactériophages sont réalisées contre les 174 souches du groupe *B. cereus* de la collection, afin de sélectionner les phages à spectre large.

Le spectre d'hôte de chaque bactériophage est déterminé par la technique des spots (**Lee et al., 2011**). Pour cela, 1 mL d'une culture en phase exponentielle de croissance est réparti sur un milieu gélosé BHI-YE. L'excès de liquide est enlevé et la boîte est séchée à température ambiante pendant 30 à 60 min. Dix microlitres de la suspension de bactériophages sont déposés à la surface de chaque boîte. Ces boîtes sont incubées à 30°C sur la nuit. L'efficacité lytique de chaque bactériophage sur la souche testée a été confirmée par la formation de plages de lyse. Les plages de lyse sont classées comme claires, modérément claires et troubles. En particulier, sept phages infectant des souches du groupe *B. cereus* ont été sélectionnés pour avoir produit des plages de lyse claires

contre un nombre maximal d'isolats du groupe *B. cereus*. Seuls ces 7 phages sont impliqués dans la suite du travail.

11.3. Obtention d'une suspension concentrée de bactériophages

L'étape de concentration des phages est effectuée selon la méthode modifiée décrite par **Adams (1959)** et **Lee et al. (2011)**. A partir d'un dénombrement phagique en doubles couches, la dilution donnant une lyse confluyente est repérée. Une vingtaine de boîtes de cette dilution est préparée. Après incubation pendant 24 h à 30 °C, 5 mL du bouillon BHI-YE sont ajoutés dans chaque boîte et les doubles couches de gélose molle sont raclées, rassemblées dans des tubes Falcon et gardées à 4 °C pendant 3-4 h afin de permettre au phage de se disperser à partir du revêtement. Par la suite, la suspension phagique est centrifugée à 12000 g pendant 20 min afin d'isoler la gélose molle. Le surnageant est filtré sur une membrane de 0,22 µm et titré en doubles couches sur la souche sensible. La concentration en phages varie de 10⁹ à 10¹⁰ UFP/mL. Ainsi préparés, les filtrats sont conservés plusieurs mois à 4°C.

Afin d'obtenir un titre élevé de bactériophages (nécessaire pour l'extraction de l'ADN phagique, pour l'observation microscopique ou pour l'étude du profil protéique), un filtrat phagique de grand volume (100 mL ou plus) à 10⁹-10¹⁰ UFP/mL est ultracentrifugé à 150000 g pendant 2 h à 20°C (Sorvall Discovery 90SE Ultracentrifugeuse ; T-865 Rotor) de façon à obtenir un culot de bactériophages. Le culot est repris doucement pendant une nuit dans 300 µL de tampon TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA; pH 8). Finalement, le titre du stock de phages est déterminé par la méthode des doubles couches avec la souche sensible.

11.4. Caractérisation des bactériophages isolés

11.4.1. Observation des phages en microscope électronique à Transmission (MET)

Les suspensions concentrées de bactériophages sont observées par contraste négatif. Pour cela, 30 µL de la suspension phagique (avec un titre minimal de 10¹¹ UFP/mL) sont déposés sur une grille de cuivre de 200 meshes recouverte d'une couche de Formvar/Carbone (Electron Microscopy Sciences, Hatfield PA, États-Unis) et laissés pendant 1 min pour l'adsorption. Par la suite, la grille est séchée contre du papier filtre puis colorée à l'acétate d'uranyle aqueux à 2 % pendant 1 min. L'excès de liquide est éliminé sur du papier filtre et la grille est laissée sécher à l'air libre. Enfin, la grille est

introduite dans le microscope électronique à transmission JEM-1400 (JEOL, Peabody, USA) pour l'observation.

11.4.2. Étude du profil protéique des phages

Cette étude rend compte de la structure de l'enveloppe phagique car la capsid, la queue et la plaque basale la constituant sont essentiellement de nature protéique. Le principe de cette étude est basé sur une extraction des protéines phagiques par l'action du SDS et du β -mercaptoéthanol, suivie d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), ce qui permet la séparation des protéines suivant leur poids moléculaire.

Un profil protéique est caractéristique d'un bactériophage donné. La mise en évidence de protéines homologues permet de regrouper les bactériophages étudiés.

Comme le décrivent **Geng et al. (2017)**, cette technique consiste tout d'abord à extraire les protéines phagiques par chauffage à 100°C pendant 10 min d'une aliquote de bactériophages (10^9 UFP/mL) dans un tampon dénaturant contenant 95 % (v/v) de tampon Laemmli 2X (Bio-Rad) et 5 % (v/v) de β -mercaptoéthanol (Sigma). Le chauffage permet d'accélérer la réaction de coupure des ponts disulfure. Ensuite, cette aliquote est mise à migrer sur un gel de polyacrylamide SDS à 4-20 % (Mini-PROTEAN TGX TM) (Bio-Rad). L'électrophorèse est réalisée à 200 V pendant environ 30 à 40 min. Après migration dans le gel, les protéines sont révélées par coloration au Bleu de Coomassie G250 Bio-Safe (Bio-Rad) pendant 1 à 2 h. Le marqueur de masse moléculaire utilisé est le Precision Plus Protein™ unstained standards (Bio-Rad). La détermination de la masse moléculaire de la protéine a été effectuée en utilisant les étalons non colorés Precision Plus Protein™ (Bio-Rad).

11.4.3. Étude du profil de restriction de l'ADN phagique

11.4.3.1. Extraction de l'ADN phagique

La méthode utilisée est décrite par **Sambrook et Russell (2001)**. Un millilitre d'une suspension à haut titre phagique (10^{10} - 10^{11} UFP/mL) est traitée avec de la DNase (Invitrogène, Thermo Fisher Scientific) pendant 30 min. Quarante microlitres de protéinase K à 20 mg/mL (Qiagen, Hilden, Allemagne) sont ajoutés et le mélange est incubé à 56°C pendant 30 min. La lyse des bactériophages est réalisée par ouverture de la coque protéique, libérant ainsi le matériel génétique phagique. Ensuite, 100 μ L de SDS à 10 % sont ajoutés et la solution est incubée à 65°C pendant 30 min. Pour éliminer les protéines phagiques, le mélange est traité avec 600 μ L de phénol/chloroforme/alcool

isoamylique (25/24/1). Après avoir été vortexé pendant 10 s, le mélange était centrifugé à 12000 g pendant 5 min à température ambiante. Les protéines se trouvant à l'interface et dans la phase supérieure aqueuse sont ensuite récupérées et additionnées de 600 µL de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). Après passage au vortex pendant 10 s, le mélange est de nouveau centrifugé à température ambiante à 12000 g pendant 5 min. Afin de concentrer l'ADN, la phase aqueuse est ensuite additionnée d'un dixième de volume d'acétate de sodium 3 M (pH 4,8) et d'un volume d'éthanol pur. Après centrifugation 15 min à 14000 g, le culot d'ADN est lavé à température ambiante avec de l'éthanol à 70 %, par centrifugation pendant 5 min à 14000 g afin d'éliminer les sels et de permettre un séchage rapide. Le culot d'ADN phagique est alors repris dans 40-50 µL d'eau milli-Q (Sigma).

La concentration (ng/µL) et la pureté de l'ADN phagique sont déterminées respectivement à 260 nm et à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop ND-1000) (Nanodrop Technologies). La qualité de l'ADN extrait est estimée après électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % à 80 V pendant environ 90 min.

11.4.3.2. Digestion de l'ADN phagique

Afin d'obtenir un profil optimal de restriction enzymatique de l'ADN phagique, il est nécessaire de tester plusieurs enzymes de restriction. Ces profils permettent

- d'analyser la sensibilité de l'ADN phagique aux enzymes de restriction ;
- de déterminer la taille de l'ADN des bactériophages ;
- de déterminer la carte de restriction de l'ADN phagique;
- de donner une idée de la similarité entre deux ADN phagiques.

Pour la digestion de l'ADN des bactériophages isolés, l'action de 5 enzymes de restriction sont testées : BamHI, EcoRI, HindIII, Hin6I et TaqI (Promega). A 0,5 µg d'ADN dilué dans 20 µL d'eau milli-Q a été ajouté 1/10 du volume final du tampon de digestion spécifique de l'enzyme utilisée. Dix unités de l'enzyme sont alors additionnées. Le mélange est incubé pendant 1 h à la température optimale de l'enzyme. Après digestion, l'ADN est mis à migrer 2 h à 80 V sur un gel d'agarose à 0,8 % dans un tampon 1X TAE (Promega). La taille des fragments d'ADN produits par la digestion est déterminée par comparaison de leur distance de migration avec celle d'un marqueur dont on connaît la taille des fragments (SmartLadder 10 kb) (Eurogentec).

12. Evaluation de l'effet anti-biofilm des bactériophages isolés

12.1. Préparation des coupons en inox

Comme on l'a déjà mentionné *au paragraphe (7.1.)*, les coupons en inox de 2 mm d'épaisseur et de 15 mm de diamètre (Bretagne Laser) sont soumis à un protocole de nettoyage basé sur l'action d'un détergent alcalin fort de la gamme RBS 35 (Chemical Products R) décrit par **Jan et al. (2011)**, Après autoclavage, les coupons sont séchés sous flux laminaire en conditions stériles et répartis dans des P24 à raison d'un coupon par puits.

12.2. Traitement curatif sur des biofilms préformés (Post-traitement phagique)

Une aliquote de 300 μ L de chaque culture bactérienne en phase exponentielle de croissance (10^8 UFC/mL) est prélevée et déposée dans l'un des puits de la P24 contenant le coupon en inox. Les plaques sont incubées statiquement pendant 24, 48 et 72h à 30°C. Après la période d'incubation, les suspensions sont éliminées et les coupons conservés dans les puits sont rincés avec une solution saline à 9 g/L de NaCl afin d'éliminer les cellules non adhérentes. La méthodologie de **Garcia et al (2017)** et **Karaca et al. (2015)** a été adaptée et optimisée afin d'évaluer l'efficacité des bactériophages pour réduire le biofilm préformé par des souches du groupe *B. cereus*. Pour cela, les échantillons de biofilms déjà formés sur les coupons sont traités avec 300 μ L de la suspension phagique appropriée à différents titres, allant de 10^5 à 10^8 UFP/mL et incubés pendant 6 h à 30°C. Pour chaque biofilm formé après 24, 48 et 72 h d'incubation, les essais de traitement par le bactériophage approprié, à ses différents titres, sont réalisés en triplicat. De plus, des essais sont réalisés en triplicat avec des biofilms contrôle non traités par des suspensions phagiques.

Après le traitement phagique, chaque puits est rincé 3 fois avec une solution saline à 9 g/L de NaCl et laissé sécher. Ensuite, chaque coupon est transféré dans un nouveau tube contenant 5 mL d'une solution aqueuse de Tween 80 à 0,02 % (Thermo Fisher Scientific) et cinq billes de verre stériles (3 mm de diamètre). Les tubes sont vortexés pendant 1 min. Pour séparer les phages résiduels, la suspension récupérée est centrifugée pendant 10 min à 10000 g à 25°C. Le culot bactérien est repris dans 1 mL de tampon de TS et le dénombrement des bactéries est effectué par microméthode de comptage sur plaque (**Baron et al., 2006**). Les résultats expriment l'efficacité du traitement bactériophagique pour la destruction du biofilm préformé par des bactéries du groupe *B. cereus*. Le

pourcentage d'éradication du biofilm est calculé selon la formule utilisée par **Karaca et al. (2015)** :

$$PK (\%) = (1 - 10^{-LR}) \times 100$$

Où

PK est le pourcentage de destruction,

LR est la réduction logarithmique, qui correspond à la différence entre le Log₁₀ de la charge bactérienne dans un biofilm non traité et Log₁₀ de la charge bactérienne résiduelle dans un biofilm traité.

12.3. Traitement préventif au cours de la formation du biofilm (Traitement phagique)

Le protocole d'évaluation du potentiel inhibiteur des bactériophages sur la formation de biofilms formé de bactéries du groupe *B. cereus* est adapté et optimisé à partir des travaux de **Karaca et al. (2015)**. Brièvement, une aliquote de 300 µL de chaque culture bactérienne en phase de croissance exponentielle (10⁸ UFC/mL) et 300 µL de suspension de phage à différents titres (10⁵-10⁸ UFP/mL) sont déposées dans chaque puits contenant un coupon en inox. Le puits témoin n'est inoculé qu'avec une suspension bactérienne hôte. Les essais sont réalisés en triplicat. Après incubation des plaques pendant 24, 48 et 72 h à 30°C, les coupons subissent les mêmes traitements (Rinçage, l'obtention de la suspension bactérienne résiduelle après traitement phagique, dénombrement et expression des résultats) susmentionnée dans le **paragraphe précédente (12.2.)**.

Résultats et Discussion

Chapitre 1

Isolement, identification, prévalence et diversité génétique des isolats du groupe *B. cereus* d'origine

ARTICLE SE RAPPORTANT AUX RESULTATS DE CE CHAPITRE

Maroua GDOURA-BEN AMOR, Mariam SIALA, Mariem ZAYANI, Noël GROSSET, Salma SMAOUI, Férièle MESSADI-AKROUT, Florence BARON, Sophie JAN, Michel GAUTIER and Radhouane GDOURA. (2018). Isolation, identification, prevalence, and genetic diversity of *Bacillus cereus* group bacteria from different foodstuffs in Tunisia. *Frontiers in Microbiology*. March 2018 | Volume 9 | p44712 doi: 10.3389/fmicb.2018.00447

1. Résultats

1.1. Isolement et identification des souches du groupe *B. cereus*

Une collection de 687 aliments a été analysée pour étudier la prévalence du groupe *B. cereus*. Au total, la présence de *B. cereus* a été suspectée dans 191 échantillons d'aliments (27,8%) par culture sur la gélose MYP, donnant lieu à la création d'une collection de 191 isolats dont l'appartenance au groupe *B. cereus* restait à confirmer. Les concentrations bactériennes étaient inférieures à 3 log UFC/ g ou mL dans la plupart des aliments étudiés (77,5%). Dans 15,7% des échantillons testés, la charge suspectée en *B. cereus* se situait entre 3 et 4 log UFC/ g ou mL, alors que dans 6,8% des échantillons, les quantités dépassaient 4 log UFC/ g ou mL. Les concentrations les plus élevées (supérieures à 4 log UFC/ g ou mL) ont été observées dans 20% des légumes frais coupés, 11,1% des aliments cuits, 10,7% des produits céréaliers et 9,7% des produits de pâtisserie (**Tableau 18**). La technique de PCR ciblant la séquence du gène de la protéine structurale des spores (*sspE*), spécifique au groupe *B. cereus* (**Kim et al., 2005**), a été mise en œuvre afin de vérifier l'appartenance de chaque isolat au groupe *B. cereus*. Ainsi, ce test s'est révélé positif pour 174 isolats (91,1%), allant de 67,7% des produits céréaliers pour la prévalence la plus forte à 4,8% des produits laitiers pour la prévalence la plus faible. Afin de différencier les souches psychrotrophes des souches mésophiles au sein du groupe, des tests PCR ciblant des séquences signatures spécifiques ont été réalisés. La signature « *cspA* » n'a été observée chez aucune souche de la collection. Une coexistence des deux séquences signatures « *16S rDNA-1 m* » et « *16S rDNA-2 p* » portées par le gène codant pour l'ARNr 16S a été observée.

1.2. Affiliation phylogénétique des isolats

L'analyse de la séquence partielle du gène *panC* a montré que 106 isolats (60,9%), 51 isolats (29,3%), 13 isolats (7,5%) et 4 isolats (2,3%) ont été attribués aux groupes phylogénétiques III, IV, II et V, respectivement (**Tableau 19**). Aucun des isolats n'est affilié aux groupes VI et VII. La plupart des isolats appartenant au groupe III (groupe le plus fréquemment identifié) provenaient d'échantillons cuits (aliments cuits, produits de pâtisserie et produits à base de volaille cuits).

Tableau 18 : Prévalence des bactéries du groupe *B. cereus* dans des échantillons d'aliments collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015, analysés sur milieu MYP (culture conventionnelle) et par la recherche de la signature spécifique au groupe *B. cereus* (test PCR décrit par **Kim et al. (2005)**).

Echantillons d'aliments (Nb. total d'échantillons)	Nb (%) d'échantillons contaminés par des bactéries présumées appartenir au groupe <i>B. cereus</i> et concentration bactérienne associée			Nb (%) d'échantillons contaminés par des bactéries du groupe <i>B. cereus</i>	
	< 3 log ufc/g ou mL	3-4 log ufc/g ou mL	≥ 4 log ufc/g ou mL	Culture conventionnelle	Test PCR
Aliments cuits (103)	33 (73,3)	7 (15,6)	5 (11,1)	45 (43,7)	42 (40,8)
Légumes frais coupés (99)	4 (80,0)	0 (0,0)	1 (20,0)	5 (5,0)	5 (5,0)
Produits de pâtisserie (80)	33 (80,4)	4 (9,7)	4 (9,7)	41 (51,3)	37 (46,3)
Produits laitiers (84)	5 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (5,9)	4 (4,8)
Epices (59)	17 (89,5)	2 (10,5)	0 (0,0)	19 (32,2)	17 (28,9)
Produits en conserve (54)	10 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	10 (18,5)	9 (16,7)
Produits céréaliers (34)	16 (57,2)	9 (32,1)	3 (10,7)	28 (82,4)	23 (67,7)
Viande de volaille crue (85)	6 (75)	2 (25)	0 (0,0)	8 (9,4)	8 (9,4)
Viande de volaille cuite (55)	15 (83,3)	3 (16,7)	0 (0,0)	18 (32,7)	18 (32,7)
Produits de la mer (34)	9 (75)	3 (25)	0 (0,0)	12 (35,3)	11 (32,4)
Total (687)	148 (77,5)	30 (15,7)	13 (6,8)	191 (27,8)	174 (5,3)

Tableau 19 : Classification phylogénétique des isolats du groupe *B. cereus* isolés d'aliments collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015, selon **Guinebretière et al. (2008, 2010)**.

Echantillons d'aliments	Nombre d'isolats du groupe <i>B. cereus</i>	Groupe phylogénétique			
		II	III	IV	V
Aliments cuits	42	4	28	9	1
Légumes frais coupés	5	1	2	2	0
Produits de pâtisserie	37	1	20	16	0
Produits laitiers	4	0	4	0	0
Epices	17	2	6	9	0
Produits en conserve	9	0	8	1	0
Produits céréaliers	23	3	11	8	1
Viande de volaille crue	8	2	6	0	0
Viande de volaille cuite	18	0	12	6	0
Produits de la mer	11	0	9	0	2
Total	174	13	106	51	4
	(100%)	(7,5%)	(60,9%)	(29,3%)	(2,3%)

1.3. Typage moléculaire des isolats

Le typage moléculaire des souches du groupe *B. cereus* isolées à partir d'aliments a été réalisé par la PFGE. Le seuil de similarité étant fixé à 80%, un polymorphisme remarquable a été observé dans la collection (**Figure 11**). L'analyse des profils PFGE obtenus après digestion par *SmaI* de l'ADN génomique des 174 isolats du groupe *B. cereus*, a mis en évidence que 58 isolats ont été répartis en 27 groupes différents (de PF1 à PF27) (**Tableau 20**), tandis que les 116 isolats restants ont été distincts l'un de l'autre. (**Figure 11**).

Parmi les 27 « grappes » obtenues, 12 (PF2, PF4, PF7 à PF9, PF13, PF18, PF19, PF22 à PF24 et PF26) sont associées, pour chacune, à un type d'échantillon spécifique et à un groupe phylogénétique défini. À l'inverse, pour les 15 « grappes » restantes, les isolats à l'intérieur de chaque « grappe » ne proviennent pas tous du même type d'échantillon et/ou du même groupe phylogénétique. La technique de typage ERIC-PCR a montré, en utilisant un seuil de similarité de 80%, que 38 profils (de ER1 à ER38) ont été générés contre 61 isolats non classés (**Figure 12**). Toutefois, la distribution des isolats en grappes est indépendante de l'origine de l'échantillon et du groupe phylogénétique. Cette étude révèle que pour les isolats appartenant aux groupes ER6- PF24; ER13-PF18; ER26- PF27 et ER34 - PF13 les profils de typage sont concordants entre ERIC-PCR et PFGE (**Tableau 20**). Des résultats de typage divergents ont été observés pour le reste des isolats. En effet, la majorité des « grappes » montrant des profils ERIC identiques affiche au moins une souche présentant un profil PFGE différent (ER2 (1) - PF16; ER12- PF2; ER14- PF17; ER16-PF8; ER18- PF19; ER27- PF22; ER9-PF 23; ER36-PF26; ER1; ER7; ER8; ER10; ER11; ER15; ER35; ER37; ER38; ER3 à ER5, ER19 à ER25 et ER28 à ER33). Inversement, certaines souches caractérisées par des profils ERIC-PCR différents présentent des profils PFGE identiques (PF1, PF3 à PF7, PF9 à PF12, PF14 à PF15 et PF20).

1.4. Évaluation du pouvoir d'adhésion des isolats

L'adhésion des 174 isolats du groupe *B. cereus* a été étudiée pour chaque état physiologique, sous forme sporulée et sous forme végétative et à des taux d'inoculum de l'ordre de 6 log UFC/mL d'eau physiologique. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules adhérees par unité de surface (log UFC/cm²), après 2 h de contact avec des coupons en inox. On note que les capacités d'adhésion sont variables. Les valeurs enregistrées sont comprises entre 1,7 et 5,4 log UFC/cm² pour les cellules végétatives et

entre 2,4 et 5,9 log UFC/cm² pour les spores (**Figure 13**). La majorité des souches (73% de la collection) présente un taux d'adhésion des spores plus important que celui des cellules végétatives. Pour 10,9% des souches, les spores et les cellules végétatives montrent le même pouvoir d'adhésion. Tandis que pour 16,1% des souches, les cellules végétatives montrent une adhésion plus importante que celle des spores.

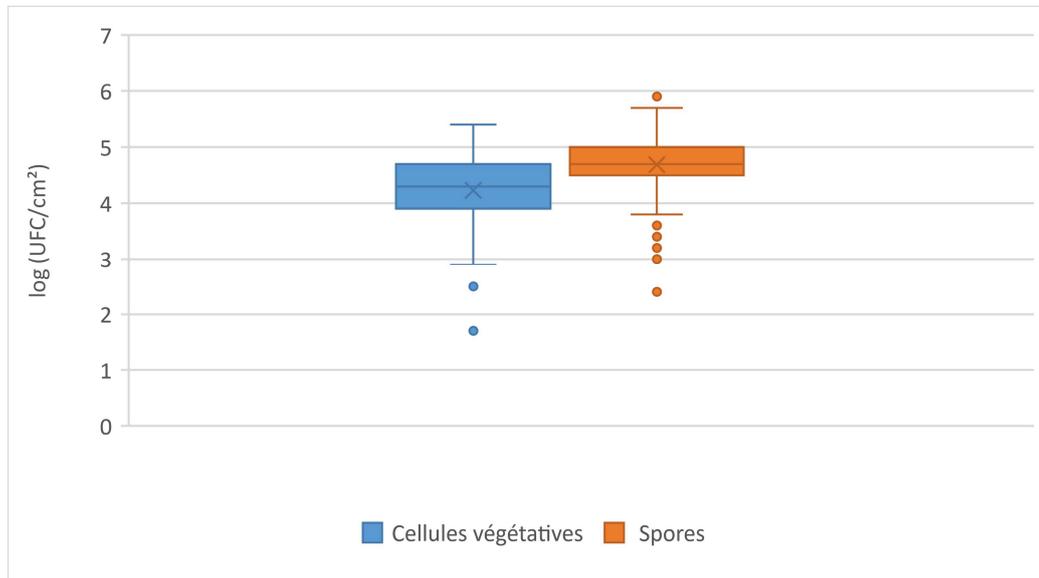


Figure 13: Etude du pouvoir d'adhésion des spores et des cellules végétatives de 174 isolats du groupe *B. cereus* sur des coupons en inox.

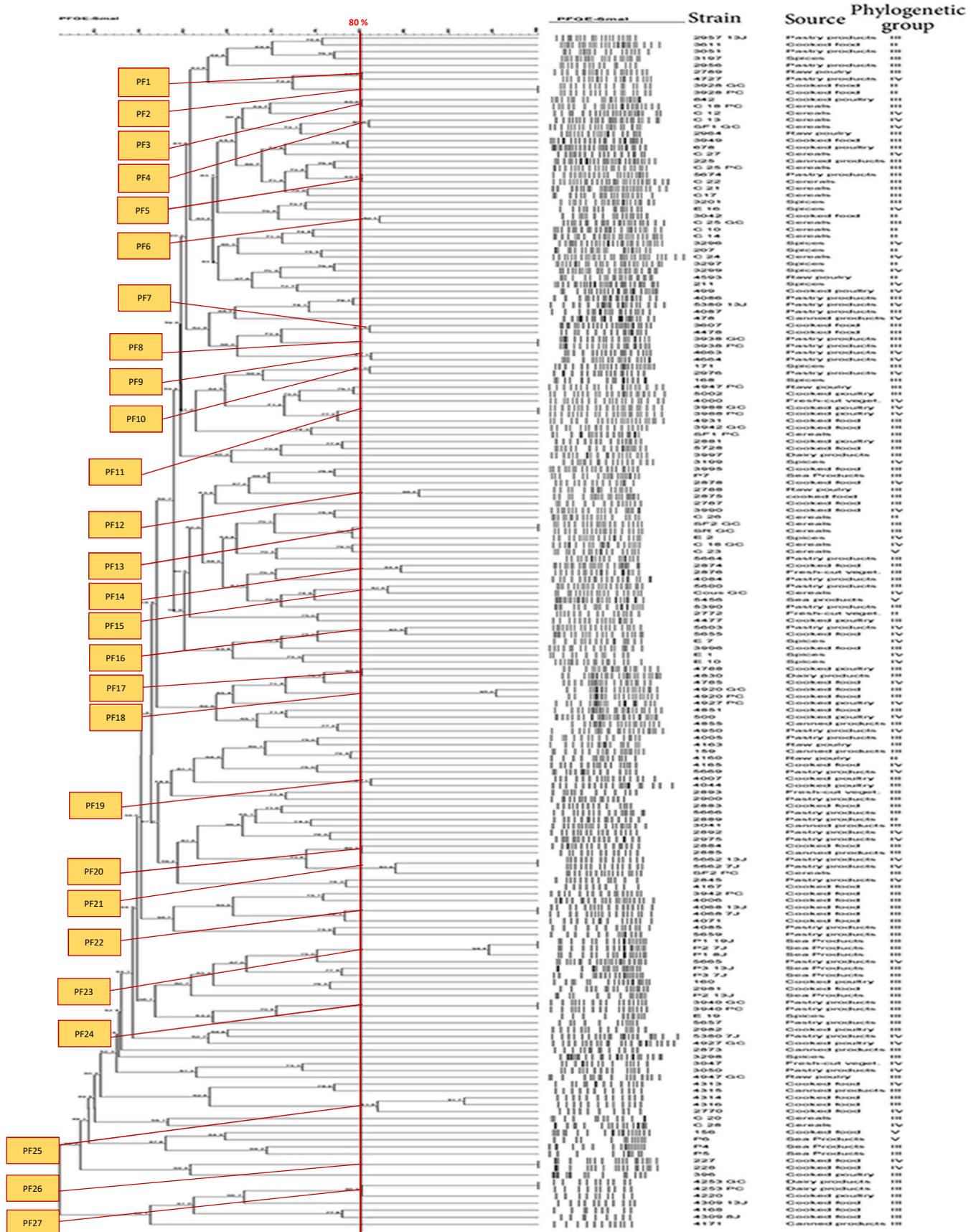


Figure 11: Dendrogramme de PFGE montrant les relations entre les isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

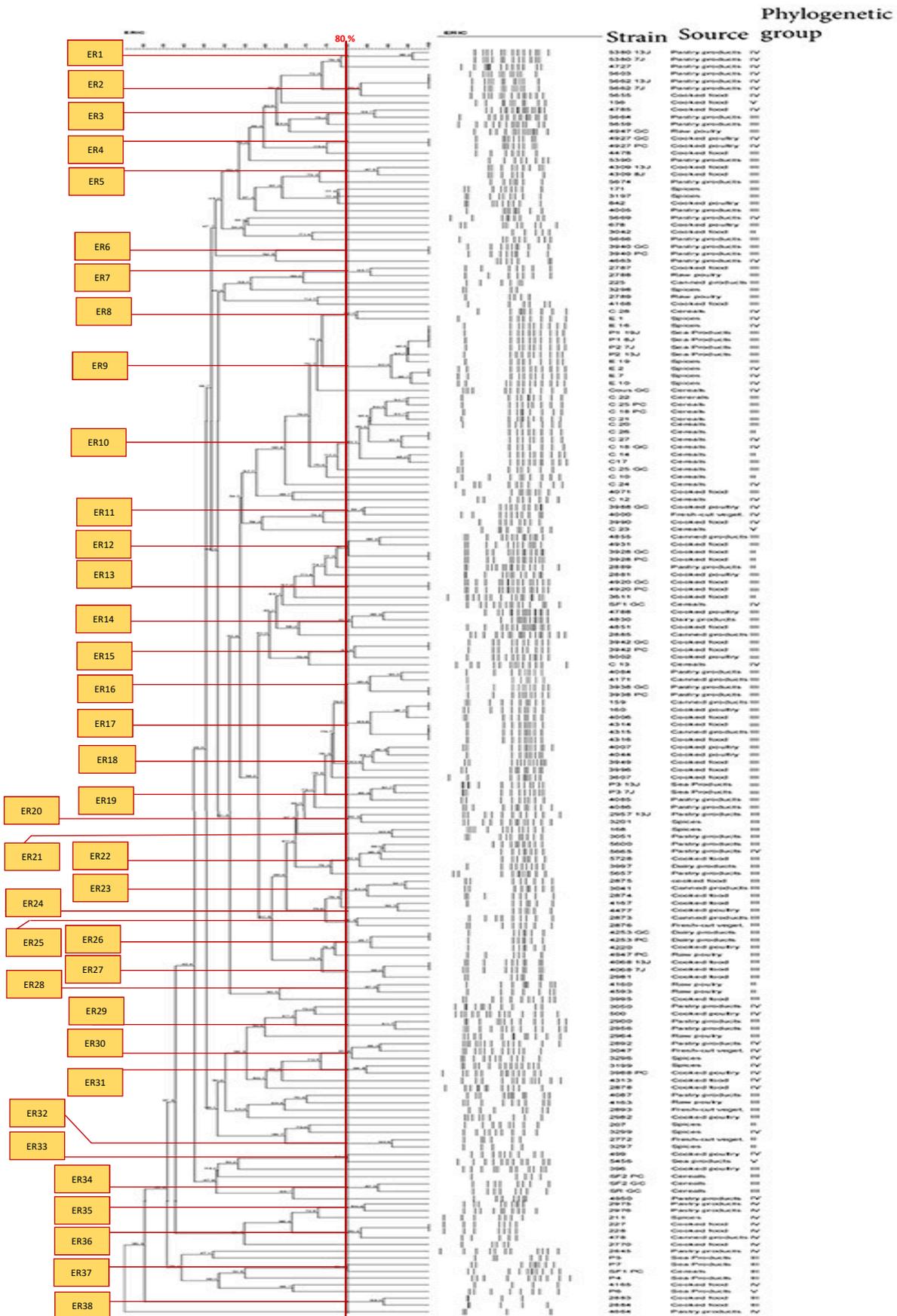


Figure 12: Dendrogramme de ERIC montrant les relations entre les isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

Tableau 20: Relations entre les profils ERIC-PCR et PFGE des isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

Tableau 20 (Suite 1)

Clusters	Isolats	Profils ERIC-PCR [†]	Profils PFGE [‡]
ER1	5380 13J	S	D
	5380 7J	S	D
ER2	ER2(1)	5603	S
		5655	S
	ER2(2)	5662 13J	S
		5662 7J	S
ER3	4785	S	
	5664	S	
ER4	4927 GC	S	
	4927 PC	S	
ER5	4309 13J	S	
	4309 8J	S	
ER6	3940 PC	S	
	3940 GC	S	
ER7	2787	S	
	2788	S	
ER8	C28	S	
	E1	S	
ER9	E16	S	
	P1 19J	S	
	P1 8J	S	
	P2 7J	S	
	P2 13J	S	
	E19	S	
	E2	S	
	E7	S	
	E10	S	
ER10	C22	S	
	C25 PC	S	
	C18PC	S	
	C21	S	
	C20	S	
	C26	S	

Clusters	Isolats	Profils ERIC-PCR [†]	Profils PFGE [‡]
	C27	S	
	C18 GC	S	
	C14	S	
	C17	S	
ER11	3988 GC	S	
	4000	S	
ER12	4855	S	
	4931	S	
	3928 GC	S	
	3928 PC	S	
ER13	4920 GC	S	
	4920 PC	S	
ER14	4788	S	
	4830	S	
	4851	S	
ER15	3942 PC	S	
	3942 GC	S	
ER16	4084	S	
	4171	S	
	3938 GC	S	
	3938 PC	S	
ER17	159	S	
	160	S	
	4006	S	
	4314	S	
	4315	S	
	4316	S	
	4316	S	
ER18	4007	S	
	4044	S	
	3949	S	
	3996	S	
ER19	P3 13J	S	
	P3 7J	S	
	4086	S	
ER20	2957 13J	S	
	3201	S	
ER21	168	S	
	3051	S	
ER22	5600	S	
	5655	S	
	5728	S	
	3997	S	
ER23	2875	S	
	3041	S	

[†]En se basant sur le dendrogramme PFGE illustré à la **Figure 11**

[‡]En se Basant sur le dendrogramme ERIC-PCR illustré à la **Figure 12**

ER : cluster ERIC-PCR ; **PF** : cluster PFGE ; **S** : similaire ; **D** : Différent

Tableau 20 (Suite 2)

Clusters	Isolats	Profils ERIC-PCR ⁺	Profils PFGE ¹
	2874	S	D
ER24	4167	S	D
	4477	S	D
ER25	2873	S	D
	2876	S	D
ER26	4253 GC	S	S
	4253 PC	S	S
	4220	S	S
ER27	4068 13J	S	S
	4068 7J	S	S
	2981	S	D
ER28	4160	S	D
	4593	S	D
ER29	2900	S	D
	2956	S	D
ER30	2892	S	D
	3047	S	D
	3296	S	D
ER31	3199	S	D
	3988 PC	S	D
ER32	2772	S	D
	3297	S	D
ER33	499	S	D
	5456	S	D
ER34	SF2 GC	S	S
	SR GC	S	S
ER35	2975	S	D
	2976	S	D
ER36	227	S	S
	228	S	S
	478	S	D
ER37	P7	S	D
	SF1 PC	S	D
ER38	2883	S	D
	2884	S	D
PF1	2789	D	S
	4727	D	S
PF2	3928 GC	S	S
	3928 PC	S	S
PF3	842	D	S
	C18 PC	D	S
PF4	C13	D	S
	SF1 GC	D	S
PF5	5674	D	S

Tableau 20 (Suite 3)

Clusters	Isolats	Profils ERIC-PCR ⁺	Profils PFGE ¹
	C22	D	S
PF6	3042	D	S
	C25 GC	D	S
PF7	3607	D	S
	4478	D	S
PF8	3938 GC	S	S
	3938 PC	S	S
PF9	4663	D	S
	4664	D	S
PF10	171	D	S
	2976	D	S
PF11	3988 GC	D	S
	3988 PC	D	S
PF12	2788	D	S
	2875	D	S
PF13	SF2 GC	S	S
	SRGC	S	S
PF14	2874	D	S
	2876	D	S
PF15	5600	D	S
	COUS GC	D	S
PF16	5603	S	S
	5655	S	S
PF17	4788	S	S
	4830	S	S
PF18	4920 GC	S	S
	4920 PC	S	S
PF19	4007	S	S
	4044	S	S
PF20	2884	D	S
	2885	D	S
PF21	5662 13J	S	S
	5662 7J	S	S
	SF2 PC	D	S
PF22	4068 13J	S	S
	4068 7J	S	S
PF23	P1 19J	S	S
	P2 7J	S	S
	P1 8J	S	S
PF26	227	S	S
	228	S	S
PF27	4253 PC	S	S
	4253 GC	S	S
	4220	S	S

2. Discussion

Cent-quatre-vingt-onze échantillons parmi les 687 analysés ont été identifiés comme pouvant être contaminés par des bactéries du groupe *B. cereus*, soit un taux moyen de contamination de 27,8%. Le taux de contamination des échantillons varie en fonction du produit alimentaire analysé ; il passe de 5% dans les échantillons de légumes frais coupés à 82,4% dans les échantillons de produits céréaliers (**Tableau 18**). La qualité microbiologique des aliments analysés a pu être estimée grâce aux résultats des dénombrements (**Tableau 18**).

▪ Niveau de contamination dans les aliments

Selon les données de Public Health England (**PHE**) (**2009**), l'échantillon est de qualité microbiologique satisfaisante ou acceptable si la charge moyenne en groupe *B. cereus* est inférieure à 3 log UFC/mL ou g. Cependant, des doses aussi faibles que 3 log UFC/mL ou g dans l'échantillon alimentaire peuvent suffire à provoquer une intoxication alimentaire (**Stenfors Arnesen et al., 2008; Gilbert et Kramer, 1986**). En fonction des conditions de manipulation et de stockage des aliments et/ou de nettoyage des équipements, la charge bactérienne peut rapidement augmenter et atteindre un niveau dangereux pour la consommation (jusqu'à 4 log UFC/ g ou mL). L'estimation du risque diffère cependant d'une directive à l'autre : la dose de bactéries du groupe *B. cereus* est considérée comme dangereuse pour le consommateur lorsqu'elle est supérieure à 5 log UFC/mL ou g, selon les directives britanniques [**PHE**] (**2009**) et lorsqu'elle est supérieure à 4 log UFC/mL ou g selon la Food Standards Australia Nouvelle-Zélande [**FSANZ**] (**2001**). Ainsi, il est considéré qu'un aliment est de qualité insatisfaisante ou inacceptable, donc qu'il présente un risque pour la santé humaine, lorsque sa contamination est comprise entre 3 et 4 log UFC/mL ou g [**FSANZ**] (**2001**).

Enfin, la qualité microbiologique est qualifiée d'insatisfaisante ou inacceptable, avec un risque élevé pour la santé humaine, pour une contamination d'au moins 4 log UFC/mL ou g. Notre étude montre que dans 77,5% des échantillons testés, les concentrations sont inférieures à 3 log UFC/mL ou g, donc conformes si l'on se réfère aux directives britanniques [**PHE**] (**2009**). Cependant, 6,8% des échantillons montrent une contamination supérieure à 4 log UFC/mL ou g. Ils présentent donc un danger pour la consommation humaine si l'on se réfère aux directives néo-zélandaises et australiennes [**FSANZ**] (**2001**). La forte occurrence des bactéries du groupe *B. cereus* dans les légumes

frais coupés, les aliments cuits et les produits de pâtisserie a déjà été rapportée par **Rosenquist et al. (2005)**. En effet, ces auteurs ont montré que ce type de contamination concernait les concombres et les tomates fraîches, les produits traités thermiquement, la crème pâtissière et les desserts. Le niveau élevé de contamination des aliments transformés peut résulter de la contamination des matières premières et de la résistance subséquente des spores aux processus thermiques ou aux autres procédés de fabrication. Un refroidissement lent et un stockage prolongé à température ambiante permettent aux spores de germer et aux cellules végétatives issues de la germination, de se développer (**Ankolekar et al., 2009; Borch et Arinder, 2002**). Les biofilms formés de bactéries du groupe *B. cereus*, présents à la surface des installations industrielles et des réservoirs de stockage peuvent être une source de contamination des aliments en cours de traitement (**Faille et al., 2014**). Dans les produits céréaliers, les doses infectieuses sont considérées comme étant comprises entre 1,5 et 3,4 log UFC / g (**Lee et al., 2009**). Dans ce type d'aliments, les spores du groupe *B. cereus* ont la capacité de survivre et de résister à des températures assez élevées (**Claus et Berkeley, 1986**), y compris au cours du conditionnement (**Väisänen et al., 1991**). Le niveau de contamination des produits de la mer que nous avons mis en évidence est en accord avec celui rapporté par **Rahmati et Labbe (2008)**, à savoir une concentration comprise entre 1,6 et 3 log UFC/g. Tous les échantillons de conserves et de produits laitiers contaminés par le groupe *B. cereus* ont été jugés de qualité satisfaisante, leur taux de contamination étant inférieur à 3 log UFC/mL ou g. Cependant, une étude menée en Inde a révélé des taux de contamination beaucoup plus élevés, à savoir plus de 5 log UFC/g de bactéries du groupe *B. cereus* dans 10% des produits laitiers analysés (**Bedi et al., 2005**). Nos données montrent que le niveau de contamination est inférieur à 3 log UFC/mL ou g pour la plupart des échantillons d'épices analysés (89,5%). Seuls deux échantillons (10,5%) présentent des taux de contamination compris entre 3 et 4 log UFC/g. Des résultats ont été rapportés en Turquie, montrant des taux de contamination similaires dans les épices (**Aksu et al., 2000**). Cependant, **kneifel et al. (1994)** ont montré que les bactéries du groupe *B. cereus* pouvaient atteindre une concentration de 5 log UFC/g dans certaines épices provenant d'Autriche. Par conséquent, l'utilisation de telles épices dans les aliments peut présenter un risque en cas de traitement thermique inadéquat. Les taux de contamination par les bactéries du groupe *B. cereus* dans respectivement, 75% et 83,3% des échantillons de volaille crue et cuite, se sont avérés être inférieurs à 3 log UFC/g. Ces niveaux sont proches de ceux publiés par **Rao et al. (2012)** pour des aliments à base de viande de

volaille (environ 3,4 log UFC/g). La présence de bactéries du groupe *B. cereus* dans la viande de poulet crue peut être due à une contamination lors de l'abattage de l'animal et/ou de la livraison, du transport et du stockage de la viande. Ces bactéries ont pu aussi être véhiculées par les additifs alimentaires ajoutés à la viande de volaille au cours de sa cuisson (Floristean et al., 2007). Il peut aussi s'agir de contaminants véhiculés par les manipulateurs, les ustensiles de cuisine ou l'environnement (contaminations croisées). Des températures inadéquates de cuisson ou de stockage de la volaille crue peuvent également faciliter la croissance bactérienne (Floristean et al., 2007).

Parmi les 191 isolats présomptifs du groupe *B. cereus*, 174 (91,1%) ont été confirmés comme appartenant bien à ce groupe bactérien, sur la base de l'amplification d'un fragment de 71 pb du gène *sspE* spécifique au groupe (Tableau 18). Toutes les colonies présumées du groupe *B. cereus* isolées à partir de légumes frais coupés, de viande de volaille crue et cuite ont été bien confirmés appartenir au groupe *B. cereus* appartiennent bien au groupe *B. cereus*. Pour tous les autres aliments testés, au moins un échantillon de chaque type s'est avéré ne pas appartenir au groupe alors que la colonie avait l'aspect escompté sur le milieu MYP. Par conséquent, ces résultats indiquent que la sensibilité de la méthode de culture conventionnelle n'est pas suffisamment performante pour détecter les bactéries du groupe *B. cereus*.

▪ Prévalence dans les aliments

La prévalence bactérienne élevée dans les échantillons de céréales testés (67,7%) est comparable à celle obtenue par Lee et al. (2009) (76% des céréales analysées). La prévalence des bactéries du groupe *B. cereus* dans les produits laitiers et dans les légumes frais coupés (respectivement 4%, 8% et 5%) est inférieure à celle rapportée dans d'autres études (Merzougui et al., 2014; Samapundo et al., 2011b). En effet, Samapundo et al. (2011) montrent que 30 à 40% des échantillons de légumes frais coupés sont contaminés. Merzougui et al. (2014) montrent que 40% des produits laitiers le sont aussi. Ces différences pourraient être attribuées aux pratiques du fabricant et aux conditions de stockage des produits (Tewari et Abdullah, 2015). La prévalence observée dans la viande de volaille crue (9,4% des échantillons) et cuite (32,7%) des échantillons est en accord avec celle rapportée dans les études de Floristean et al. (2007) et d'Aklilu et al. (2016). Ces auteurs montrent en effet que la prévalence est plus élevée pour les volailles cuites que pour les volailles crues. Les résultats rapportés pour les épices et les produits de la mer sont très variables. Les échantillons d'épices analysées par Merzougui et al.

(2014) et **Kneifel et al. (1994)** sont positifs pour 32,8% et 49,37%, des aliments analysés par ces auteurs, respectivement. En revanche, **Shah et al. (1996)** ont signalé une occurrence plus faible en Inde avec seulement 20% des échantillons d'épices contaminés. Concernant les produits de la mer, la prévalence est proche de celle publiée par **Das et al. (2009)** (36,7%) mais plus forte que celle rapportée par **Rahmati et Labbe (2008)** (17,9%). Des bactéries du groupe *B. cereus* ont également été identifiées dans 46,3% des produits de pâtisserie, 40,8% des échantillons d'aliments cuits et 16,7% des produits en conserve. Nos résultats sont en accord avec ceux présentés dans d'autres études où le groupe *B. cereus* a été trouvé dans des aliments traités thermiquement tels que les sauces, les soupes, les pâtes et le riz cuit (**Rosenquist et al., 2005; Wijnands et al., 2006**) et dans les produits en conserve (**Oranusi et al., 2012**).

▪ **Recherche de la signature spécifique au groupe *B. cereus***

Afin de différencier les souches psychrotrophes des souches mésophiles du groupe *B. cereus*, des tests PCR ciblant des séquences signatures spécifiques ont été réalisés. L'amplification d'une région du gène codant l'ARNr 16S permet de distinguer les souches mésophiles des souches psychrotrophes. Il existe en effet une signature spécifique à chaque groupe thermique, à savoir la signature « *16S rDNA-1 m* » pour les mésophiles et la signature « *16S rDNA-2 p* » pour les psychrotrophes (**Von Stetten et al., 1998**). L'amplification de la séquence signature au niveau du gène *cspA*, codant une protéine majeure de choc de froid, permet de différencier les deux groupes thermiques car cette signature n'existe que chez les souches psychrotrophes qualifiés de « purs ». Aucune souche de notre collection ne présente cette signature, excluant la présence de psychrotrophes « purs ». Cependant, la coexistence des deux séquences signatures portées par le gène codant pour l'ARNr 16S démontre la nature psychrotrophe « intermédiaire » de ces souches (**Von Stetten et al., 1999**). Ces dernières expriment un phénotype mésophile ou psychrotrophe selon les conditions climatiques auxquelles elles sont exposées.

▪ **Affiliation phylogénétique des isolats**

D'après **Guinebretière et al. (2008)**, les groupes phylogénétiques II et VI sont psychrotrophes, les groupes III, IV et VII sont mésophiles et le groupe V a un comportement intermédiaire. Le groupe III présente le risque le plus élevé, à l'origine de toxi-infections alimentaires. Les groupes VII, IV et II présentent un risque modéré ; le

groupe V, un risque plus faible et le groupe VI, un risque très faible. Dans notre étude, le groupe phylogénétique III est le plus représenté (60,9% des échantillons) (**Tableau 19**). La forte prévalence d'isolats appartenant au groupe III pourrait être associée à la transformation d'aliments cuits, souvent à des températures abusives et / ou à leur stockage prolongé à trop forte température (**Cadel Six et al., 2012**). Les caractères culturels propres aux bactéries du groupe III, dont la thermorésistance des spores et leur capacité de germer et de croître à des températures allant de 15 à 45°C sont favorables à leur sélection dans ce type d'aliments (**Carlin et al., 2010**). Ce groupe phylogénétique est l'un des plus cytotoxiques et est donc susceptible de présenter un risque potentiel pour les consommateurs (**Guinebrière et al., 2010**). Au total, 29,3% des isolats ont été affectés au groupe IV, représentant un risque élevé d'intoxication alimentaire (**Guinebrière et al., 2010**). La moindre occurrence du groupe IV par rapport au groupe III peut s'expliquer par le fait que les souches appartenant au groupe IV sont plus sensibles aux traitements thermiques que celles appartenant au groupe III (**Afchain et al., 2008; Carlin et al., 2010**). Treize isolats (7,5%) ont été associés au groupe phylogénétique psychrotrophe II, tandis qu'aucune souche n'a été classée dans le groupe phylogénétique VI, considéré comme étant le groupe des psychrotrophes « purs », possédant la signature de la psychrotrophie sur le gène *cspA*. On peut supposer que c'est en raison de la sensibilité thermique plus élevée des spores de bactéries psychrotrophes à des traitements thermiques sévères. Les isolats appartenant au groupe V (2,3%), décrits comme ayant une plage de température de croissance à intermédiaire, se sont avérés être rares dans la collection, probablement en raison de leur faible prévalence dans les matières premières et les ingrédients (**Afchain et al., 2008**). Chaque type d'échantillon d'aliments est susceptible d'être contaminé par un mélange de souches du groupe *B. cereus* pouvant appartenir à divers groupes phylogénétiques (**Tableau 19**). Par conséquent, chaque étape d'une chaîne de transformation, comprenant la cuisson, le mélange et l'ajout d'ingrédients, pourrait présenter un risque de contamination du produit alimentaire (**Afchain et al., 2008**). Le stockage à des températures réfrigérées peut aussi représenter un risque supplémentaire puisque les souches psychrotrophes du groupe *B. cereus* qui ont résisté aux traitements thermiques peuvent croître à basse température (**Afchain et al., 2008; Guinebrière et al., 2008**).

▪ **Typage des isolats**

Le typage moléculaire utilisant les techniques ERIC-PCR et PFGE a permis d'étudier la biodiversité de notre collection d'isolats du groupe *B. cereus* issus d'aliments tunisiens. L'application de ces deux techniques a permis de discriminer 143 et 99 profils sur un total de 174 souches testées par PFGE et ERIC-PCR, respectivement. La distribution des isolats dans les clusters n'est pas corrélée au type d'aliment dont ils sont issus et/ou au groupe phylogénétique. Ceci pourrait suggérer que la contamination des aliments par les bactéries du groupe *B. cereus* est due à d'autres sources telles que les matières premières et/ou les équipements de transformation (Altayar et Sutherland, 2006; Andersson et al., 1995). Nous avons montré que la majorité des clusters ayant des profils ERIC-PCR identiques contenaient au moins une souche présentant un profil PFGE différent. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés dans les études antérieures, notamment ceux d'une étude portant sur la caractérisation génétique de *Salmonella* (Fendri et al., 2013) et une autre analysant les bactéries du groupe *B. cereus* (Merzougui et al., 2013a) et soulignant le pouvoir discriminant élevé de la PFGE par comparaison à l'ERIC-PCR. Cependant, l'ERIC-PCR apparaît plus discriminante que la PFGE quand les isolats présentant différents profils ERIC-PCR montrent des profils PFGE identiques. Ces deux méthodes de typage fournissent ainsi chacune une mesure spécifique de la diversité génétique, comme l'indiquent Kidd et al. (2011). En effet, l'ERIC-PCR fournit un profil de fragments d'ADN sous la dépendance des localisations génomiques de séquences répétitives spécifiques, tandis que la PFGE révèle des polymorphismes dans les localisations génomiques de sites de restriction (*SmaI* pour notre étude). Ces deux méthodes sont complémentaires et permettent de mettre en exergue la diversité importante des isolats de la collection bactérienne issue de produits alimentaires tunisiens. Plusieurs études soulignent que la technique de MLST possède un pouvoir discriminant supérieur à celui de la PFGE (Ehling-Schulz et Messelhäusser, 2013; Harbottle et al., 2006; Revazishvili et al., 2004). Cependant, les variations génétiques, telles que des mutations dans les sept gènes analysés par MLST, ne sont pas suffisamment fréquentes pour engendrer une signature au niveau de discrimination suffisant (Ågren et al., 2017). En effet, il est possible que des substitutions, des insertions ou des délétions de nucléotides soient localisées en dehors des sept loci analysés (Noller et al., 2003). La PFGE et l'ERIC-PCR ont quant à elles l'avantage d'analyser, de manière aléatoire, le génome entier, alors même que la MLST n'analyse que les nucléotides des gènes cibles. De plus, le séquençage des sept gènes, pour chacune des souches, et l'analyse subséquente

des données, font de la MLST une technique laborieuse et coûteuse, ce qui limite son application, en dehors des études à haut débit (**Ehling-Schulz et Messelhäusser, 2013**). La mise en oeuvre de la MLST serait cependant d'un intérêt considérable pour une évaluation complémentaire de la diversité génétique au sein de notre collection bactérienne. La comparaison des séquences du core génome est la méthode vers laquelle de nombreux centres de référence (CNR) s'orientent pour différencier les isolats et effectuer un travail épidémiologique efficace. Cependant en raison de son coût élevé nous n'avons pas pu la mettre en oeuvre dans ce travail. (Aggelen et al., 2019).

▪ **Adhésion des isolats**

Dans la littérature, l'adhésion bactérienne aux surfaces inertes est décrite comme un phénomène rapide qui peut s'effectuer 1 à 2 h après l'inoculation (**Frank et Koffi, 1990; Vanhaecke et al., 1990**). Cependant, ce temps est variable selon les souches. Un temps moyen de 4 h est nécessaire à l'adhésion de *B. cereus* (**Peng et al., 2001**), de *Pseudomonas spp.*, de *Listeria monocytogenes* (**Fatemi et Frank, 1999**) et de *S. aureus* (**Pompermayer et Gaylarde, 2000**). Selon **Sommer et al., (1999)**, l'adhésion des bactéries, qu'elles soient à coloration de Gram positive ou négative, survient après 3 h d'incubation. Huit heures sont requises pour l'adhésion de *Shewanella putrefasciens* (**Bagge et al., 2001**).

La caractérisation des propriétés d'adhésion des isolats du groupe *B. cereus* à l'innox est un autre aspect de la caractérisation de notre collection. L'adhésion de ces bactéries à l'innox apparait comme un phénomène complexe essentiellement souche-dépendant. Le potentiel d'adhésion des souches pourrait être attribué à leur état physiologique. Ainsi, il est reconnu que dans le groupe *B. cereus*, les spores adhèrent en plus grand nombre que les cellules végétatives (**Peng et al., 2001; Faille et al., 2001**). C'est la tendance générale dans notre collection (73% des isolats étudiés). Les taux d'adhésion des spores varient également entre les isolats. Des valeurs maximales de l'ordre de 6 log de spores/cm² pour un inoculum de 6 log UFC/mL, révèlent une plus grande capacité d'adhésion chez certains isolats. La capacité des spores d'adhérer fermement aux surfaces des équipements des industries agroalimentaires est bien établie et attribuée à leur hydrophobicité élevée (**Faille et al., 2010; Peng et al., 2001; Shaheen et al., 2009; Simmonds et al., 2003**). De plus, l'importance des interactions acide-base de Lewis dans les phénomènes d'adhésion aux surfaces inertes est largement reconnue (**Bellon-Fontaine et al., 1996; Carpentier et Cerf, 1993; Chen et al., 2011; Van Oss, 1993**).

Ces interactions sont jugées de loin les plus puissantes, comparées aux forces de Van der Waals ou aux interactions électrostatiques (Van Oss, 2003). La forte adhésion des spores à l'inox peut poser des problèmes d'hygiène en IAA puisqu'elle est responsable de leur résistance aux procédures de nettoyage (Anderson et Ronner, 1998; Faille et al., 2002; 2010). En effet, Anderson et Ronner (1998) ont montré que les spores de *B. cereus* sont 33 à 48% plus adhérentes que les cellules germinatives. Ces dernières sont également plus facilement éliminées des surfaces que les spores dormantes.

Toutefois, certains isolats de notre collection montrent les mêmes capacités d'adhésion sous forme sporulée et végétative. Pour d'autres, l'adhésion des cellules végétatives est supérieure à celle des spores. D'après Peng et al. (2001), l'adhésion élevée des cellules végétatives pourrait être attribuée au fait qu'elles ont été mises en contact avec les coupons alors qu'elles avaient atteint la phase stationnaire. En effet, les bactéries du groupe *B. cereus* sous forme végétatives adhèrent en grand nombre lorsqu'elles sont en phase stationnaire car l'hydrophobicité des cellules végétatives de *B. cereus* augmente (Peng et al., 2001). De plus, l'adhérence élevée des cellules végétatives par rapport aux spores peut s'expliquer également par leur mobilité, en raison du rôle des flagelles dans les stades initiaux de l'adhésion des bactéries du groupe *B. cereus* (Houry et al., 2010) et de nombreuses autres bactéries telles que *P. aeruginosa* (Klausen et al., 2003) et *L. monocytogenes* (Lemon et al., 2007).

3. Conclusion

Au total, 687 échantillons d'origine alimentaire ont été collectés en Tunisie pour la recherche de bactéries du groupe *B. cereus*. Cent-quatre-vingt-onze échantillons (27,8% des échantillons) positifs ont ainsi donné lieu à la création d'une collection de 191 isolats présumptifs du groupe *B. cereus*. La plupart des échantillons positifs (77,5%) sont de qualité microbiologique satisfaisante et présentent un risque faible pour le consommateur. Les isolats présumptifs du groupe *B. cereus* ont fait l'objet d'une identification par un test PCR ciblant la séquence du gène *sspE*, spécifique du groupe. Ainsi, 174 isolats se sont avérés positifs. La recherche des signatures génétiques spécifiques des bactéries mésophiles vs psychrotrophes montre la coexistence des deux séquences signatures portées par le gène codant l'ARNr 16S chez la totalité des isolats. Ces derniers sont qualifiés d'« intermédiaires » car pouvant exprimer un génotype mésophile ou psychrotrophe selon les conditions climatiques auxquelles ils sont exposés. Le groupe phylogénétique III, reconnu comme étant généralement très cytotoxique, est le plus

fréquent dans notre collection, et particulièrement dans les échantillons cuits (aliments cuits, produits de pâtisserie et de volaille cuits). Par conséquent, il convient d'accorder une attention particulière aux conditions sanitaires et de température dans lesquelles les aliments sont préparés, cuits et commercialisés en Tunisie. En effet, de mauvaises conditions de manipulation, de stockage ou de nettoyage facilitent le développement bactérien et accentuent ainsi la contamination globale des produits alimentaires. Les souches ont été soumises à une étude de diversité en utilisant les méthodes de PFGE et d'ERIC-PCR. Un classement en profils génétiques a ainsi pu être effectué. L'analyse des profils PFGE et ERIC-PCR a permis de discriminer 143 et 99 clusters différents, respectivement. Le typage a démontré que la distribution des isolats dans les clusters n'est pas nécessairement corrélée au type d'aliment dont ils sont issus et/ou au groupe phylogénétique auquel ils appartiennent. Ceci pourrait suggérer que la contamination des aliments par les bactéries du groupe *B. cereus* est due à d'autres sources, telles que les matières premières et les équipements de transformation et de stockage. Le potentiel d'adhésion sur l'inox est influencé par l'état physiologique (spores ou cellules végétatives). Un taux d'adhésion supérieur pour les spores par rapport aux cellules végétatives concerne 73% des isolats de la collection. Le nombre de spores adhérees est compris entre 4 et 5,9 log UFC/cm², tandis que le nombre de cellules végétatives adhérees est compris entre 2,5 et 5,1 log UFC/cm². La forte adhésion des souches à l'inox a des implications dans l'hygiène des surfaces puisqu'elle est responsable de leur résistance aux procédures de nettoyage. L'ensemble de ces données souligne la nécessité d'inclure la recherche des bactéries du groupe *B. cereus* dans les programmes de sécurité sanitaire des aliments, ainsi que dans les laboratoires d'analyse microbiologique des aliments en Tunisie.

Isolation, identification, prevalence, and genetic diversity of *Bacillus cereus* group bacteria from different foodstuffs in Tunisia.

Maroua GDOURA-BEN AMOR, Mariam SIALA, Mariem ZAYANI, Noël GROSSET, Salma SMAOUI, Férièle MESSADI-AKROUT, Florence BARON, Sophie JAN, Michel GAUTIER and Radhouane GDOURA. (2018).

Frontiers in Microbiology. 9 : p44712. doi: 10.3389/fmicb.2018.00447

Impact factor 4,019

Chapitre 2

Evaluation des risques sanitaires causés par les bactéries du groupe *B. cereus*

ARTICLE SE RAPPORTANT AUX RESULTATS DE CE CHAPITRE

Maroua GDOURA-BEN AMOR, Sophie JAN, Florence BARON, Noël GROSSET, Antoine CULOT, Radhouane GDOURA, Michel GAUTIER and Clarisse TECHER. (2019). Toxigenic potential and antimicrobial susceptibility of *Bacillus cereus* group bacteria isolated from Tunisian foodstuffs. *BMC Microbiology*. August 2019 | Volume 19:196.

<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1571-y>

1. Résultats

1.1. Détection des gènes associés à la virulence

Afin de caractériser le potentiel de virulence des bactéries du groupe *B. cereus* d'origine alimentaire en Tunisie, 174 isolats de différents types d'aliments ont été analysés par PCR pour rechercher la présence de neuf gènes codant les toxines diarrhéiques (complexe *hblABCD*, complexe *nheABCD*, *bceT*, *cytK* et ses variantes) et d'un gène codant pour la toxine émétique (*ces*). Au moins un des gènes de chacun des complexes NHE et HBL a été mis en évidence, respectivement chez 100% et 59,2% de la collection. Les gènes mis en évidence sont, par ordre décroissant, *nheA* (98,9%), *nheC* (97,7%) et *nheB* (86,8%) contre *hblC* (54,6%), *hblD* (54,6%), *hblA* (29,9%) et *hblB* (14,9%), respectivement, pour les complexes NHE et HBL. L'ensemble des 3 gènes du complexe NHE a été détecté dans 84,5% (147/174) de la collection. La présence de deux gènes a été observée dans 14,4% (25/174) de la collection, tandis que 1,1% (2/174) de la collection ne contenait qu'un seul gène (**Tableau 21**). Les quatre gènes codant pour le complexe HBL ont été détectés dans 13,8% (24/174) de la collection ; trois gènes étaient présents dans 22,4% (39/174) de la collection ; 14,4% (25/174) étaient positifs pour deux gènes, 8,6% (15/174) possédaient un seul gène du complexe, tandis que 40,8% (71/174) ne possédaient aucun gène *hbl* (**Tableau 21**). La PCR discriminatoire entre les deux variantes du gène *cytK*, responsable de la production de la cytotoxine K, qui sont *cytK-1* et *cytK-2*, a révélé que le gène *cytK-1* n'est présent chez aucun isolat. Cependant, 37,9% (66/174) des isolats étaient positifs pour le gène *cytK-2*. De plus le gène codant pour l'entérotoxine T (*bceT*) et les gènes codant pour la toxine émétique (cluster *ces*) n'ont été mis en évidence que chez 88 (50,6%) et 7 isolats (4%), respectivement. Les différents gènes de virulence ont été détectés au sein de la collection, indépendamment de l'origine de l'échantillonnage des souches, à l'exception des gènes codant la toxine émétique qui n'ont été détectés que dans les souches isolées des échantillons de viande de volaille cuite, d'aliments cuits, de produits de pâtisserie et d'épices (**Tableau 21**).

Tableau 21: Distribution totale des gènes de virulence au sein de la collection de bactéries du groupe *B. cereus* (n= 174) provenant d'aliments collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015. Les pourcentages sont indiqués entre parenthèses pour chacun des aliments analysés.

Facteurs de virulence	No. (%) des souches hébergeant le(s) gene(s) cible(s)										
	Aliments cuits (n=42)	Produits de pâtisserie (n=37)	Produits céréaliers (n=23)	Viande de volaille cuite (n=18)	Epices (n=17)	Produits de la mer (n=11)	Produits en conserve (n=9)	Viande de volaille crue (n=8)	Légumes frais coupés (n=5)	Produits laitiers (n=4)	Total (n=174)
Gènes du complexe HBL											
hblC	1 (2,4)	4 (10,8)	1 (4,3)	1(5,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (4,0)
hblD	3 (7,1)	0 (0,0)	1(4,3)	0 (0,0)	1 (5,9)	1 (9,1)	0 (0,0)	2 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (4,6)
hblA+ hblC	1 (2,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,6)
hblC+ hblD	7 (16,7)	8 (21,6)	2 (8,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (9,1)	2 (22,2)	0 (0,0)	3 (60,0)	1 (25,0)	24 (13,8)
hblA+ hblC+ hblD	5 (11,9)	4(10,8)	2 (8,7)	3 (16,7)	7 (41,2)	4 (36,4)	0 (0,0)	1 (12,5)	1 (20,0)	0 (0,0)	27 (15,5)
hblB+ hblC+ hblD	2 (4,8)	3 (8,1)	1(4,3)	2 (11,1)	1 (5,9)	1 (9,1)	1 (11,1)	1 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	12 (6,9)
hblA+ hblB+ hblC+ hblD	6 (14,3)	8 (21,6)	5 (21,8)	2(11,1)	3 (17,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	24 (13,8)
Non détecté	17 (40,4)	10 (27,0)	11 (47,8)	10 (55,6)	5 (29,4)	4 (36,4)	6 (66,7)	4 (50,0)	1 (20,0)	3 (75,0)	71 (40,8)
Gènes du complexe NHE											
nheA	1 (2,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,6)
nheB	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,6)
nheA+ nheB	9 (21,4)	4(10,8)	1(4,3)	1(5,6)	1 (5,9)	2 (18,2)	0 (0,0)	3 (37,5)	0 (0,0)	1 (25,0)	22 (12,6)
nheA+ nheC	2 (4,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,1)
nheB+ nheC	1 (2,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,6)
nheA+ nheB+ nheC	29 (69,0)	33 (89,2)	22 (95,7)	17 (94,4)	15 (88,2)	9 (81,8)	9 (100,0)	5 (62,5)	5 (100,0)	3 (75,0)	147 (84,5)
Non détecté	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Autres Gènes											
cytK	13 (30,1)	15 (40,54)	9 (39,1)	6 (33,3)	9 (52,9)	8 (72,7)	3 (33,3)	1 (12,5)	1 (20,0)	1 (25,0)	66 (37,9)
bceT	17 (40,4)	20 (54,1)	14 (60,9)	9 (50,0)	10 (58,8)	10 (90,9)	2 (22,2)	5 (62,5)	1 (20,0)	0 (0,0)	88 (50,6)
Ces	2 (4,8)	1 (2,7)	0 (0,0)	3 (16,7)	1 (5,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (4,0)

1.2. Profils toxinogéniques des isolats du groupe *B. cereus*

La distribution des gènes de virulence a permis de répartir les 174 isolats du groupe *B. cereus* en 12 groupes (G1 à G12) (Tableau 22). Chaque groupe est caractérisé par un profil toxinogénique. Les profils se sont répartis en 4 profils entéro-hémolytiques et non hémolytiques associés ou non aux gènes *bceT* et *cytK-2*, un profil entéro-cytotoxique (G1 à G4), 4 profil entéro-non hémolytiques associés ou non aux gènes *bceT* et *cytK-2* (G5 à G8), un profil émétique, entéro-hémolytique et non-hémolytique (G9) et 3 profils émétiques et entéro-non- hémolytiques associés ou non aux gènes *bceT* et *cytK-2* (G10 à G12).

Tableau 22 : Groupes toxinogéniques spécifiques aux isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

Groupe	Genes détectés	Nombre d'isolats	% d'isolats dans chaque groupe
G1	Complexe HBL, complexe NHE, <i>bceT</i> , <i>cytK</i>	36(8+ 26 ^a + 1 ^b + 1 ^c)	20,7
G2	Complexe HBL, complexe NHE, <i>bceT</i>	29(9+ 15 ^a + 1 ^b + 4 ^c)	16,7
G3	Complexe HBL, complexe NHE, <i>cytK</i>	7(1+ 3 ^a + 3 ^c)	4,0
G4	Complexe HBL, complexe NHE	30(4+ 16 ^a + 10 ^c)	17,2
G5	Complexe NHE, <i>bceT</i> , <i>cytK</i>	8	4,6
G6	Complexe NHE, <i>bceT</i>	13(10+ 3 ^b)	7,5
G7	Complexe NHE, <i>cytK</i>	12(11+ 1 ^b)	6,9
G8	Complexe NHE	32(30+ 2 ^b)	18,4
G9	Complexe NHE, complexe HBL complex, <i>ces</i>	1 ^c	0,6
G10	Complexe NHE, <i>cytK</i> , <i>ces</i>	3	1,7
G11	Complexe NHE, <i>bceT</i> , <i>ces</i>	2	1,1
G12	Complexe NHE, <i>ces</i>	1	0,6

a : Absence d'au moins un gène du complexe HBL ; b : Absence d'au moins un gène du complexe NHE ;
c : Absence d'au moins un gène du complexe NHE & HBL

1.2.1. Profil entéro-hémolytique et non hémolytique associé ou non aux gènes *bceT* et *cytK-2*

D'après l'analyse des profils électrophorétiques, les 102 isolats possédant simultanément au moins un des gènes du complexe HBL et du complexe NHE associés ou non aux gènes *bceT* et *cytK-2* sont répartis en 4 groupes toxinogéniques (G1 à G4). Les 7 isolats du groupe G3 n'hébergent pas le gène de l'entérotoxine T alors que les 29 isolats du groupe G2 le possèdent. Les 30 isolats du groupe G4 n'hébergent pas les 2 gènes de l'entérotoxine T et de la cytotoxine K. Cependant, les 36 isolats du groupe G1 les hébergent.

1.2.2. Profil entéro-non hémolytique associé ou non aux gènes *bceT* et *cytK-2*

D'après l'analyse des profils électrophorétiques, 65 isolats possèdent au moins un gène du complexe NHE associés ou non aux gènes *bceT* et *cytK-2*, sans le complexe HBL. Ils sont répartis en 4 groupes toxigéniques (G5 à G8). Le groupe G5 est composé de 8 isolats possédant les trois gènes du complexes NHE et les gènes *bceT* et *cytK-2*. Treize isolats possèdent au moins un gène du complexe NHE associé au gène *bceT*, formant le groupe toxigénique G6. Aussi, les 12 isolats du groupe G7 possèdent au moins un gène du complexe NHE mais associé uniquement au gène *cytK-2*. Par contre, les 32 isolats du groupe G8 possèdent au moins un des trois gènes du complexe NHE, non associé aux gènes *bceT* et *cytK-2*.

1.2.3. Profil émétique, entéro-hémolytique et non-hémolytique

Le profil émétique, entéro-hémolytique et entéro-non-hémolytique (Groupe G9) ne concerne qu'un seul isolat hébergeant le gène *ces*, responsable de la production de la toxine émétique et au moins un gène des complexes HBL et NHE.

1.2.4. Profil émétique et entéro-non-hémolytique associé ou non aux gènes *bceT* et *cytK-2*

Les profils émétiques et entéro-non-hémolytiques associés ou non aux gènes *bceT* et *cytK-2* sont répartis en 3 groupes toxigéniques (G10 à G12). Les 3 isolats du groupe G10 possèdent les trois gènes du complexe NHE et les gènes *cytK-2* et *ces*. Tandis que les 2 isolats du groupe G11 possèdent les trois gènes du complexes NHE et les gènes *bceT* et *ces*. En outre, un seul isolat du groupe *B. cereus* possède les gènes du complexe NHE associés au gène *ces*, formant ainsi le groupe G12.

1.3. Etude du pouvoir cytotoxique des isolats du groupe *B. cereus* sur les cellules Caco-2

Chacun des 174 isolats a pu se développer dans le milieu optimum BHI-YE. La population bactérienne moyenne a atteint $8 \pm 0,3$ et $7 \pm 0,5$ log UFC/mL après 18 h et 5 j d'incubation à 30°C, respectivement. Le pourcentage de souches cytotoxiques (provoquant plus de 50% d'inhibition des cellules Caco-2) observé après 18 h d'incubation (70,7%) est le double de celui observé après 5 j d'incubation (35%) en BHI-YE à 30°C.

1.4. Évaluation de la relation entre l'origine et la cytotoxicité des souches

Un lien apparait clairement entre la cytotoxicité des souches et le type d'aliment dont elles sont issues (test F , $p < 0,05$). Contrairement aux souches isolées à partir d'épices, une dispersion significative de l'activité cytotoxique a été rapportée pour les souches isolées à partir de légumes frais coupés, de céréales ou de produits laitiers ($p < 0,05$). L'activité cytotoxique est comparable d'un isolat à l'autre lorsqu'ils proviennent de viandes de volaille cuites et crues, de produits en conserve, de produits de pâtisserie et d'aliments cuits ($p > 0,05$). Pour les souches isolées à partir de produits de la mer et d'épices, le niveau de cytotoxicité dépend significativement de la durée d'incubation de la culture bactérienne ($p = 0,0004$). Après 18 h d'incubation, une différence significative de l'activité cytotoxique est observée. Cependant, après 5 j d'incubation, la cytotoxicité est homogène ($p > 0,05$, $p = 0,09$).

1.5. Evaluation de la relation entre les profils toxinogéniques et la cytotoxicité des souches

L'implication de plusieurs facteurs de virulence connus pour intervenir dans la cytotoxicité des cellules Caco-2 a été évaluée. La présence des composantes du complexe HBL s'est avérée ne pas être liée à la cytotoxicité. En effet, parmi les isolats possédant ou non les quatre gènes du complexe HBL, certains sont cytotoxiques et d'autres non. Le pourcentage d'isolats cytotoxiques portant les quatre gènes est plus élevé après 18 h qu'après 5 j d'incubation. Parmi les 24 isolats possédant l'ensemble des déterminants génétiques du complexe HBL, 79,2% et 41,7% ont présenté une toxicité sur les cellules Caco-2 après 18 h et 5 j d'incubation, respectivement. Bien que 147 isolats possèdent les trois composantes du complexe NHE, seulement 68,7% et 36,7% d'entre eux se sont révélés cytotoxiques après 18 h et 5 j d'incubation, respectivement. De plus, parmi ceux qui hébergent un ou deux gènes du complexe NHE, les isolats cytotoxiques et non cytotoxiques ont été mis en évidence après 18 h et 5 j d'incubation.

Plusieurs combinaisons de déterminants génétiques des complexes NHE et HBL sont associées de façon significative (test t , $p < 0,05$) à l'activité cytotoxique des bactéries testées (**Tableau 23**). Le niveau de cytotoxicité est significativement supérieur (+ 12% et + 14% après 18 h et 5 j d'incubation, respectivement) avec les isolats présentant simultanément les gènes *hblC* et *nheC*. La présence des gènes *hblC* et *nheB* a une incidence significative positive sur la cytotoxicité (+ 27% et + 23% après 18 h et 5 j,

respectivement). Cependant, la présence du gène *nheB* et l'absence du gène *hblC* sont associées à une plus faible cytotoxicité après 5 j d'incubation (- 17%). La présence simultanée des gènes *hblB* et *nheA* est significativement corrélée à l'activité cytotoxique après 5 j d'incubation (+ 11%). La cytotoxicité du surnageant des cultures bactériennes, après 5 j d'incubation, diminue de 29% lorsque les souches hébergent le gène *hblB* et non pas le gène *nheA*. La possession simultanée des gènes *hblD* et *nheC* est inversement associée à la cytotoxicité. Elle est diminuée de 8% et de 14% après 18 h et 5 j d'incubation, respectivement.

Parmi les isolats qui hébergent le gène *cytK*, certains sont cytotoxiques et d'autres non après 18 h et 5 j d'incubation. Comme le montre le **Tableau 23**, une corrélation significative a été établie entre la cytotoxicité et la combinaison *cytK* : *hblD* ainsi qu'avec la combinaison *cytK* : *hblB* en l'absence du gène *nheC*, après 18 h d'incubation. Les deux combinaisons *cytK* : *nheC* et *cytK* : *hblC* sont inversement corrélées à l'activité cytotoxique après 18 h d'incubation.

Le gène *bceT* est présent dans les souches cytotoxiques et non cytotoxiques. La présence simultanée des gènes *bceT*, *nheC* et *hblB* est significativement associée à une activité cytotoxique plus faible après 18 h (- 17%) (**Tableau 23**). Cependant, lorsque le gène *bceT* est présent avec le gène *nheC* ou *hblD*, la cytotoxicité, après 18 h d'incubation, est diminuée de 12% et de 6%, respectivement. Après 18 h d'incubation, la cytotoxicité augmente de façon significative (18%) lorsque les isolats hébergent les gènes *bceT* et *hblB*. Lorsqu'ils possèdent le gène *hblB* mais pas le gène *bceT*, la cytotoxicité est significativement diminuée (- 16%) (**Tableau 23**). L'absence de *bceT* est associée à une activité cytotoxique plus élevée après 18 h (+ 9%) lorsque les isolats portent simultanément les gènes *nheC* et *hblB*, alors qu'elle est diminuée (- 17%) lorsque les souches possèdent simultanément les gènes *nheC*, *hblB*, *nheC* et *hblB*.

Après 5 j, la cytotoxicité est plus élevée lorsque les isolats possèdent simultanément les gènes *bceT* et *hblB* (+ 10%) et lorsqu'ils hébergent les gènes *bceT* et *nheC* mais ne présentent pas le gène *hblB* (+ 6%) (**Tableau 23**). Cependant, la cytotoxicité est plus faible lorsque les isolats hébergent simultanément *bceT* et *hblA* (- 7%).

Tous les isolats possédant le gène *ces* présentent une activité cytotoxique sur les cellules Caco-2 après 18 h d'incubation. Lorsque ce gène coexiste avec le gène *hblC*, la cytotoxicité est significativement plus faible (- 17%) (**Tableau 23**). De plus, aucune activité cytotoxique n'est détectée pour ces isolats après 5 j d'incubation.

Tableau 23: Analyse statistique des associations entre la présence ou l'absence de facteurs de virulence et la cytotoxicité sur cellules Caco-2 des isolats de la collection de bactéries du groupe *B. cereus* provenant d'aliments tunisiens.

Association significative entre la cytotoxicité et les facteurs de virulence	Test F				Association significative entre La cytotoxicité et la Présence ¹ / absence ⁰ des facteurs de virulence	Test T			
	Somme Sq		Valeur p			Estimation		Valeur p	
	Cytotoxicité après		Cytotoxicité après			Cytotoxicité éaprès		Cytotoxicité après	
	18h	5j	18h	5j		18h	5j	18h	5j
<i>hblC:hblD</i>	5562	20994	0,0032 **	4,57E-08 ***	<i>hblC¹:hblD¹</i> <i>hblC⁰:hblD¹</i>	ND 14	ND	ND	4,75E-08 *** ND
<i>hblC:nheB</i>	13568	10441	1,58E-07 ***	0,0005 ***	<i>hblC¹:nheB¹</i> <i>hblC⁰:nheB¹</i>	27 24	1,58E-07***	ND	0,0073 ** 0,0058 **
<i>hblC:nheC</i>	6497	11695	0,0002 ***	4,08E-05 ***	<i>hblC¹:nheC¹</i>	12 14	0,0003 ***	4,08E-05 ***	4,08E-05 ***
<i>hblD:nheC</i>	3675	11106	0,0058 **	6,33E-05 ***	<i>hblD¹:nheC¹</i>	-8 -14	0,0058 **	6,33E-05 ***	6,33E-05 ***
<i>bceT:hblB</i>	23036	8048	1,12E-10 ***	0,0006 ***	<i>bceT¹:hblB¹</i> <i>bceT⁰:hblB¹</i>	18 10	0,0002 ***	0,0006 ***	0,0006 *** ND
<i>nheC:bceT:hblB</i>	11787	6560	6,14E-06 ***	0,0085 **	<i>nheC¹:bceT¹:hblB¹</i> <i>nheC¹:bceT⁰:hblB¹</i> <i>nheC¹:bceT¹:hblB⁰</i>	-17 ND	0,0004 ***	ND	ND ND 0,012 *
<i>bceT:hblD</i>	11867	ND	8,99E-07 ***	ND	<i>bceT¹:hblD¹</i>	-6 ND	8,99E-07 ***	ND	ND
<i>bceT:nheC</i>	4733	ND	0,0017 **	ND	<i>bceT¹:nheC¹</i>	-12 ND	0,0017 **	ND	ND
<i>ces:hblC</i>	9828	ND	7,46E-06 ***	ND	<i>ces¹:hblC¹</i>	-17 ND	7,46E-06 ***	ND	ND
<i>cytK:hblD</i>	19045	ND	6,51E-10 ***	ND	<i>cytK¹:hblD¹</i>	14 ND	6,51E-10 ***	ND	ND
<i>cytK:nheC</i>	6617	ND	0,0002 ***	ND	<i>cytK¹:nheC¹</i>	-12 ND	0,0002 ***	ND	ND
<i>cytK:nheC:hblB</i>	4501	ND	0,0095 **	ND	<i>cytK¹:nheC⁰:hblB¹</i>	12 ND	0,011 *	ND	ND
<i>hblC:cytK</i>	15874	ND	1,53E-08 ***	ND	<i>hblC¹:cytK¹</i>	-12 ND	1,53E-08 ***	ND	ND
<i>hblD:hblA</i>	2417	ND	0,025 *	ND	<i>hblD¹:hblA¹</i>	-8 ND	0,025 *	ND	ND
<i>nheB:nheC</i>	6500	ND	0,0012 **	ND	<i>nheB⁰:nheC¹</i> <i>nheB¹:nheC¹</i>	27 ND	0,01 *	ND	ND ND
<i>bceT:hblA</i>	ND	8530	ND	0,002 **	<i>bceT¹:hblA¹</i>	ND -7	ND	0,0008 ***	0,0008 ***
<i>hblC:hblB</i>	ND	5000	ND	0,007 **	<i>hblC¹:hblB¹</i>	ND -11	ND	0,007 **	0,007 **
<i>nheA:hblB</i>	ND	8433	ND	0,002 **	<i>nheA⁰:hblB¹</i> <i>nheA¹:hblB¹</i>	ND -29	ND	0,047 *	0,047 * 0,025 *
<i>cytK:hblA</i>	3400	ND	0,029 *	ND	<i>cytK¹:hblA¹</i> <i>cytK⁰:hblA¹</i>	NS ND	>0,05	ND	ND ND
<i>cytK:nheC:hblA</i>	3165	ND	0,0375 *	ND	<i>cytK¹:nheC¹:hblA¹</i> <i>cytK⁰:nheC¹:hblA¹</i>	NS ND	>0,05	ND	ND ND

0 : absence ; 1 : présence ; ND : non déterminé ; NS : non significatif (valeur $p \geq 0.05$) ; * : significatif (valeur $p : 0.01$ à 0.05) ; ** : très significatif (valeur $p : 0.001$ à 0.01) ; *** : très significatif (valeur $p < 0.001$).

1.6. Étude de la sensibilité des isolats du groupe *B. cereus* aux antibiotiques

Les 174 isolats du groupe *B. cereus* ont subi le test de sensibilité aux antibiotiques. Tous ces isolats sont sensibles à la rifampicine (100%), au chloramphénicol (100%), à la ciprofloxacine (100%) et à la gentamycine (100%). Un nombre important d'isolats manifeste également une sensibilité élevée à la streptomycine (98,9%), à la kanamycine (96,6%), à l'érythromycine (95,4%), à la vancomycine (92%) et à la tétracycline (85,1%). Une résistance vis-à-vis de l'ampicilline (90,8%) et de la novobiocine a été observée pour 88% des isolats. Les résultats obtenus sont reportés dans le **Tableau 24**.

Tableau 24: Sensibilité aux antibiotiques des isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

Antibiotique	Conc. (µg/disc)	Nb de souches au phénotype (%)		
		Résistant	Intermédiaire	Sensible
Rifampicine	5	0	0	174 (100)
Erythromycine	15	2 (1,2)	6 (3,4)	166 (95,4)
Chloramphénicol	30	0	0	174 (100)
Novobiocine	30	153 (88)	13 (7,5)	8 (4,5)
Ampicilline	10	158 (90,8)	11 (6,3)	5 (2,9)
Ciprofloxacine	5	0	0	174 (100)
Streptomycine	10	2 (1,1)	0	172 (98,9)
Gentamycine	10	0	0	174 (100)
Vancomycine	30	7 (4)	7 (4)	160 (92)
Kanamycine	30	0	6 (3,4)	168 (96,6)
Tétracycline	30	10 (5,7)	16 (9,2)	148 (85,1)

2. Discussion

Le risque sanitaire causé par les bactéries du groupe *B. cereus* a été évalué en examinant la présence de facteurs de virulence, l'activité cytotoxique et l'antibiorésistance. Les gènes mis en évidence chez les isolats du groupe *B. cereus* sont, par ordre décroissant d'occurrence, les gènes *nheA* (98,9%), *nheC* (97,7%) et *nheB* (86,8%) contre *hblC* (54,6%), *hblD* (54,6%), *hblA* (29,9%) et *hblB* (14,9%), respectivement pour les complexes NHE et HBL. La forte prévalence des déterminants génétiques du complexe NHE par rapport à ceux du complexe HBL a déjà été rapportée dans d'autres études (Castiaux et al., 2016; Tewari et al., 2015; Wehrle et al., 2009; Zhou et al., 2010). La recherche des gènes de virulence par PCR a montré qu'au moins un des gènes de chacun des complexes NHE et HBL est mis en évidence chez respectivement 100% et 59,2% des

174 isolats. Ces résultats sont similaires à ceux d'autres auteurs, qui ont rapporté que les souches du groupe *B. cereus* hébergeaient au moins un des gènes des complexes NHE et HBL (Aragon-Alegro et al., 2008; Guinebretiere et al., 2002; Hansen et Hendriksen, 2001; Rivera et al., 2000; Tewari et al., 2015). La présence d'au moins un gène du complexe HBL ou NHE indique la présence de chacun des opérons *nhe* et *hbl* (Granum, 2007). L'incapacité de détecter tous les gènes de l'opéron peut s'expliquer par l'existence d'un polymorphisme dans la séquence des gènes des complexes HBL et NHE du groupe *B. cereus*, plutôt que par l'absence de ces gènes (Guinebretiere et al., 2002; Hansen et Hendriksen, 2001; Mantynen et Lindstrom, 1998).

Les entérotoxines NHE et HBL sont considérées comme étant les principaux facteurs de virulence du groupe *B. cereus* liés à une intoxication alimentaire (Stenfors Arnesen et al., 2008). L'étude de Banerjee et al. (2011) a rapporté que les souches du groupe *B. cereus* impliquées dans les diarrhées humaines, productrices de l'hémolysine BL ou de l'entérotoxine non hémolytique, possèdent au moins deux gènes de chacun des complexes HBL et NHE. En outre, diverses combinaisons de gènes de chaque complexe sont associées à un certain degré d'activité biologique, mais l'activité maximale est obtenue lorsque tous les composants sont présents (Stenfors Arnesen et al., 2008; Banerjee et al., 2011). Aucun des 174 isolats du groupe *B. cereus* n'héberge le gène *cytK-1*. En effet, le gène *cytK-1*, une des variantes du gène *cytK*, est rare et les isolats du groupe *B. cereus* qui hébergent ce gène appartiennent à un groupe phylogénétique cytotoxique distinct comprenant des souches de *B. cytotoxicus* (Guinebretiere et al., 2010). Le deuxième variant du gène *cytK*, désigné *cytK-2* est mis en évidence dans 37,9% de la collection. Bien que le gène *cytK-2* ne soit pas aussi cytotoxique que le gène *cytK-1*, sa capacité à provoquer une intoxication alimentaire ne doit pas être sous-estimée (Fagerlund et al., 2004). Plusieurs études ont rapporté une prévalence similaire du gène *cytK-2* dans les souches du groupe *B. cereus* isolées d'aliments et de légumes cuits réfrigérés (Guinebretière et al., 2002), de produits carnés (Tewari et al., 2015) et de produits céréaliers (Lee et al., 2017). Cependant, d'autres études ont rapporté une prévalence plus importante du gène *cytK-2* (jusqu'à 77%) dans les souches du groupe *B. cereus* isolées de produits céréaliers (Chon et al., 2012), de plats cuisinés, d'épices, de produits laitiers, d'amidons et de farines (Aragon-Alegro et al., 2008). Le gène *bceT* est mis en évidence dans 50,6% de notre collection. Ce résultat est en phase avec ceux de Bonerba et al. (2010) qui ont démontré que 52% des isolats provenant de pâtisseries, d'échantillons de riz, de farine de pommes de terre, de mozzarella et de farine de viande possèdent le gène

bceT. Selon **Guinebretière et al. (2002)**, le gène *bceT* semble être aussi largement répandu dans les souches isolées à partir d'aliments réfrigérés cuits et de légumes (71%). Cependant, **Yang et al. (2005)** ont mis en évidence une faible occurrence de ce gène dans les souches du groupe *B. cereus* d'origine alimentaire (11,8%). L'occurrence des facteurs de virulence varie selon l'étude. Cette variabilité peut être attribuée aux différences géographiques et dans les types de matrices alimentaires. Les amorces utilisées pour les tests PCR peuvent aussi varier d'une étude à l'autre. Parmi tous les isolats testés dans cette étude, seulement sept (4%) hébergent le gène *ces*. Ces souches proviennent d'échantillons de viande de volaille cuite, de produits de pâtisserie, d'aliments cuits et d'épices. L'intoxication émétique est souvent associée aux féculents comme le riz, les nouilles, les pâtes et la purée de pommes de terre (**Agata et al., 2002; Dierick et al., 2005; Naranjo et al., 2011**). **López et al. (2015)** et **Messelhäusser et al. (2014)** ont montré la présence de souches émétiques du groupe *B. cereus* dans des échantillons de poulet cuit et d'autres aliments comme les soupes, les sauces et les repas composés. Cependant, aucune des souches du groupe *B. cereus* isolées à partir d'épices n'héberge le gène *ces* dans les études de **Hariram et Labbé (2015)** et de **Fogele et al. (2018)**. La faible occurrence des souches émétiques confirme que la production du céréulide est un caractère rare dans le groupe *B. cereus* (**Aragon-Alegro et al., 2008**).

L'analyse de distribution des gènes de virulence a mis en évidence une diversité des isolats du groupe *B. cereus* quant à leur pouvoir toxigène. Ces derniers sont répartis en 12 groupes (G1 à G12) (**Tableau 22**). Chaque groupe est caractérisé par un profil toxigénique.

La diversité toxigénique observée au sein de la collection est plus associée au polymorphisme de séquence qu'à l'absence de certains gènes des complexes HBL et/ou NHE. En effet, certains isolats contiennent tous les gènes des complexes NHE et HBL, d'autres contiennent soit un ou deux gènes de ces complexes, soit uniquement les gènes du complexe NHE ou HBL. Tous les gènes requis pour la production de l'hémolysine BL (HBL) et de l'entérotoxine non hémolytique (NHE) sont présents chez respectivement 13,8% et 84,5% des 174 isolats. Au total, 12,6% des isolats hébergent simultanément toutes les composantes du complexe HBL et NHE. Certaines études ont rapporté des prévalences élevées d'isolats ayant des caractéristiques similaires (**Samapundo et al., 2011b ; Rahimi et al., 2013**). Ainsi, les isolats possédant tous les gènes requis pour la production de chacune des entérotoxines HBL et NHE sont susceptibles de produire une hémolysine et une non-hémolysine fonctionnelle. Parmi les isolats du groupe *B. cereus*

hébergeant le gène *ces*, différents groupes toxigènes se distinguent (G9 à G12). Un isolat appartenant au groupe G12 possède le gène *ces* et les gènes du complexe NHE mais pas ceux du complexe HBL. Le profil toxigène de cet isolat concorde avec celui présenté dans les études de **Ehling-Schulz et al. (2005)**, de **Lee et al. (2017)** et de **Yang et al. (2017)**, où une absence de corrélation a été observée entre la présence du gène *ces* et celle du complexe HBL, ce dernier étant commun dans les souches non émétiques. Cependant, l'isolat appartenant au groupe G9 possède le gène *ces* ainsi que les gènes des complexes NHE et HBL. Ce résultat est en accord avec les résultats des études précédentes qui ont détecté des souches émétiques portant à la fois gène *ces* et les gènes du complexe HBL (**Kim et al., 2010; Rahmati et Labbe, 2008**). En plus du complexe NHE et du gène *ces*, les isolats appartenant aux groupes G10 et G11 possèdent *cytK* et *bceT*, respectivement. De même, des études antérieures (**Carlin et al., 2006; Yang et al., 2017**) ont rapporté que les souches émétiques contenaient les gènes *cytK* ou *bceT*. Le syndrome diarrhéique est lié à l'entérotoxine non hémolytique (NHE), à l'entérotoxine hémolytique BL (HBL) et à la cytotoxine K, alors que le vomissement est provoqué par l'action du céréulide (**Ehling-Schulz et al., 2006**). Par conséquent, les souches émétiques du groupe *B. cereus* contenant divers gènes d'entérotoxines, tels que ceux des complexes NHE, HBL et *cytK*, pourraient avoir le potentiel de provoquer simultanément une intoxication alimentaire diarrhéique et émétique. Les surnageants des cultures de 70,7% des isolats de la collection, après 18 h d'incubation à 30°C, présentent une activité cytotoxique sur les cellules Caco-2. Cependant, la cytotoxicité des surnageants des cultures bactériennes âgées de 5 j est plus faible qu'à 18 h. Seulement 35% des souches s'avèrent maintenir leur cytotoxicité après 5 j. Ce résultat est probablement dû à la mort des cellules (**Jan et al., 2011**) et/ou de la dégradation des toxines (**Baron et al., 2007**). En effet, une diminution de 1 log UFC/mL de la population bactérienne a été observée en allant de 18 h à 5 j d'incubation à 30 °C.

Dans notre collection, le pourcentage d'isolats cytotoxiques est plus élevé que ceux rapportés par **Choma et al. (2000); Jan et al. (2011); Stenfors et al. (2002)** et **Techer et al. (2014)**. Cependant, la comparaison avec les résultats obtenus par d'autres auteurs est difficile en raison de la grande diversité des méthodes utilisées pour tester la cytotoxicité (différents types cellulaires, temps et températures d'incubation, etc.) et de la variété des aliments testés (lait, légumes ou collections de laboratoire). L'activité cytotoxique de CytK, NHE et HBL a été prouvée *in vitro* dans des études antérieures (**Dietrich et al., 1999, 2005; Lund et al., 2000; Moravek et al., 2006; Prüss et al., 1999**). L'entérotoxine

T ne présentant aucune cytotoxicité ne peut probablement pas contribuer à une intoxication alimentaire (**Choma et Granum, 2002**). Plusieurs études ont rapporté qu'aucun des facteurs de virulence n'était capable, individuellement ou en combinaison, d'expliquer complètement le potentiel cytotoxique des bactéries du groupe *B. cereus* (**Castiaux et al., 2016; Dietrich et al., 2005; Jeßberger et al., 2015; Miller et al., 2018**). Par contre, notre étude a confirmé que différentes combinaisons de déterminants génétiques des entérotoxines sont associées de façon significative au potentiel cytotoxique des bactéries. Par conséquent, l'action combinée et possiblement synergique de toxines multiples peut probablement expliquer le syndrome diarrhéique lié aux bactéries du groupe *B. cereus*. La détection par PCR des gènes *hbl*, *nhe* et *cytK* est utilisée comme méthode d'identification des isolats entéro-toxinogènes du groupe *B. cereus* (**Granum et al., 1999; Granum, 2001; Lund et al., 2000**). Les isolats qui possèdent tous les gènes du complexe HBL, NHE, *bceT* ou *cytK*, sont à la fois dans la catégorie des souches cytotoxiques et dans celle des souches non cytotoxiques. Ainsi, la présence d'un gène de virulence ne garantit pas la production et la sécrétion de la toxine correspondante (**Gilois et al., 2007**). Plusieurs études ont rapporté que l'importance des entérotoxines est déterminée par leurs niveaux d'expression et leurs combinaisons, qui sont caractéristiques de la souche. Par exemple, la suppression de l'opéron *hbl* ou du gène *cytK* dans la souche 407 Cry de *B. thuringiensis* n'a pas affecté sa cytotoxicité (**Ramarao et Lereclus, 2006**), tandis que l'inactivation de l'opéron *hbl* dans la souche *B. cereus* ATCC 14579 a réduit son activité cytotoxique et hémolytique (**Lindbäck et al., 1999**). Après suppression de l'expression de HBL, la souche 407 de *B. thuringiensis* produit encore NHE et CytK, tandis que la souche *B. cereus* ATCC 14579 ne peut compter que sur sa faible expression de NHE. En outre, l'expression des gènes de virulence n'est pas seulement influencée par les caractéristiques génétiques de la souche, mais aussi par des paramètres environnementaux, tels que le type d'aliment, le pH et la température. De plus, **Gilois et al. (2007)** ont démontré que certaines toxines, comme CytK, sont instables et ne persistent pas plus que deux heures dans les surnageants d'une culture du groupe *B. cereus*. Par conséquent, d'autres études devraient être menées pour évaluer l'expression ainsi que la stabilité des toxines après sécrétion.

Notre étude a montré que les les isolats du groupe *B. cereus* présentaient divers degrés de sensibilité aux agents antimicrobiens testés. La variation entre les pourcentages de sensibilité peut être attribuée à des différences entre les antibiotiques utilisés, qu'il s'agisse de leur origine géographique, de leur origine alimentaire (type d'aliment), du

transfert de gènes de résistance et/ou de leur propagation dans l'environnement (**Agwa et al., 2012**). La majorité des isolats étudiés sont résistants à l'ampicilline, ce qui concorde avec plusieurs études antérieures montrant une résistance élevée du groupe *B. cereus* aux antibiotiques de la famille des β -lactamines (**Andrews et Wise, 2002; Lee et al., 2012; Park et al., 2009**). Cette résistance résulte de la production de la β -lactamase, enzyme impliquée dans la dégradation de l'antibiotique (**Park et al., 2009**). La résistance des souches du groupe *B. cereus* à la novobiocine est en accord avec les résultats de l'étude de **Aklilu et al. (2016)**. Pour la tétracycline, 85,1% et 5,7% des souches y sont sensibles et résistantes, respectivement. Le reste des isolats (9,2%) a manifesté une résistance intermédiaire vis-à-vis de cet antibiotique. La sensibilité à la tétracycline pour la plupart des souches a été citée par **Arslan et al. (2014)** qui ont rapporté, pour une collection de 29 souches du groupe *B. cereus*, une sensibilité de 89,7% des souches à la tétracycline. A l'inverse, **Ankolekar et al. (2009)** ont trouvé une résistance à la tétracycline dans 98% des souches testées. La résistance à la tétracycline serait due à un transfert de gènes. De plus, l'oxytétracycline, qui est de la même famille que la tétracycline, est très utilisée dans les élevages. Ces antibiotiques auraient les mêmes mécanismes de résistance, ce qui pourrait justifier en partie la résistance des isolats à la tétracycline. Les isolats de notre collection sont généralement sensibles à la rifampicine, au chloramphenicol, à la ciprofloxacine, à la gentamicine, à la streptomycine, à la kanamycine, à l'érythromycine, et à la vancomycine. Ces résultats concordent avec d'autres études antérieures (**Andrews et Wise, 2002; Logan et Turnbull, 2003; Chaves et al., 2011 ; Chon et al., 2012**). Cependant, divers auteurs, dont **Roy et al. (2007)** et **Merzougui et al. (2014)**, ont montré que les bactéries du groupe *B. cereus* sont multi-résistantes. L'évaluation de la sensibilité antimicrobienne des bactéries du groupe *B. cereus* à divers antibiotiques permet un meilleur contrôle de ces bactéries lorsqu'elles sont impliquées dans des maladies d'origine alimentaire et donc, une meilleure protection de la santé humaine.

3. Conclusion

Les isolats du groupe *B. cereus* ont fait l'objet d'une évaluation de leur pouvoir pathogène (présence de gènes de virulence, activité cytotoxique sur cellules Caco-2 et résistance aux antibiotiques). Les résultats ont montré que les facteurs de virulence potentiels, responsables du syndrome diarrhéique, sont distribués au sein des isolats du groupe *B. cereus*. Cette distribution a permis de classer les isolats en douze groupes toxigènes. Les isolats sont multi-toxinogènes, hébergent au moins un des gènes de chacun des

complexes NHE et HBL associé ou non aux gènes *bceT*, *cytK-2* et *ces*. Après incubation en milieu BHI-YE à 30°C, 70,7% et 35% des souches se sont avérées cytotoxiques (provoquant plus de 50% d'inhibition des cellules Caco-2) après 18 h et 5 j, respectivement. Un lien apparaît clairement entre la cytotoxicité des souches et le type d'aliment dont elles sont issues. Différents facteurs de virulence ou combinaisons de ces facteurs sont significativement associés au potentiel cytotoxique des bactéries. La majorité des isolats s'est montrée sensible à de nombreux agents antimicrobiens mais présente une résistance à l'ampicilline et à la novobiocine. L'ensemble de ces données souligne l'importance de contrôler le risque sanitaire associé à la présence de ces bactéries dans les aliments tunisiens. Cependant, le nombre de bactéries consommées, ainsi que la quantité de toxines produite par un isolat donné, déterminera le résultat.

Toxigenic potential and antimicrobial susceptibility of *Bacillus cereus* group bacteria isolated from Tunisian foodstuffs.

Maroua GDOURA-BEN AMOR, Sophie JAN, Florence BARON, Noël GROSSET, Antoine CULOT, Radhouane GDOURA, Michel GAUTIER and Clarisse TECHER. (2019).

BMC Microbiology. 19:196. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1571-y>

Impact factor 3,287

Chapitre 3

**Isolement, identification et
caractérisation des bactériophages
infectant les bactéries du groupe *B.*
*cereus***

1. Résultats

1.1. Isolement et évaluation du spectre d'hôte des bactériophages isolés

Au total, 62 isolats phagiques infectant le groupe *B. cereus* ont été isolés après enrichissement de quatre pools d'échantillons différents (P1- P4) prélevés au niveau de la station expérimentale de Saint Symphorien (P1et P2) et la station d'épuration de Cleunay (P3 et P4). L'enrichissement des 4 pools P1, P2, P3 et P4 a permis d'amplifier 16, 15, 19 et 12 bactériophages infectant le groupe *B. cereus* (**Tableau 25**). Afin de sélectionner les phages à large spectre d'hôte, des analyses des spectres lytiques de ces 62 bactériophages ont été réalisées contre les 174 isolats du groupe *B. cereus* de notre collection. L'efficacité lytique de chaque bactériophage sur la souche testée a été confirmée par la formation de plages de lyse. Ces dernières ont été classées comme claires, modérément claires et troubles.

Sept phages infectant des isolats du groupe *B. cereus* (Ø1BC478, Ø1BC3990, Ø2BC4663, Ø3BC4663, Ø3BC4663, Ø4BC4663(1), Ø4BC4663(2) et Ø1BC4663) ont été sélectionnés pour avoir produit des plages de lyse claires contre un nombre maximal d'isolats du groupe *B. cereus*. Les phages sélectionnés ont montré une efficacité lytique allant de 8,6% à 13,2% (**Tableau 26**).

Tableau 25 : Détails de l'isolement des bactériophages infectant les isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments tunisiens collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

Pool d'échantillons	Nombre d'isolats phagiques obtenus	Nom des phages isolés
P1	16	Ø1BC13, Ø1BC14, Ø1BC18, Ø1BC27, Ø1BC28, Ø1BC396, Ø1BC478, Ø1BC499, Ø1BC2893, Ø1BC2976, Ø1BC3296, Ø1BC3940, Ø1BC3990, Ø1BC4663, Ø1BC4785 et Ø1BC4851
P2	15	Ø2BC12, Ø2BC13, Ø2BC14, Ø2BC27, Ø2BC28, Ø2BC396, Ø2BC2893, Ø2BC2976, Ø2BC3296, Ø2BC3990, Ø2BC4663, Ø2BC4785, Ø2BC4851, Ø2BC4855 et Ø2BC5659
P3	19	Ø3BC13, Ø3BC14, Ø3BC18, Ø3BC24, Ø3BC27, Ø3BC396, Ø3BC478, Ø3BC2893, Ø3BC3296, Ø3BC3940, Ø3BC3990, Ø3BC4160, Ø3BC4165, Ø3BC4663, Ø3BC4785, Ø3BC4851, Ø3BC4855, Ø3BC5659 et Ø3BCE10
P4	12	Ø4BC13, Ø4BC24, Ø4BC27, Ø4BC396, Ø4BC478, Ø4BC2893, Ø4BC3990, Ø4BC4663(1), Ø4BC4663(2), Ø4BC4785, Ø4BC4851 et Ø4BCE10

- P1, P2 : 2 pools d'échantillons prélevés de la station expérimentale de Saint Symphorien
 - ✓ P1 comprend 15 échantillons d'effluents d'élevage (bassins de décantation (7), effluents de porcs (5) et effluents de volailles (3)), 6 échantillons de déchets fécaux et 4 échantillons de sol.
 - ✓ P2 contient 8 échantillons d'effluents d'élevage (effluents de lapins (3) et bassins de décantation (5)), 7 échantillons de lisier, 5 échantillons de déchets fécaux et 5 échantillons d'eaux de lavage
- P3, P4 : 2 pools d'échantillons des eaux usées non traitées et traitées, respectivement prélevés de la station d'épuration de Cleunay.

Tableau 26 : Sélection de bactériophages infectant les isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments tunisiens collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015, sur la base de leur spectre d'hôtes et de leur efficacité lytique. Cette dernière se traduit par un pourcentage d'isolats lysés (le pourcentage est calculé à partir de l'infection par les 174 isolats du groupe *B. cereus*).

Bactériophages isolés	efficacité de lyse (% d'isolats lysés)
Ø1BC4663	8,6
Ø4BC4663(1)	9,7
Ø4BC4663(2)	10,3
Ø2BC4663	10,3
Ø3BC4663	12,6
Ø1BC478	13,2
Ø1BC3990	13,2

1.2. Caractérisation des bactériophages

1.2.1. Caractérisation morphologique

Les 7 bactériophages sélectionnés ont été examinés au microscope électronique à transmission (MET) (**Figure 14**). Sur la base de leurs caractéristiques morphologiques, tous les phages ont été considérés comme appartenant à la famille des *Siphoviridae* de *Caudovirales* (**Ackermann, 2003**) parce qu'ils présentaient une tête icosaédrique typique et une longue queue flexible et non contractile. Les dimensions et les caractéristiques des bactériophages isolés sont données dans le **Tableau 27**. Parmi les phages isolés, certains présentent des têtes claires tandis que d'autres, des têtes sombres. Les premières correspondent à une perte de l'acide nucléique (**Giuseppe et al., 2018 ; Lee et al., 2011**).

Tableau 27: Caractéristiques morphologiques révélées par observation au MET des phages infectant les isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments tunisiens collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

Phages	Caractéristiques	Longueur totale (nm)	Diamètre de la tête (nm)	Famille
Ø1BC478	Tête icosaédrique, queue non contractile	330,5	75,0	<i>Siphoviridae</i>
Ø1BC3990	Tête icosaédrique, queue non contractile	411,4	125,5	<i>Siphoviridae</i>
Ø2BC4663	Tête icosaédrique, queue non contractile	340,0	113,3	<i>Siphoviridae</i>
Ø3BC4663	Tête icosaédrique, queue non contractile	355,6	86,4	<i>Siphoviridae</i>
Ø4BC4663(1)	Tête icosaédrique, queue non contractile	200,3	87,5	<i>Siphoviridae</i>
Ø4BC4663(2)	Tête icosaédrique, queue non contractile	337,7	112,0	<i>Siphoviridae</i>
Ø1BC4663	Tête icosaédrique, queue non contractile	314,2	97,61	<i>Siphoviridae</i>

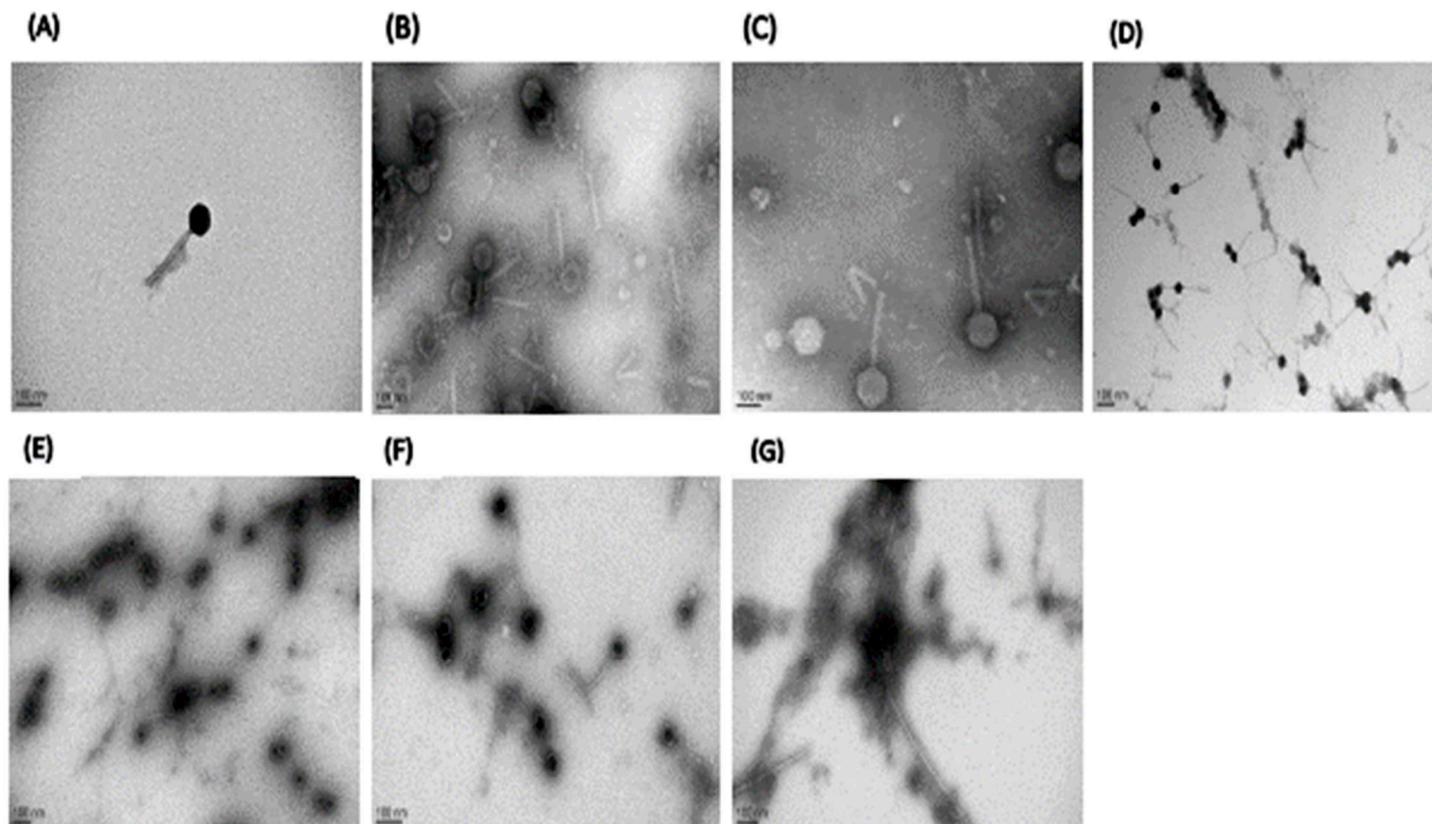


Figure 14: A-G : Micrographies de MET montrant les bactériophages sélectionnés infectant les isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments tunisiens collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015. La coloration a été réalisée à l'acétate d'uranyle aqueux à 2%.

(A) Ø1BC478 ; (B) Ø1BC3990 ; (C) Ø2BC4663 ; (D) Ø3BC4663 ; (E) Ø4BC4663(1) ; (F) Ø4BC4663(2) et (G) Ø1BC4663. Le grossissement est de 100 000x (B, D et F), 120 000x (C et G) et 150 000x (A et E). La barre d'échelle indique 100 nm.

1.2.2. Étude des profils protéiques

Une autre étape de caractérisation des bactériophages est l'analyse des protéines structurales, par la réalisation d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) coloré au bleu de coomassie (**Figure 15**). Un profil similaire a été observé pour les phages Ø2BC4663 (piste 4) et Ø4BC4663(2) (piste 9) avec quatre bandes protéiques prédominantes, correspondant à environ 220, 180, 39 et 28 kDa. Pour les phages Ø1BC3990, Ø3BC4663, Ø4BC4663(1), Ø1BC4663, deux bandes protéiques majeures ont été mises en évidence, de 39 et 32 kDa pour Ø1BC3990 (piste 3) ; 39 et 28 kDa pour Ø3BC4663 (piste 6) ; 39 et 31 kDa pour Ø4BC4663(1) (piste 7) et 42 et 31 kDa pour

Ø1BC4663 (piste 11). Pour le phage Ø1BC478 (piste 2) quatre bandes protéiques majeures sont apparues à 120, 50, 39 et 28 kDa.

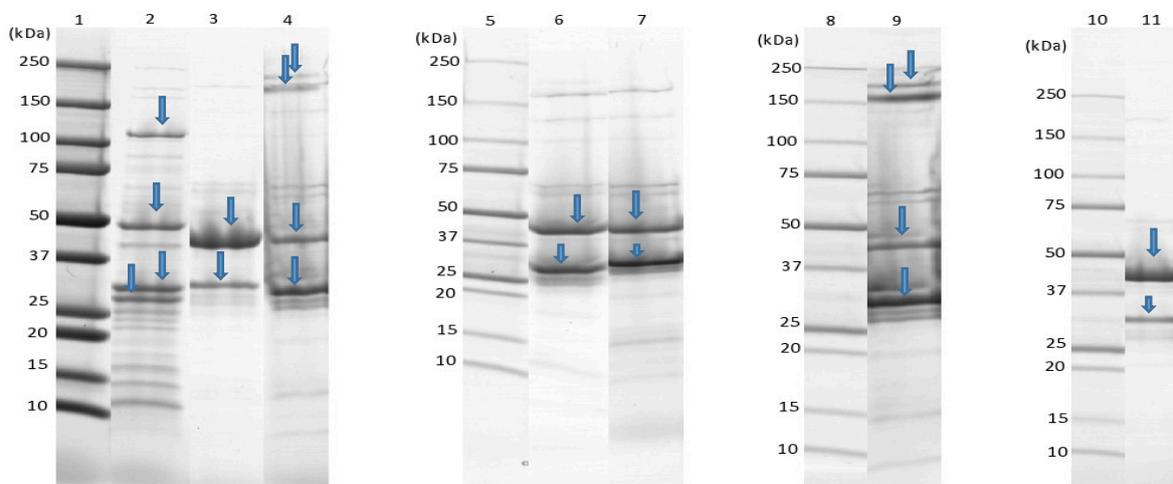


Figure 15: Analyse, par SDS-PAGE, des protéines structurales des bactériophages sélectionnés, infectant les isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments tunisiens collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

Pistes 1, 5, 8 et 10 : Marqueur de masse moléculaire (le Precision Plus Protein™ unstained standards (Bio-Rad)). Pistes 2, 3, 4, 6, 7, 9 et 11 : Ø1BC478, Ø1BC3990, Ø2BC4663, Ø3BC4663, Ø4BC4663(1), Ø4BC4663(2) et Ø1BC4663, respectivement.

↓ désigne les bandes des protéines majeures dans chaque piste

1.2.3. Caractérisation génomique

Pour la digestion de l'ADN des bactériophages isolés, l'action de 5 enzymes de restriction a été testée (*BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *Hin6I* et *TaqI*). La digestion de l'ADN génomique des 7 phages isolés par *EcoRI*, *Hin6I* et *TaqI* montrent des profils de restriction interprétables (**Figure 16**). Les profils obtenus étaient identiques pour les phages étudiés. Cependant, ceux obtenus par l'emploi de *BamHI* et *HindIII* ne sont pas clairement visibles et sont difficile à interpréter.

Les profils de restriction par *EcoRI*, *Hin6I* et *TaqI* ont permis de déterminer la taille des génomes des bactériophages par une addition de la taille des bandes obtenues après digestion. Ainsi, une taille des génomes de 37 kb similaires pour tous les 7 phages étudiés a été calculée.

Ces résultats révèlent que les 7 phages isolés sont très similaires et probablement très proches.

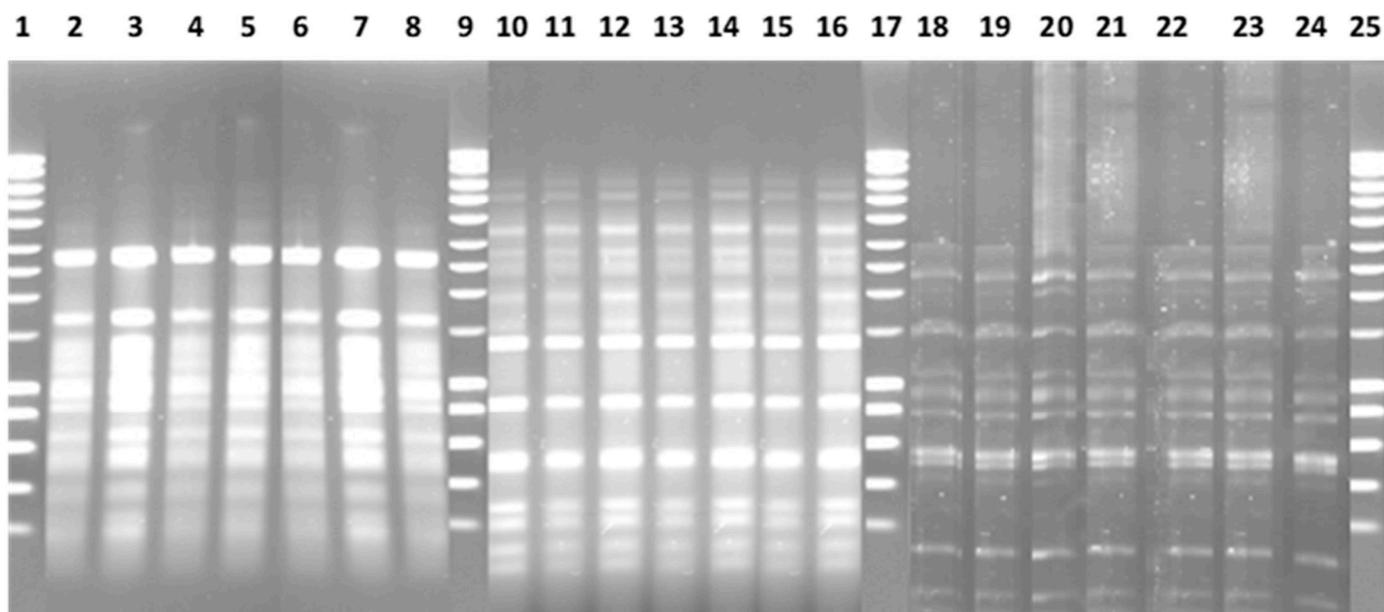


Figure 16: Profils de restriction du génome de sept phages infectant les isolats du groupe *B. cereus* provenant d'aliments tunisiens collectés en Tunisie entre avril 2014 et avril 2015.

Digestion par *TaqI* (pistes 2 à 8), digestion par *Hin6I* (pistes 10 à 16) et digestion par *EcoRI* (pistes 18 à 24). Pistes 1, 9, 17 et 25 : Marqueur moléculaire (SmartLadder 10 kb).

2. Discussion

Les phages infectant le groupe *B. cereus* sont retrouvés dans différents environnements naturels: sur le sol, dans les boues, dans les déchets alimentaires et les eaux usées ainsi que dans les aliments fermentés (Lee et al. 2013; Oh et al., 2017, Shin et al. 2011, 2014). Dans cette étude, nous avons recherché des bactériophages infectant le groupe *B. cereus* dans des eaux usées de différentes origines (P1- P4).

Une phase d'enrichissement spécifique au moyen d'un mélange de 174 isolats du groupe *B. cereus* a été mise au point afin d'amplifier un éventuel faible nombre de phages présents dans un échantillon et ainsi d'augmenter la probabilité de les trouver. Les études de **Giuseppe et al. (2018)** et **Surekhamol et al. (2013)** utilisent ce protocole expérimental pour isoler une variété de phages infectant les souches de *Campylobacter jejuni* et *Vibrio harveyi*, respectivement. Parmi les 62 phages isolés, 7 phages ont été choisis pour approfondir la caractérisation en raison de leur spectre lytique élargi et de la qualité des plages de lyse. Tel que rapporté dans des études antérieures (**Giuseppe et al., 2018 ; Shivu et al., 2007 ; Surekhamol et al., 2013**), les phages qui forment des plages de lyse claires ont un large spectre d'hôtes. L'efficacité lytique des phages sélectionnés diffère d'un phage à l'autre (**Tableau 26**) et est probablement due à la diversité des récepteurs

phagiques sur la paroi des souches testées ou à la présence ou l'absence de mécanismes de résistance aux phages chez ces souches (Bielke et al., 2007 ; Duckworth et al., 1981). Les phages qui présentent sont de bons candidats en tant qu'agents de biocontrôle dans l'industrie agroalimentaire. L'analyse par MET a montré que les bactériophages que nous avons isolés sont des membres de la famille des *Siphoviridae*. Cette constatation concorde avec les études de Geng et al. (2017) et de Oh et al. (2017). Par contre, d'autres études ont montré que d'autres bactériophages infectant le groupe *B. cereus* appartiennent à la famille des *Myoviridae* (Bandara et al., 2012 ; El-Arabi et al., 2013 ; Lee et al. 2011 ; Lee et al. 2013 ; Peng et Yuan., 2018 ; Shin et al. 2011). De plus, tel que rapporté par Giuseppe et al. (2018) et Lee et al. (2011), la MET a permis de distinguer les particules infectieuses à tête sombre des particules vides à tête claire. Ces dernières sont le résultat d'une perte du matériel génétique, potentiellement due à des facteurs de stress (par exemple la chaleur, les rayons UV, les hautes pressions) (EFSA, 2009). L'activité lytique des phages vides est due aux enzymes phagiques dégradant la paroi cellulaire et non à la réplication de l'ADN (Abedon, 2011 ; EFSA, 2009). L'analyse morphologique a permis la caractérisation et la comparaison des phages, ce qui est une étape préalable à leur utilisation en tant qu'agent de biocontrôle (Aprea et al., 2015).

Les protéines structurales majeures des sept phages isolés ont été analysées par SDS-PAGE. Les phages Ø2BC4663 et Ø4BC4663(2) présentent un profil protéique similaire. Le profil protéique des autres phages varie d'un phage à l'autre. Ainsi, les protéines structurales sont spécifiques à chaque phage, même si le phage appartient à la même famille. Des résultats similaires ont déjà été rapportés avec des bactériophages spécifiques d'*E. coli* (Hantke, 1978) et de *Salmonella* (Ngangbam et Devi, 2014). La diversité des profils protéiques pourrait être responsable de la différence des spectres d'hôtes et de la morphologie des plages de lyse des phages. L'analyse des protéines structurales est ainsi un moyen de morphotypage, de caractérisation et de différenciation des phages (Ngangbam et Devi, 2014).

Tous les phages isolés ont des profils de restriction similaires permettant d'évaluer une taille de génome estimée à 37 kb environ, ce qui peut laisser penser qu'ils sont probablement apparentés. La taille du génome des phages infectant le groupe *B. cereus* est comparable à celle publiée dans des études antérieures (Klumpp et al., 2010 ; Yuan et al., 2014). Cependant, des phages spécifiques au groupe *B. cereus* ont été décrits comme ayant une taille de génome de plus de 130 kb (Lee et al., 2011 ; NCBI Entrez Genome, 2008 ; Stewart et al., 2009). L'analyse comparative des profils de restriction a

montré que les génomes des phages isolés présentaient une forte similitude. Ces résultats concordent avec ceux obtenus dans des études antérieures qui ont rapporté que neuf phages spécifiques au groupe *B. cereus* présentaient une congruence génétique élevée. Il s'agit des phages Gamma, Cherry, Wβ et Fah, qui infectent des souches de *B. anthracis* et de *B. cereus* (Fouts et al., 2006 ; Minakhinet al., 2005 ; Schuch et Fischetti, 2006) ; phiS3501, BtCS33 et phiCM3 qui infectent des souches de *B. thuringiensis* (Moumenet al., 2012 ; Yuan et al. 2012 ; Yuan et al. 2014) ; et BceA1 et SpaA1, qui infectent des souches de *B. thuringiensis* et de *B. cereus* (Swanson et al., 2012). Les résultats de ces études suggèrent que les bactériophages ayant des génomes similaires sont susceptibles de se retrouver dans une variété d'environnements.

Bien que les génomes de ces phages soient dans l'ensemble très similaires, plusieurs gènes présentent une grande diversité, et des régions très variables dans les génomes ont été observées, comme les gènes codant des protéines ayant des fonctions dans la lyse de l'hôte et dans la répliation de l'ADN (Yuan et al., 2014). Le séquençage du génome des phages isolés dans ce travail pourrait permettre de mieux les comparer.

3. Conclusion

Au total, 62 bactériophages infectant le groupe *B. cereus* ont été isolés après enrichissement de quatre pools d'échantillons différents (P1- P4). La phase d'enrichissement spécifique a été mise au point afin d'amplifier un supposé faible nombre de particules phagiques présentes dans un échantillon et ainsi d'augmenter la probabilité de les isoler. Afin de sélectionner les phages à large spectre d'hôte, des analyses des spectres lytiques de ces 62 bactériophages ont été réalisées contre les 174 isolats du groupe *B. cereus* de notre collection. Sept phages ont été sélectionnés pour des études ultérieures en raison de leur large spectre lytique et de la qualité de plages de lyse qu'ils sont capables de former. Les phages sélectionnés ont montré une efficacité lytique allant de 8,6% à 13,2% sur les isolats du groupe *B. cereus* testés.

Les 7 bactériophages sélectionnés ont été examinés au MET. Sur la base de leurs caractéristiques morphologiques, tous les phages ont été considérés comme appartenant à la famille des *Siphoviridae* de l'ordre des *Caudovirales*. L'observation des bactériophages au MET a permis de distinguer des particules infectieuses à tête sombre des particules vides à tête claire.

Les protéines structurales majeures des sept phages isolés ont été analysées par SDS-PAGE. A l'exception de deux phages qui présentaient un profil protéique similaire, les 5

autres phages possédaient chacun un profil protéique unique. La diversité des profils protéiques pourrait être ainsi le reflet des différences observées entre les spectres d'hôtes et la morphologie des plages de lyse.

L'action de 3 enzymes de restriction (*EcoRI*, *Hin6I* et *TaqI*) a été testée sur l'ADN des 7 bactériophages. Tous les phages isolés présentent des profils de restriction similaires avec une taille de génome estimée à 37 kb environ. Ces résultats révèlent que les 7 phages isolés sont très similaires et qu'ils sont probablement apparentés. Le séquençage des phages isolés pourrait permettre de mieux connaître la composition génomique de ces phages et de les différencier.

Chapitre 4

**Evaluation de l'efficacité des
bactériophages sur l'inhibition et
l'éradication des biofilms formés de
bactéries du groupe *B. cereus***

1. Résultats

1.1. Efficacité du traitement phagique curatif pour la réduction de biofilms formés par les bactéries du groupe *B.*

La capacité des 7 phages, précédemment sélectionnés, à éliminer des biofilms de bactéries du groupe *B. cereus* formés sur des coupons en inox pendant 24, 48 et 72 h a été évaluée. Le post-traitement phagique a été effectué en mettant différents titres (5-8 log UFP/mL) de chacun des phages au contact des biofilms préformés pendant 6 h à 30°C.

Les effets du post-traitement phagique sur les biofilms préformés sont exprimés en pourcentage de réduction du biofilm (**Figure 17**). Tous les titres des différents phages (5-8 log UFP/mL) se sont avérés efficaces contre le biofilm âgé de 24 h. Les pourcentages de réduction sont alors de 28,0 à 59,4%, 22,5 à 49,1%, 18,4% à 42,1% et 6,1 à 32,2% pour des titres de 8, 7, 6 et 5 log UFP/mL, respectivement.

L'activité d'éradication de la biomasse la plus élevée (59,4%) a été observée avec le phage Ø4BC4663(2) à un titre de 8 log UFP/mL contre un biofilm âgé de 24 h. Les résultats ont montré que seuls des titres supérieurs à 6 log UFP/mL sont efficaces sur un biofilm âgé de 48 h. Aucune activité d'éradication n'a été observée avec les phages Ø2BC4663, Ø4BC4663(1) et Ø4BC4663(2) après traitement des biofilms âgés de 48 h avec un titre de 5 log UFP/mL. L'efficacité d'éradication des biofilms la plus élevée est d'environ 37% avec des titres allant de 7 à 8 log UFP/mL pour le phage Ø1BC3990. L'efficacité des bactériophages est considérablement réduite sur les biofilms âgés de 72 h. Aucune activité d'éradication n'a été détectée pour tous les titres testés des phages Ø1BC3990 et Ø2BC4663. Cependant, un traitement avec 8 log UFP/mL du phage Ø1BC4663 s'est avéré le plus efficace contre les biofilms âgés de 72 h et a engendré un pourcentage de réduction de 25,6%.

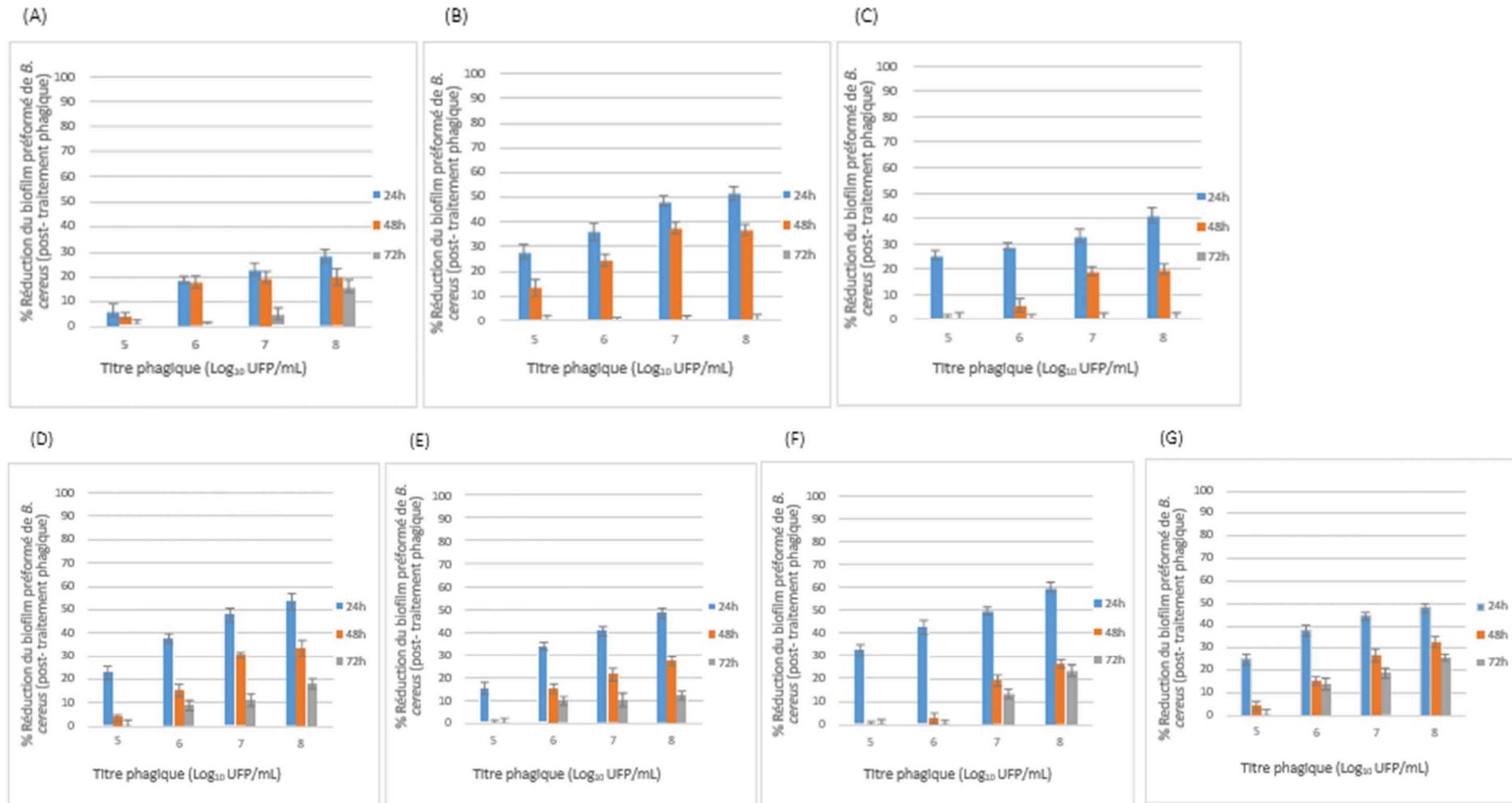


Figure 17: (A-G) : Effet des traitements bactériophagiques curatifs à différents titres (5-8 log UFP/mL) sur des biofilms préformés sur coupons en inox et âgés de 24, 48 et 72h. Les résultats sont exprimés en pourcentages d'éradication des biofilms. Les barres représentent l'écart-type. (A) phage Ø1BC478, (B) phage Ø1BC3990, (C) phage Ø2BC4663, (D) phage Ø3BC4663, (E) phage Ø4BC4663(1), (F) phage Ø4BC4663(2) et (G) phage Ø1BC4663.

1.2. Efficacité du traitement phagique préventif pour l'inhibition de la formation de biofilms par les bactéries du groupe *B. cereus*

L'efficacité des différents titres (5 à 8 log UFP/mL) de chacun des 7 phages isolés à inhiber la formation d'un biofilm à différentes périodes d'incubation (24, 48 et 72 h) à 30°C, a été évaluée. Ce test consiste à mettre une suspension de la souche hôte et du phage approprié en contact de coupons en inox contenus dans des plaques de 24 puits et incubée pendant 24, 48 et 72 h

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la formation du biofilm (**Figure 18**). Les différents titres des phages testés pourraient prévenir la formation de biofilms à la fin des périodes d'incubation de 24 et 48 h, avec des pourcentages d'inhibition variant de 65,3 à 97,1% et de 48,2 à 91,9%, respectivement. La capacité d'inhibition de tous les phages testés s'est avérée moins efficace à la fin de la période d'incubation la plus longue (72h). Le pourcentage d'inhibition varie de 16,8 à 28,4%, de 37,9 à 58,3%, de 66,7 à 76,8% et de 79,1 à 87,1% pour les titres 5, 6, 7 et 8 PFU/mL, respectivement. La plus forte inhibition (97,1%) a été observée avec le traitement par le phage Ø4BC4663(1) à un titre de 8 PFU/mL après 24 h de formation du biofilm. Pour le biofilm âgé de 48 h, le phage Ø3BC4663 révèle le pourcentage d'inhibition le plus élevé (91,1%) à un titre de 8 log PFU/mL. L'efficacité d'inhibition la plus faible a été observée avec le phage Ø1BC478, quel que soit le titre testé et quel que soit l'âge du biofilm (24, 48 ou 72 h).

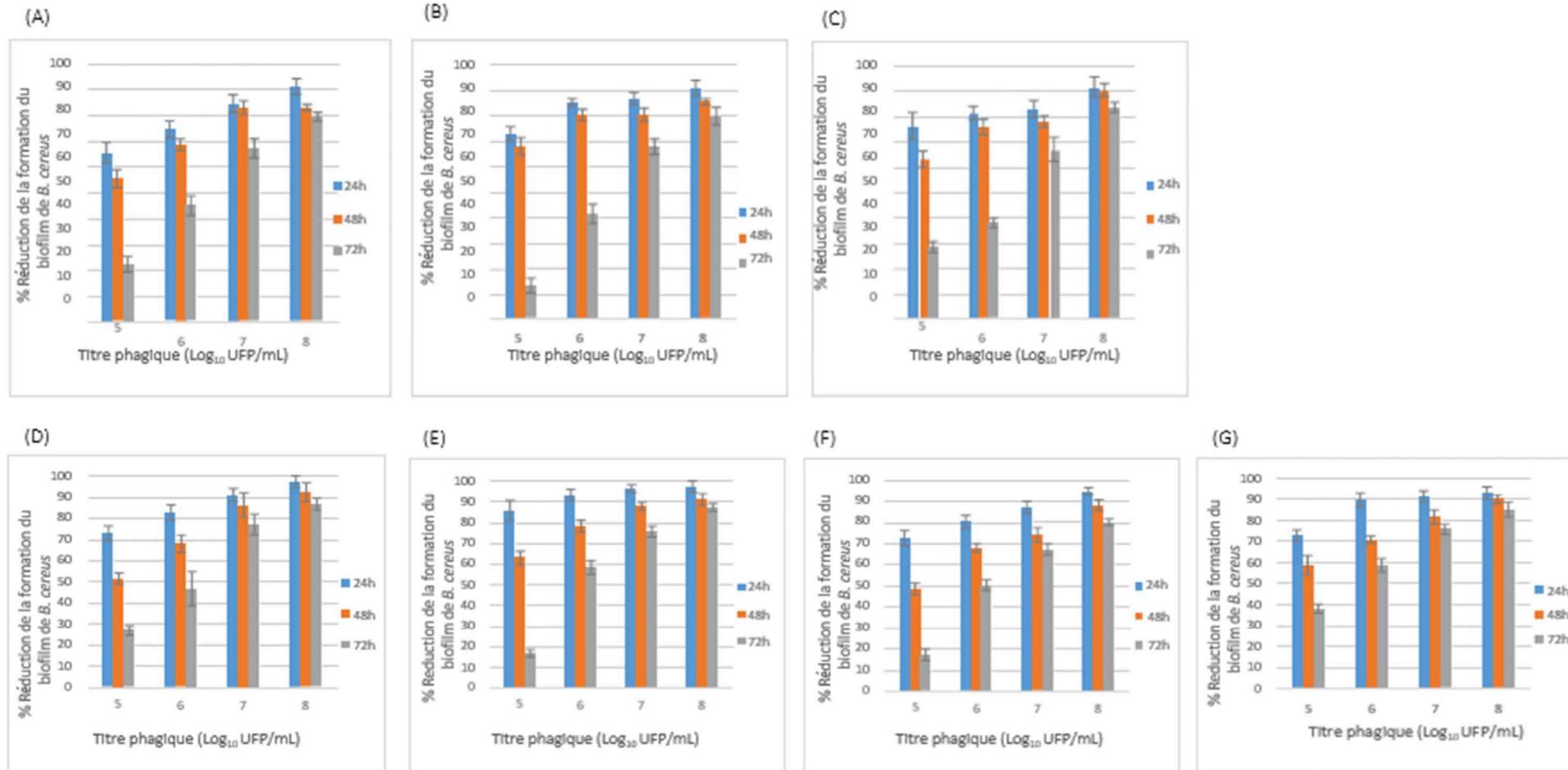


Figure 18: (A-G) : Effets des traitements bactériophagiques à différents titres (5-8 log UFP/mL) au cours de la formation des biofilms sur coupons en inox pour des durées de 24, 48 ou 72h. Les résultats sont exprimés en pourcentages d'éradication des biofilms.

Les barres représentent l'écart-type. (A) phage Ø1BC478, (B) phage Ø1BC3990, (C) phage Ø2BC4663, (D) phage Ø3BC4663, (E) phage Ø4BC4663(1), (F) phage Ø4BC4663(2) et (G) phage Ø1BC4663.

2. Discussion

Tous les titres (5 à 8 log PFU/mL) testés de chacun des 7 bactériophages isolés se sont montrés plus efficaces pour prévenir la formation d'un biofilm (traitement préventif) que pour l'éradiquer (traitement curatif). En effet, les réductions sont environ trois fois plus élevées avec le traitement préventif (de 0,1 à 1,5 log UFC/cm²) qu'avec le traitement curatif (de 0 à 0,5 log UFC/cm²). Ces résultats corroborent ceux obtenus lors de l'utilisation d'un bactériophage pour l'éradication et l'inhibition de la formation des biofilms d'*E. coli* O157:H7 (Sharma et al., 2005). En effet, une réduction de 1,2 log UFC/cm² du niveau d'adhésion bactérienne a été observée en présence du bactériophage. Cependant, le même traitement phagique n'a pas pu réduire de façon significative le biofilm préformé dans les mêmes conditions. Karaca et al. (2015) ont montré que le bactériophage P22 a été, quant à lui, beaucoup plus efficace pour inhiber la formation d'un biofilm de *Salmonella enterica* (de 0,08 à 1,2 log UFC/cm²) que pour l'éradiquer (de 0 à 0,5 log UFC/cm²). Afin d'éradiquer un biofilm, les phages doivent pouvoir atteindre les bactéries qui sont englobées dans ce dernier et s'attacher aux récepteurs spécifiques présents à la surface bactérienne. Cependant, la nature complexe d'un biofilm confronte le phage à plusieurs difficultés qui l'empêchent d'agir efficacement. La matrice du biofilm constitue une première barrière à l'initiation du processus d'infection. Cette structure complexe limite la diffusion du phage et diminue son accessibilité à la bactérie hôte (Pires et al., 2017). Par ailleurs, les polymères qui la composent peuvent masquer les récepteurs phagiques et ainsi entraver le processus d'infection. Un deuxième frein à l'éradication des biofilms par les phages est lié à l'état physiologique des cellules du biofilm (Abedon, 2016 ; Gong et Jiang, 2017 ; Gutiérrez et al., 2016). En effet, les cellules persistantes ou en phase stationnaire, à activité métabolique réduite, qui se trouvent enfermées dans les biofilms sont moins susceptibles d'être lysées par les phages. En effet, les phages infectent préférentiellement les cellules planctoniques en phase exponentielle de croissance avant que celles-ci ne forment un biofilm (Heringa et al., 2010; Jamal et al., 2015; Kinley, 2009; Pires et al., 2017). L'application des bactériophages pendant l'étape de fixation bactérienne est ainsi plus efficace que sur les biofilms matures puisque les phages, appliqués de manière préventive, ne font pas face à toutes ces contraintes. Cela explique pourquoi le traitement préventif s'est généralement montré plus efficace que le traitement curatif.

Néanmoins, les phages ont évolué pour surmonter les barrières imposées par les biofilms. En effet, certains possèdent une activité polysaccharide dépolymérase qui leur permet de dégrader spécifiquement les polymères de la matrice. Cette caractéristique constitue un avantage important, étant donné qu'elle encourage le processus d'invasion du phage dans les couches profondes du biofilm ainsi que la dispersion de la matrice (**Labrie et al., 2010**). Par ailleurs, les phages sont capables de pénétrer via les canaux du biofilm, au même titre que l'eau et les éléments nutritifs. Enfin, la densité en bactéries dans un biofilm est très élevée, ce qui facilite l'action des bactériophages en permettant une infection rapide et efficace (**Harper et al., 2014**). Nos résultats ont montré que l'âge du biofilm influence l'efficacité curative des bactériophages sur les biofilms matures. Ceci est en accord avec les résultats des recherches de **Corbin et al. (2001)** et **Sharma et al. (2005)** qui ont montré que les réductions significatives de biofilms (allant de 1 à 6 log UFC/cm²) dépendent des constituants du biofilm, de l'âge du biofilm, de la sélection du phage et de la durée du traitement. Il est montré qu'un traitement curatif appliqué sur une période de temps plus étendue permettrait probablement d'atteindre des réductions importantes (**Soni et Nannapaneni, 2010**). En effet, il est possible qu'une application sur une période de temps plus étendue permette au phage de dégrader davantage la matrice du biofilm et d'atteindre sa cible. Cependant, d'autres études ont montré que le traitement bactériophagique n'est pas assez efficace lorsqu'il est prolongé. En effet, La formation du biofilm sera reprise en raison de la diminution de la concentration des phages (**karaca et al., 2015**) ou de la sélection de variants bactériens résistants aux phages, qui nuiraient à l'efficacité du traitement (**Hudson et al., 2005 ; karaca et al, 2015 ; Sadekuzzaman et al., 2018**). Comme l'ont signalé **Donlan (2009)** et **Labrie et al (2010)**, la résistance aux phages des biofilms de laboratoire pourrait être due à des mutations ou à des pertes des récepteurs bactériens aux phages. Cependant, les phages peuvent surmonter certaine forme de résistance bactérienne en s'adaptant à de nouveaux récepteurs (**Samson et al., 2013**). De plus, au moment de la lyse bactérienne provoquée par les bactériophages, l'ADN extracellulaire bactérien peut se libérer et s'accumuler à une concentration suffisante pour intervenir dans la reconstitution du biofilm (**Gödeke et al., 2011**).

Par ailleurs, afin d'améliorer l'efficacité des phages en tant qu'agents de biocontrôle, ces derniers pourraient être utilisés en combinaison avec d'autres méthodes de désinfection ou d'élimination des biofilms. En effet, l'application préalable d'enzymes ou un traitement mécanique aurait pour conséquence de fragiliser le biofilm et de permettre aux phages d'accéder plus aisément aux bactéries cibles. **Zhang et Hu (2013)** ont montré que

l'effet d'un phage combiné avec du chlore était plus efficace que chacun des traitements appliqués seuls pour éradiquer un biofilm formé par *P. aeruginosa*.

L'utilisation des coupons en inox pour les tests de formation des biofilms nous a permis de nous rapprocher des conditions retrouvées en IAA. Cependant, les biofilms rencontrés en IAA sont généralement formés de plusieurs espèces. Il serait donc intéressant de réitérer nos expériences sur des biofilms formés par des bactéries du groupe *B. cereus* associées avec d'autres genres bactériens tels que *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, et *Enterobacter* qui figurent parmi ceux problématiques et persistants sur les surfaces en contact avec les aliments en industrie laitière (Sharma et Anand, 2002), en industrie de la viande (Schlegelova et al., 2010) et en industrie des produits de la mer (Bagge-Ravn et al., 2003).

3. Conclusion

Les bactériophages sont des agents de biocontrôle qui pourraient être utilisés pour lutter contre la formation ou la présence des biofilms formés de bactéries du groupe *B. cereus*. La capacité des 7 bactériophages isolés à différents titres (5 à 8 log UFP/mL) pour lutter contre les biofilms formés de bactéries du groupe *B. cereus* a été évaluée. Deux traitements ont été testés : l'un est préventif, l'autre est curatif. Le traitement préventif s'est avéré relativement efficace pour prévenir la formation d'un biofilm (réduction allant de 0,1 à 1,5 log UFC/cm² par rapport au contrôle). Les différents titres de phages testés (5 à 8 log PFU/mL) pourraient prévenir la formation de biofilms à la fin des périodes d'incubation de 24 et 48 h, tandis que des titres plus élevés se sont avérés efficaces après 72 h d'incubation. Le traitement curatif a permis de réduire la densité bactérienne d'une valeur allant de 0 à 0,5 log UFC/cm². Bien que cette dernière expérience ait démontré le potentiel des bactériophages à détruire un biofilm, les réductions obtenues sont moindres que celles obtenues lors du traitement préventif, surtout pour les biofilms âgés de 72 h. Le pourcentage d'inhibition de la formation du biofilm et la réduction du biofilm préformé ont atteint jusqu'à 97,1 et 59,4%, respectivement. Cette baisse d'efficacité est sans doute liée à la présence d'une matrice complexe qui constitue un frein à la destruction des biofilms car cette structure limite la diffusion du phage et diminue son accessibilité à la bactérie hôte. Un deuxième frein à l'éradication des biofilms par les phages est lié à l'état physiologique des cellules du biofilm. En effet, les cellules persistantes ou en phase stationnaire, à activité métabolique réduite, qui se trouvent enfermées dans les biofilms sont moins susceptibles d'être lysées par les phages. Les phages, appliqués de manière

préventive, ne font pas face à toutes ces contraintes car ils infectent préférentiellement les cellules planctoniques en phase exponentielle de croissance, avant que celles-ci ne forment un biofilm. Cela explique pourquoi le traitement préventif s'est généralement montré plus efficace que le curatif. Par ailleurs, afin d'améliorer l'efficacité du traitement curatif, les phages pourraient être utilisés en combinaison avec d'autres méthodes de désinfection ou d'élimination des biofilms. Puisque les biofilms rencontrés en IAA sont généralement formés par plusieurs espèces, il serait intéressant de réitérer les expériences sur des biofilms multi-espèces.

Conclusion Générale et Perspectives

Conclusion Générale

Les membres du groupe *B. cereus* sont présents dans de nombreux aliments qui peuvent, suivant les souches, s'en trouver altérés ou s'avérer dangereux pour la consommation. Leur contrôle constitue dès lors une préoccupation majeure.

En Tunisie, à notre connaissance, aucun travail n'a porté sur la contamination des produits alimentaires par le groupe *B. cereus* ni sur les moyens de lutte permettant de maîtriser les risques associés à cette contamination.

L'objectif principal de la présente thèse a été scindé en deux volets majeurs. Le premier volet consistait à isoler des souches du groupe *B. cereus* dans différentes matrices alimentaires, à étudier leur diversité génétique et à évaluer le niveau de risque en matière de sécurité sanitaire des aliments. Le deuxième volet consistait à isoler et caractériser des bactériophages infectant le groupe *B. cereus* dans le but d'évaluer leur efficacité comme moyen de lutte contre les biofilms pouvant se former à la surface des installations en IAA. En ce qui concerne l'isolement des souches, après analyse de 687 aliments, le groupe *B. cereus* a pu être détecté dans 191 d'entre eux et ce travail a donné lieu à la création d'une collection de 191 isolats. Pour 77,5% des échantillons, le taux de contamination s'est avéré être inférieur à 3 log UFC/ g ou mL. Ils peuvent donc être considérés comme étant de qualité microbiologique satisfaisante et présentent un risque faible pour le consommateur. Cependant, cette charge bactérienne peut rapidement augmenter et atteindre un niveau dangereux en cas de rupture de la chaîne du froid ou de celle du chaud. Les isolats présomptifs du groupe *B. cereus* ont fait l'objet d'une identification par un test PCR ciblant la séquence du gène *sspE*, spécifique du groupe. Ainsi, 174 isolats se sont avérés positifs et ont constitué la collection qui a servi par la suite au reste des études. Divers tests de caractérisation ont été réalisés. Des tests PCR ciblant des séquences signatures spécifiques des bactéries mésophiles et psychrotrophes ont été réalisés, permettant ainsi de différencier les deux groupes thermiques. Un profil thermique dit « intermédiaire » a été mis en évidence pour l'ensemble de la collection. Ce profil est caractérisé par la coexistence de deux séquences signatures, l'une propre aux bactéries psychrotrophes et l'autre aux bactéries mésophiles, portées toutes deux par le gène codant l'ARNr 16S. L'affiliation phylogénique des isolats du groupe *B. cereus* a révélé une prédominance du groupe phylogénétique III (60,9%), l'un des groupes les plus cytotoxiques susceptibles de présenter un risque potentiel pour le consommateur. La forte prévalence d'isolats appartenant au groupe III pourrait être associée à la transformation et

/ ou au stockage d'aliments cuits, souvent à des températures abusives et/ou à un stockage prolongé à haute température. Les différents isolats du groupe *B. cereus* ont été soumis à une étude de diversité avec les méthodes PFGE et ERIC-PCR. L'analyse des profils PFGE et ERIC-PCR a permis de discriminer 143 et 99 clusters différents, respectivement. L'étude du pouvoir d'adhésion sur l'inox a montré l'importance de l'état physiologique des souches (spores ou cellules végétatives) dans leur capacité d'adhésion. Pour 73% des isolats de la collection, les spores adhèrent mieux que les cellules végétatives. La forte adhésion observée peut avoir des implications néfastes pour l'hygiène des surfaces, les biofilms étant connus pour être difficiles à éliminer lors des opérations de nettoyage et désinfection. La distribution des facteurs de virulence au sein de la collection a permis de classer les souches en douze groupes toxinogènes. Tous les isolats ont été multi-toxinogènes, hébergeant au moins un des gènes de chacun des complexes NHE et HBL associés ou non aux gènes *bceT*, *cytK-2* et *ces*.

Néanmoins, cela ne signifie pas que les souches sont toxiques ou qu'elles produisent une ou des toxine(s). Ainsi, leur cytotoxicité sur les cellules Caco-2 a été étudiée. Après incubation en milieu BHI-YE à 30°C, 70,7% et 35% des souches se sont avérées cytotoxiques (provoquant plus de 50% d'inhibition des cellules Caco-2) après 18 h et 5 j, respectivement. Différentes combinaisons des facteurs de virulence ont été associées de façon significative au potentiel cytotoxique des bactéries. De plus, un lien apparaît clairement entre la cytotoxicité des souches et le type d'aliment dont elles sont issues. La majorité des souches s'est montrée sensible à de nombreux agents antimicrobiens mais présentait une résistance à l'ampicilline et à la novobiocine.

Le deuxième volet de ce travail était d'isoler et de caractériser des bactériophages infectant les bactéries du groupe *B. cereus*. Pour ce faire, des prélèvements environnementaux ont été testés sur les 174 isolats de la collection bactérienne. Soixante-deux isolats phagiques ont été obtenus (un isolat correspondant à une plage de lyse provenant du test d'un échantillon environnemental sur une souche donnée). Chaque phage a été propagé sur sa souche sensible puis chaque propagation phagique obtenue a été testée sur les 174 isolats afin de définir son spectre d'hôte. Sept phages ont été choisis pour la suite des études, en raison de leur large spectre et de la qualité des plages de lyse formées. Les phages sélectionnés ont montré une efficacité lytique sur les isolats de *B. cereus* testés, allant de 8,6% à 13,2%.

L'observation des sept bactériophages sélectionnés au MET montrent que ces derniers appartiennent à la famille des *Siphoviridae* de l'ordre des *Caudovirales*.

Les protéines structurales majeures des phages isolés ont été analysées par SDS-PAGE. A l'exception de deux phages qui présentaient un profil protéique similaire, les 5 autres phages possédaient chacun un profil protéique unique. Les génomes des phages isolés présentent des profils de restriction similaires permettant d'estimer une taille de 37 kb environ. Ces résultats révèlent que les 7 phages isolés sont très similaires et qu'ils sont probablement apparentés. Le séquençage de leurs génomes pourrait permettre de mieux comprendre leur nature et de les différencier.

Finalement et dans le but d'évaluer la capacité des bactériophages isolés à lutter contre les biofilms, deux traitements ont été testés : l'un, préventif et l'autre, curatif. Bien que le traitement curatif ait démontré le potentiel des bactériophages à éradiquer un biofilm, les réductions obtenues (allant de 0 à 0,5 log UFC/cm²) sont moindres que celles du traitement préventif (réduction variant entre 0,1 et 1,5 log UFC/cm²), surtout pour les biofilms âgés de 72 h. Le traitement préventif s'est généralement montré plus efficace que le traitement curatif, avec un pourcentage d'inhibition de la formation du biofilm atteignant jusqu'à 97,1% et un pourcentage de la réduction du biofilm préformé pouvant atteindre 59,4%. Dans ce dernier cas, cette baisse d'efficacité est liée à la présence d'une matrice complexe qui limite la diffusion du phage et diminue son accessibilité à la bactérie hôte mais aussi, à l'état physiologique des cellules du biofilm. En effet, les cellules persistantes ou en phase stationnaire à activité métabolique réduite qui se trouvent enfermées dans les biofilms sont moins susceptibles d'être lysées par les phages.

Ce travail confirme le risque sanitaire lié à la présence de bactéries du groupe *B. cereus* et le rôle des bactériophages comme outil prometteur pour le biocontrôle de ces bactéries pathogènes et d'altération au sein de la filière agro-alimentaire.

Perspectives

Les perspectives envisageables en prolongement direct de cette thèse concernent 5 objectifs importants :

1. La constitution d'une collection de bactériophages

Pour cibler le plus grand nombre possible de souches du groupe *B. cereus* impliqués dans les biofilms, de nouveaux phages d'origine autre que les eaux usées viendront compléter la collection existante.

2. La caractérisation génomique approfondie des bactériophages et la connaissance de leurs propriétés biologiques

Une condition préalable à la l'utilisation industrielle des phages sélectionnés dans ce travail est la caractérisation approfondie de leurs génomes et de leurs propriétés biologiques. C'est ainsi que la connaissance de paramètres biologiques tels que la stabilité en fonction du pH, le temps de latence, le nombre de virions libéré par cellules et l'absence du phénomène de transduction généralisée est cruciale pour leur application dans la chaîne alimentaire à des fins de biocontrôle. Le génome du phage doit être complètement séquencé afin de garantir l'absence de gènes de lysogénie et s'assurer qu'il est dépourvu de séquences codant des facteurs de virulence ou des protéines immunogènes. Enfin, la souche de propagation nécessaire à la production industrielle doit être d'une part, indemne de gènes de pathogénicité et d'autre part, dépourvue de prophages. En effet la présence de ces derniers sur le génome de la souche pourrait entraîner des recombinaisons avec le phage propagé et conduire à de nouveaux variants phagiques non désirés. Afin de répondre à ces critères, le génome des souches de propagation devra être séquencé et étudié.

Enfin, le phage doit être facilement produit et purifié à grande échelle. La préparation doit être exempte d'éventuelles toxines relâchées dans le milieu lors de la lyse cellulaire.

3. L'évaluation de l'efficacité des bactériophages comme moyen de lutte contre les biofilms des bactéries du groupe *B. cereus* en milieu industriel

Les tests d'efficacité *in vitro* des bactériophages comme moyen de lutte contre les biofilms des bactéries du groupe *B. cereus* sont très encourageants pour une utilisation efficace en tant qu'outil de biocontrôle des biofilms dans les IAA. Il serait alors pertinent de mettre en œuvre des outils permettant d'évaluer cette efficacité en milieu industriel. Pour cela, une approche pourrait être d'isoler des souches du groupe *B. cereus* à partir de biofilms formés sur les surfaces d'équipements industriels et de rechercher des phages actifs sur ces souches. Un pilote constitué d'une cuve reliée à un tuyau en boucle et d'une pompe permettant de faire circuler le liquide dans le circuit pourrait être mis au point. Il permettrait de produire un biofilm avec une souche isolée du groupe *B. cereus* de manière à et à tester par la suite la capacité de la suspension bactériophagique à éliminer le biofilm.

4. L'association des bactériophages avec d'autres moyens de traitement des biofilms

L'évolution actuelle vise à développer de nouvelles méthodes de préservation et de désinfection faisant appel à des composés naturels et visant à pallier les inconvénients des méthodes conventionnelles qui ne répondent plus aux attentes des consommateurs et aux exigences de la santé publique. Les résultats obtenus dans ce travail et par de nombreuses

équipes sur l'efficacité des bactériophages, en tant qu'agents antimicrobiens (notamment dans la lutte contre les biofilms) renforcent l'idée que les bactériophages constitueront une partie intégrante des stratégies d'intervention en matière de salubrité mises en œuvre au sein de la filière agro-alimentaire, de la production primaire aux produits alimentaires finaux. Afin d'améliorer l'efficacité du traitement curatif des biofilms, les bactériophages pourraient être utilisés en combinaison avec d'autres méthodes de désinfection ou d'élimination des biofilms. En association avec des antibiotiques, le frein à l'installation des biofilms pourrait être encore supérieur. Cette synergie phage-antibiotique pourrait s'expliquer par le fait que l'action de l'antibiotique serait renforcée par les activités enzymatiques phagiques qui agissent sur la paroi bactérienne. Un autre avantage de la thérapie combinée serait sa capacité à limiter la formation de mutants résistants qui apparaissent plus facilement lorsque l'on utilise les phages ou les antibiotiques séparément.

5. L'utilisation des endolysines des bactériophages pour le traitement des biofilms

Une autre stratégie de biocontrôle, qui n'implique pas nécessairement les phages eux-mêmes, consiste à utiliser les endolysines qui sont des enzymes produites par les phages à la fin du cycle lytique. Ces enzymes dégradent les peptidoglycanes, qui composent la paroi bactérienne permettant ainsi au phage de s'attacher à l'enveloppe bactérienne. Elles peuvent également dégrader la structure complexe de la matrice du biofilm.

Certaines protéines associées à la particule phagique ont la capacité de lyser la paroi bactérienne lors de l'adsorption du phage. Elles ont été utilisées par certains auteurs pour un résultat similaire à celui des endolysines (**Drulis-Kawa et al., 2012**).

Des perspectives envisageables en matière de prévention des risques liés au groupe *B. cereus* en Tunisie pourraient être également envisageable, telles que

1. La surveillance des infections à *B. cereus* au plan national

En Tunisie, les maladies reliées au groupe *B. cereus* ne sont pas à déclaration obligatoire. Les syndromes associés au groupe *B. cereus* ne sont pas répertoriés dans les critères microbiologiques recherchés. Les agents impliqués dans les TIAC en Tunisie sont *Salmonella* ssp, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Clostridium Perfringens*. L'incidence réelle du groupe *B. cereus* en tant que pathogène alimentaire reste difficile à évaluer. En effet, les symptômes des syndromes diarrhéique et émétique causés par les bactéries du groupe *B. cereus* sont très proches de ceux provoqués respectivement par *Clostridium perfringens* et *Staphylococcus aureus*. D'où la nécessité

d'une part d'inclure la recherche des bactéries du groupe *B. cereus* (identification, typage moléculaire, caractérisation de la pathogénicité et épidémiologie) dans les programmes de sécurité sanitaire des aliments, ainsi que dans les laboratoires nationaux de référence et d'autre part, de déclarer les maladies associées au groupe *B. cereus* à l'autorité sanitaire tunisienne afin de garantir une surveillance épidémiologique des infections à *B. cereus* au plan national.

2. L'analyse du risque alimentaire liée au groupe *B. cereus* en Tunisie : vers de nouvelles pratiques dans les IAA et chez les consommateurs

Dans notre travail, la prévalence des bactéries du groupe *B. cereus* la plus élevée a été trouvée dans les échantillons de céréales (67,7%). La température est le principal facteur affectant la réponse bactérienne dans le procédé de préparation de certains produits céréaliers. Leur préparation est basée sur des répétitions de cycle de cuisson à la vapeur (couscous), ou à l'eau bouillante (blé dur « borghol »). Ces produits sont ensuite séchés et stockés pour être consommés par la suite. Au sein du processus industriel, l'étape de cuisson permet de détruire les bactéries omniprésentes, elle ne supprime cependant que les formes végétatives, les formes sporulées résistant aux barèmes thermiques mis en œuvre. La contamination des produits céréaliers provient soit de la matière première, soit du procédé de fabrication. Seule la mise en place d'une démarche HACCP (incluant la maîtrise de la qualité de la matière première) permettra à l'industriel de maîtriser le risque *B. cereus* dans la filière des aliments à base de céréales. Les pratiques actuelles du consommateur tunisien augmentent le risque de multiplication des bactéries du groupe *B. cereus*. Parmi ces pratiques, on cite :

- La consommation des aliments, en particulier ceux contenant des céréales cuites à l'eau -pâtes, riz, semoule -ou des ingrédients déshydratés et qui ont séjourné plusieurs heures à température ambiante.
- La répétition de l'opération du réchauffage des plats plusieurs fois
- Le réchauffage inégale des plats

Il est alors recommandé aux consommateurs de bien cuire les aliments avec une consommation ex-temporairement rapide en une seule portion. Sinon, un refroidissement rapide et la conservation au réfrigérateur sont indispensables. En effet, un refroidissement lent et un stockage prolongé à température ambiante permettent aux spores de germer et aux cellules végétatives issues de la germination de se développer et de libérer des toxines dont le céréulide qui est résistant à la température de cuisson. Si une cuisson avant consommation permet de détruire les formes végétatives qui auraient pu se développer

lors du stockage à température ambiante, elle ne permet pas de se débarrasser du céréulide. Une enquête qui aiderait à identifier les pratiques à risques du consommateur tunisien permettrait de donner les recommandations pertinentes à ce dernier.

3. L'étude de l'altération des aliments par les bactéries du groupe *B. cereus*

Même s'il est reconnu depuis longtemps comme étant responsable de toxi-infections alimentaires, le groupe *B. cereus* est aussi connu pour altérer des produits alimentaires. Cependant, jusqu'à maintenant, aucun travail en Tunisie n'a visé l'étude des problèmes d'altération des produits alimentaires causés par cette bactérie lors du stockage. Il serait donc intéressant d'approcher les industriels de l'agroalimentaire tunisien afin de faire un état des lieux de l'altération des aliments par les bactéries du groupe *B. cereus*.

Références Bibliographiques

1. ABBAS, A. A., PLANCHON, S., JOBIN, M., SCHMITT, P. (2014). Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*. *Food Microbiol.* 42, 122-131.
2. ABEDON, S. T. (2011). Lysis from without. *Bacteriophage* 1(1), 46-49.
3. ABEDON, S. T. (2016). Bacteriophage exploitation of bacterial biofilms: phage preference for less mature targets? *FEMS Microbiol. Lett.* 363 (3), pii: fnv246. doi: 10.1093/femsle/fnv246
4. ACKERMANN, H. W. (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Res. Microbiol.* 154, 245-251.
5. ACKERMANN, H. W. (2006). Classification of Bacteriophages. In *The Bacteriophages*. Calendar, R. Oxford University Press, New York, 8-16 pp.
6. ADAMS, M. R., MOSS, M. O., MCCLURE P. (2015). Food microbiology. Royal Society of Chemistry, 546pp.
7. Adams, M., 1959. Bacteriophages. New York, NY: Interscience Publishers Inc.
8. AFCHAIN, A. L., CARLIN, F., NGUYEN-THE, C., ALBERT I. (2008). Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurised and chilled foods. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 165-173.
9. AGARWAL, S., SHARMA, K., SWANSON, B. G., YUKSEL, G. U., CLARK S. (2006). Non starter lactic acid bacteria biofilms and calcium lactate crystals in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 89, 1452-1466.
10. AGARWALA, M., BARMAN, T., GOGOI, D., CHOUDHURY, B., PAL, A. R., YADAV, R. N. S. (2014). Highly effective antibiofilm coating of silver-polymer nanocomposite on polymeric medical devices deposited by one step plasma process. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 102(6), 1223-1235.
11. AGATA, N., MORI, M., OHTA, M., SUWAN, S., OHTANI, I., ISOBE, M. (1994). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 121, 31-34.
12. AGATA, N., OHTA, M., MORI, M. (1996). Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. *Curr. Microbiol.* 33(1), 67-69.
13. AGATA, N., OHTA, M., MORI, M., ISOBE, M. (1995). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 129(1), 17-19.
14. AGATA, N., OHTA, M., YOKOYAMA, K. (2002). Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *Int. J. Food Microbiol.* 73(1), 23-27.
15. AGGELEN, H. V., KOLDE, R., CHAMARTHI, H., LOVING, J., FAN, Y., FALLON, J. T. 3RD, HUANG, W., WANG, G., FORTUNATO-HABIB, M. M., CARMONA, J. J., GROSS, B. D. (2019). A core genome approach that enables prospective and dynamic monitoring of infectious outbreaks. *Sci Rep.* 9(1):7808. doi: 10.1038/s41598-019-44189-0.
16. ÅGREN, J., SCHÄFER, M. O., FORSGREN, E. (2017). Using whole genome sequencing to study American foulbrood epidemiology in honeybees. *PLOS ONE* 12(11) : e0187924.
17. AGWA, O. K., UZOIGWE, C. I., WOKOMA, E. C. (2012). Incidence and antibiotic sensitivity of *Bacillus cereus* isolated from ready to eat foods sold in some markets in Portharcourt, Rivers State, Nigeria. *Asian journal of microbiology. Biotechnol. Environ. Sci.* 14 (1), 13-18.
18. AKBAS, M. Y. (2015). Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and*

Educational Programs, Badajoz : Formatex, 383-394.

19. AKLILU, E., TUKIMIN, E. B., DAUD, N. B. A., KYAW, T. (2016). Enterotoxigenic *Bacillus cereus* from cooked chicken meat: A potential public health hazard. *Malays. J. Microbiol.* 12(1), 112-115.
20. AKSU, H., BOSTAN, K., ERGÜN, O. (2000). Presence of *Bacillus cereus* in packaged some spices and herbs sold in Istanbul. *Pak. J. Biol. Sci.* 3, 710-712.
21. ALLISON, D. G., SUTHERLAND, I. W. (1987). The role of exopolysaccharides in adhesion of fresh water bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1319-1327.
22. ALTAYAR, M., SUTHERLAND, A. D. (2006). *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. *J. Appl. Microbiol.* 100(1), 7-14.
23. ALTEKRUSE, S. F., COHEN, M. L., SWERDLOW, D. L. (1997). Emerging foodborne diseases. *Emerging Infect. Dis.* 3(3), 285-293.
24. AN, S., WU, J., ZHANG, L. H. (2010). Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersal by a cyclic-di-gmp phosphodiesterase with a putative hypoxiasensing domain. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(24), 8160-8173.
25. ANDERSSON, A., RONNER, U., GRANUM, P. E. (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *Int. J. Food Microbiol.* 28, 145-155.
26. ANDERSSON, M. A., JÄÄSKELÄINEN, E. L., SHAHEEN, R., PIRHONEN, T., WIJNANDS, L. M., SALKINOJASALONEN, M. S. (2004). Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. *Int. J. Food Microbiol.* 94(2), 175-183.
27. ANDERSSON, M. A., MIKKOLA, R., HELIN, J., ANDERSSON, M. C., SALKINOJA-SALONEN, M. (1998). A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1338-1343.
28. ANDREWS, J. M., WISE, R. (2002). Susceptibility testing of *Bacillus* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 1040-1042.
29. ANKOLEKAR, C., RAHMATI, T., LABBE, R. G. (2009). Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 460-466.
30. ANONYME (2011). Épidémiologie des toxi-infections alimentaires collectives en Tunisie. Bienne 2010-2011.
31. ANONYMOUS. (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA J.* 14(7) : 4524. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4524
32. AOUADHI, C., MAAROUFI, A., MEJRI S. (2013). Incidence and characterization of aerobic spore-forming bacteria originating from dairy milk in Tunisia. *Int. J. Dairy Technol.* 67, 95-102.
33. AOUED, L., BENLARABI, S., SOULAYMANI-BENCHEIKH, R. (2010). Maladies d'origine alimentaire Définitions, Terminologie, Classifications. *Toxicol. Maroc.* 6, 1-16.
34. APREA, G., D'ANGELO, D. R., PRENCIPE, V. A., MIGLIORATI, G. (2015). Bacteriophage morphological characterization by using transmission electron microscopy. *J. Life Sci.* 9, 214-220.
35. ARAGON-ALEGRO, L. C., PALCICH, G., VOLZ-LOPES, G., RIBEIRO, V. B., LANDGRAF, M., DESTRO, M. T. (2008). Enterotoxigenic and Genetic Profiles of *Bacillus cereus* Strains of

- Food Origin in Brazil. *J. Food Prot.* 71(10), 2115-2118.
36. ARSLAN, S., EYI, A., KÜÇÜKSARI, R. (2014). Toxigenic genes, spoilage potential, and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* group strains from ice cream. *Anaerobe* 25, 42-46.
 37. 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.
 38. ASH, C., FARROW, J. A. E., 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.
 39. ASHRAF, M. A., ULLAH, S., AHMAD, I., QURESHI, A. K., BALKHAIR, K. S., ABDUR REHMAN, M. (2014). Green biocides, a promising technology: current and future applications to industry and industrial processes. *J. Sci. Food Agric.* 94, 388-403.
 40. ATTERBURY, R. J., CONNERTON, P. L., DODD, C. E., REES, C. E., CONNERTON, I. F. (2003). Isolation and characterization of *Campylobacter* bacteriophages from retail poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4511-4518.
 41. 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(4), 1276-1280.
 42. BAGGE, D., HJELM, M., JOHANSEN, C., HUBER, I., GRAM, L. (2001). *Shewanella putrefaciens* Adhesion and Biofilm Formation on Food Processing Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2319-2325.
 43. BAGGE-RAVN, D., NG, Y., HJELM, M., CHRISTANSEN, J. N., JOHANSEN, C., GRAM, L. (2003). The microbial ecology of processing equipment in different fish industries—analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 239-250.
 44. BANDARA, N., JO, J., RYU, S., KIM, K. P. (2012). Bacteriophages BCP1–1 and BCP8–2 require divalent cations for efficient control of *Bacillus cereus* in fermented foods. *Food Microbiol.* 31, 9-16.
 45. BANERJEE, M., NAIR, G. B., RAMAMURTHY, T. (2011). Phenotypic & genetic characterization from the acute diarrhoeal patients. *Indian J. Med. Res.* 133, 88-95.
 46. BARON, F., COCHET, M. F., ABLAIN, W., GROSSET, N., MADEC, M. N., GONNET, F., JAN, S., GAUTIER, M. (2006). Rapid and cost-effective method for microorganism enumeration based on miniaturization of the conventional plate-counting technique. *Le Lait* 86, 251-257.
 47. BARON, F., COCHET, M. F., GROSSET, N., MADEC, M. N., BRIANDET, R., DESSAIGNE, S., CHEVALIER, S., GAUTIER, M., JAN, S. (2007). Isolation and characterization of a psychrotolerant toxin producer, *Bacillus weihenstephanensis*, in liquid egg products. *J. Food Prot.* 70(12), 2782-2791.
 48. 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(6), 1967-1975.

49. BARTOSZEWICZ, M., HANSEN, B. M., SWIECICKA, I. (2008). The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiol.* 25(4), 588-596.
50. BASSI, D., COLLA, F., GAZZOLA, S., PUGLISI, E., DELLEDONNE, M., COCCONCELLI, P. (2016). Transcriptome analysis of *Bacillus thuringiensis* spore life, germination and cell outgrowth in a vegetable-based food model. *Food Microbiol.* 55, 73-85.
51. BAUER, A. W., KIRBY, W. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493- 496.
52. BAUER, T., STARK, T., HOFMANN, T., EHLING-SCHULZ, M. (2010). Development of a stable isotope dilution analysis for the quantification of the *Bacillus cereus* toxin cereulide in foods. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1420-1428.
53. BEDI, S. K., SHARMA, C. S., GILL, J. P. S., AULAKH, R. S., SHARMA, J. K. (2005). Incidence of enterotoxigenic *B. cereus* in milk and milk products. *J. Food Sci. Tech.* 42, 272-275.
54. BEECHER, D. J., MACMILLAN, J. D. (1990). A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 58, 2220-2227.
55. BEECHER, D. J., MACMILLAN, J. D. (1991). Characterization of the components of hemolysin-bl from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 59, 1778-1784.
56. BEECHER, D. J., OLSEN, T. W., SOMERS, E. B., WONG, A. C. (2000). Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C, and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis. *Infect. Immun.* 68(9), 5269-5276.
57. 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(1), 233-239.
58. BELLON-FONTAINE, M. N., RAULT, J., VAN OSS, C. J. (1996). Microbial adhesion to solvents, a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloid. Surface. B.* 7, 47-53.
59. BERNHARD, K., SCHREMPF, H., GOEBEL, W. (1978). Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 133, 897-903.
60. BHUNIA, A. (2007). Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis. Springer, New-York, 276 pp.
61. BIELKE, L. R., HIGGINS, A. M., DONOGHUE, A. M., DONOGHUE, D. J., HARGIS, B. M. (2007). *Salmonella* host range of bacteriophages that infect multiple genera. *Poult. Sci.* 86, 2536-2540.
62. BIESTA-PETERS, E. G., REIJ, M. W., BLAAUW, R. H., IN 'TVELD, P. H., RAJKOVIC, A., EHLING-SCHULZ, M., ABEE, T. (2010). Quantification of the emetic toxin cereulide in food products by liquid chromatography-mass spectrometry using synthetic cereulide as a standard. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7466-7472.
63. BINETTI, A. G., REINHEIMER, J. A. (2000). Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants. *J. Food Prot.* 63, 509-515.
64. BIOMÉRIEUX. (2016). Le Point sur *Bacillus cereus*. Available at: http://www.biomerieux.fr/sites/subs diary_fr/files/point_sur_bacillus_cereus_fevrier2016.pdf

65. BONERBA, E., DI PINTO, A., NOVELLO, L., MONTEMURRO, F., TERIO, V., COLAO, V., CICCARESE, G., TANTILLO, G. (2010). Detection of potentially enterotoxigenic food-related *Bacillus cereus* by PCR analysis. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45, 1310-1315.
66. BORCH, E., ARINDER, P. (2002). Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. *Meat. Sci.* 62, 381- 390.
67. BOTTONE, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 23(2), 382-398.
68. BOULANGE-PETERMANN, L., JULLIEN, C., DUBOIS, P. E., BENEZECH, T., FAILLE, C. (2004). Influence of surface chemistry on the hygienic status of industrial stainless steel. *Biofouling* 20, 25-33.
69. BOURGEOIS, C. M., LARPENT, J. P. (1996). Microbiologie alimentaire tome 2 : aliments fermentés et fermentations alimentaire. Lavoisier, Paris.
70. BRANDA, S. S., VIK, S., FRIEDMAN, L., KOLTER, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13, 20-26.
71. BRAVO, A., LIKITVIVATANAVONG, S., GILL, S. S., SOBERÓN, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41(7), 423-431.
72. BREMER, P. J., FILLERY, S., MCQUILLAN, A. J. (2006). Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 254-262.
73. BRIDIER, A., BRIANDET, R., THOMAS, V., DUBOIS-BRISSONNET, F. (2011). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* 27, 1017-1032.
74. BRIDIER, A., SANCHEZ-VIZUETE, P., GUILBAUD, M., PIARD, J. C., NAÏTALI, M., BRIANDET, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food microbiol.* 45, 167-178.
75. BRILLARD, J., LERECLUS, D. (2004). Comparison of cytotoxin cytK promoters from *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 and from a *Bacillus cereus* food-poisoning strain. *Microbiology* 150, 2699-2705.
76. BROOKS, J. D., FLINT, S. H. (2008). Biofilms in the food industry : problems and potential solutions. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43(12), 2163-2176.
77. BRÜCKER, G. (2003). Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. MDO infos n° 5 décembre. Available at: http://invs.santepubliquefrance.fr/content/download/30506/155552/version/1/file/mdo_infos_05.pdf
78. BRYAN, F. L. (1982). Diseases transmitted by foods: a classification and summary. Center for Disease Control, Atlanta, 101pp.
79. 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. *BEH*, 45-49.
80. 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.

81. CALLEGAN, M. C., COCHRAN, D. C., KANE, S. T., RAMADAN, R. T., CHODOSH, J., MCLEAN, C., STROMAN, D. W. (2006). Virulence factor profiles and antimicrobial susceptibilities of ocular *Bacillus* isolates. *Curr. Eye Res.* 31(9), 693-702.
82. CARLIN, F., BRILLARD, J., BROUSSOLLE, V., CLAVEL, T., DUPORT, C., JOBIN, M., GUINEBRETIERE, M. H., AUGER, S., SOROKINE, A., NGUYEN-THE, C. (2010). Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous world wide distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food res. Int.* 43(7), 1885-1894.
83. CARLIN, F., FRICKER, M., PIELAAT, A., HEISTERKAMP, S., SHAHEEN, R., SALKINOJA SALONEN, M. S., SVENSSON, B., NGUYEN-THE, 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.
84. CARLING, P., FUNG, T., KILLION, A., TERRIN, N., BARZA, M. (2003). Favorable impact of a multidisciplinary antibiotic management program conducted during 7 years. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 24(9), 699-706.
85. CARLSON, C. R., CAUGANT, D. A., KOLSTO, A. B. (1994). Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(6), 1719-1725.
86. CARPENTIER, B., CERF, O. (1993). A review: Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 499-511.
87. CASTIAUX, V., LALOUX, L., SCHNEIDER, Y. J., MAHILLON, J. (2016). Screening of Cytotoxic *B. cereus* on Differentiated Caco-2 Cells and in Co-Culture with Mucus-Secreting (HT29-MTX) Cells. *Toxins (Basel)* 8 (11), 1-20.
88. CASTIAUX, V., LIU, X., DELBRASSINNE, L., MAHILLON, J. (2015). Is Cytotoxin K from *Bacillus cereus* a bona fide enterotoxin? *Int. J. Food Microbiol.* 211, 79-85.
89. CERF, O. (2002). Risques bactériens liés aux produits laitiers. *Revue Française des Laboratoires*, 67-69.
90. CEUPPENS, S., RAJKOVIC, A., HEYNDRIKX, M., TSILIA, V., VAN DE WIELE, T., BOON, N., UYTENDAELE, M. (2011). Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Crit. Rev. Microbiol.* 37(3), 188-213.
91. CHANGANI, S. D., BELMAR-BEINY, M. T., FRYER, P. J. (1997). Engineering and chemical factors associated with fouling and cleaning in milk processing. *Exp. Therm. Fluid Sci.* 14, 392-406.
92. CHARACKLIS, W. G., MARSHALL K. C. (1990). *Biofilms*. John Wiley, New York, USA.
93. CHAVES, J. Q., PIRES, E. S., VIVONI, A. M. (2011). Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades. *Int. J. Food Microbiol.* 147, 12-16.
94. CHEN, G. (2012). *Escherichia coli* adhesion to abiotic surfaces in the presence of nonionic surfactants. *J. Adhes. Sci. Technol.* 17, 2131-2139.
95. CHEN, Y., BUSSCHER, H. J., VAN DER MEI, H. C., NORDE, W. (2011). Statistical analysis of long- and short-range forces involved in bacterial adhesion to substratum surfaces as measured using atomic force microscopy. *Appl Environ Microbiol.* 77, 5065-5070.
96. CHEN, Y., SUCCI, J., TENOVER, F. C., KOEHLER, T. M. (2003). Beta-lactamase genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain. *J. Bacteriol.* 185, 823-830.
97. CHMIELEWSKI, R., FRANK, J. (2003). Biofilm formation and control in food processing

- facilities. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2(1), 22-32.
98. CHOI, N. C., PARK, S. J., LEE, C. G., PARK, J. A., KIM S. B. (2011). Influence of surfactants on bacterial adhesion to metal oxide-coated surfaces. *Environ. Eng. Res.* 16, 219-225.
 99. CHOMA, C., GRANUM, P. E. (2002). The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. *FEMS Microbiol. Lett.* 217, 115-119.
 100. CHOMA, C., GUINEBRETIERE, M. H., CARLIN, F., SCHMITT, P., VELGE, P., GRANUM, P. E., NGYYEN-THE, C. (2000). Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *J. App. Microbiol.* 88, 617-625.
 101. CHON, J. W., KIM, J. H., LEE, S. J., HYEON, J. Y., SEO, K. H. (2012). Toxin profile, antibiotic resistance, and phenotypic and molecular characterization of *Bacillus cereus* in Sunsik. *Food Microbiol.* 32, 217-222.
 102. CHRISTIANSSON, A., NAIDU, A. S., NILSSON, I., WADSTROM, T., PETTERSSON, H. E. (1989). Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2595-2600.
 103. CLAIR, G., ROUSSI, S., ARMENGAUD, J., DUPORT, C. (2010). Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 1486-1498.
 104. CLARK, A. E., KALETA, E. J., ARORA, A., AND WOLK, D. M. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight massspectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 547-603.
 105. CLARK, F. E. (1937). The Relation of *Bacillus siamensis* and Similar Pathogenic Spore-forming Bacteria to *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 33, 435-443.
 106. CLAUS, D., BERKELEY, R. C. W. (1986). Genus *Bacillus*. In P. H. A. Sneath, Mair, N. S. Sharpe, M. E., Holt, J. G. (The Williams & Wilkins Baltimore, Bergey's Manual of systematic Bacteriology), 2, 1104-1139 pp.
 107. CLIVER, D. O., and RIEMANN, H. (2002). Foodborne diseases. Academic Press, 424pp.
 108. CLOETE, T. E., JACOBS, L. (2001). Surfactants and the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to 3CR12 stainless steel and glass. *Water SA* 27, 21-26.
 109. COLLADO, J., FERNANDEZ, A., RODRIGO, M., CAMATS, J., LOPEZ, A. M. (2003). Kinetics of deactivation of *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiol.* 20, 545-548.
 110. CORBIN, B. D., MCLEAN, R. J. C., ARON G. M. (2001). Bacteriophage T4 multiplication in a glucose-limited *Escherichia coli* biofilm. *Can. J. Microbiol.* 47, 680-684.
 111. CORPET, D. (2014). Dangers biologiques des aliments-TIAC. ENVT cours A3-2014. Available at: <http://fcorpet.free.fr/Denis/W/Cours-TIAC-toxiinfections-bacteries-aliments-Poly.doc.pdf>
 112. COSTERTON, J. W., LAPPIN-SCOTT, H. M. (1989). Behavior of bacteria in biofilms. *Am. Soc. Microbiol. News* 55, 650-654.
 113. CREMONESI, P., PISANI, L. F., LECCHI, C., CECILIANI, F., MARTINO, P., BONASTRE, A. S., KARUS, A., BALZARETTI, C., CASTIGLIONI, B. (2014). Development of 23 individual TaqMan(R) real-time PCR assays for identifying common foodborne pathogens using a single set of amplification conditions. *Food Microbiol.* 43, 35-40.
 114. CUI, Y., LIU, Y., LIU, X., XIA, X., DING, S., ZHU, K. (2016). Evaluation of the toxicity and toxicokinetics of cereulide from an emetic *Bacillus cereus* strain of milk origin. *Toxins (Basel)* 8(6). doi: 10.3390/toxins8060156.

115. DALMASSO, M., DE HAAS, E., NEVE, H., STRAIN, R., COUSIN, F. J., STOCKDALE, S. R., ROSS, R. P., HILL, C. (2015). Isolation of a Novel Phage with Activity against *Streptococcus mutans* Biofilms. *PLOS ONE* 10(9) : e0138651.
116. DARYAEI H., BALASUBRAMANIAM V. M., LEGAN J. D. (2013). Kinetics of *Bacillus cereus* spore inactivation in cooked rice by combined pressure-heat treatment. *J. Food Prot.* 560-735.
117. DAS, S., SURENDRAN, P. K., THAMPURAN, N. (2009). PCR-based detection of enterotoxigenic isolates of *Bacillus cereus* from tropical seafood. *Indian J. Med. Res.* 129, 316-320.
118. DAVEY, P., BROWN, E., FENELON, L., FINCH, R., GOULD, I., HARTMAN, G., HOLMES, A., RAMSAY, C., TAYLOR, E., WILCOX, M., WIFFEN, P. (2005). Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital in patients, *Cochrane D. B. Syst. Rev.* (4):CD003543.
119. DE BUYSER, M. L., GUINEBRETIERE, M. H., AUJAMES, M., SCHIAULINI, M. A., THERY-CHAMARD, B., LANGLOIS, R., GALITA, C., PARIENTE KHAYAT, A., DAO, T. T. (2008). Investigation d'une TIAC en maison de retraite : un cocktail de *Bacillus cereus*. *ANSES-Bulletin Epidémiologique*.
120. DE MAN, P., VERHOEVEN, B. A. N., VERBRUGH, H. A., VOS, M. C., VAN DEN ANKER, J. N. (2000). An antibiotic policy to prevent emergence of resistant *bacilli*. *Lancet* 355(9208), 973-978.
121. DEBUONO, B. A., BRONDUM, J., KRAMER, J. M., GILBERT, R.J., OPAL, S. M. (1988). Plasmid, serotypic, and enterotoxin analysis of *Bacillus cereus* in an outbreak setting. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1571-1574.
122. DELMAS G., DA SILVA J.N., PIHIER N., WEILL F.X., VAILLANT V., DE VALK H. (2010). Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. *Bull. Epidémiol. Hebd.* 31, 344-348.
123. DE PALMENAER, D., VERMEIREN, C., MAHILLON, J. (2004). IS231-MIC231 elements from *Bacillus cereus* sensu lato are modular. *Mol. Microbiol.* 53, 457-467.
124. DEQUEIROZ, G. A., DAY, D. F. (2008). Disinfection of *Bacillus subtilis* spore-contaminated surface materials with a sodium hypochlorite and a hydrogen peroxide-based sanitizer. *Lett. Appl. Microbiol.* 46,176-180.
125. DI FRANCO, C., BECCARI, E., SANTINI, T., PISANESCHI, G., TECCE, G. (2002). Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*. *BMC Microbiol.* 2(33). doi: [10.1186/1471-2180-2-33](https://doi.org/10.1186/1471-2180-2-33)
126. 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(8), 4277-4279.
127. DIETRICH, R., FELLA, C., STRICH, S., MÄRTLBAUER, E. (1999). Production and characterization of monoclonal antibodies against the hemolysin BL enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4470-4474.
128. DIETRICH, R., MORAVEK, M., BÜRK, C., GRANUM, P.E., MÄRTLBAUER, E. (2005). Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *B. cereus* non hemolytic enterotoxin complex. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8214-8220.
129. DOLL, V. M., EHLING-SCHULZ, M., VOGELMANN, R. (2013). Concerted action of

- sphingomyelinase and nonhemolytic enterotoxin in pathogenic *Bacillus cereus*. *PLOS ONE* 8(4) : e61404.
- 130.** DONLAN, R. M. (2009). Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiol.* 17, 66-72.
- 131.** DROBNIEWSKI, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 324-338.
- 132.** DROMIGNY, E. (2008). *Bacillus cereus*. Lavoisier, Paris.
- 133.** DUBOUIX, A., BONNET, E., ALVAREZ, M., BENSAFI, H., ARCHAMBAUD, M., CHAMINADE B. (2005). *Bacillus cereus* infections in traumatology – orthopaedics department : Retrospective investigation and improvement of healthcare practices. *J. Infect.* 50(1), 22-30.
- 134.** DUCKWORTH, D. H., GLENN, J., MCCORQUODALE, D. J. (1981). Inhibition of bacteriophage replication by extrachromosomal genetic element. *Microbiol. Rev.* 45, 52-71.
- 135.** DUNNE, W. M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 155-166.
- 136.** 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.
- 137.** DRULIS-KAWA, Z., MAJKOWSKA-SKROBEK, G., MACIEJEWSKA, B., DELATTRE, A. S., LAVIGNE, R. (2012). Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr. Protein Pept Sci.* 13(8), 699-722.
- 138.** DZIECIOL, M., FRICKER, M., WAGNER, M., HEIN, I., EHLING-SCHULZ, M. (2013). A novel diagnostic real-time PCR assay for quantification and differentiation of emetic and non-emetic *Bacillus cereus*. *Food Control* 32, 176-185.
- 139.** EFSA (2009). The use and mode of action of bacteriophages in food production. *EFSA J.* 7(5), 1076.
- 140.** EFSA (2011). Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA J.* 9, 2090.
- 141.** EFSA (2012). Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA J.* 10, 2597.
- 142.** EFSA (2014). Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA J.* 12, 3547.
- 143.** EFSA (2015a). Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.* 13, 3991.
- 144.** EFSA (2015b). Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA J.* 13, 4329.
- 145.** EFSA (2016). Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* 14, 4634.

146. EFSA (2017). Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J.* 15, 5077.
147. EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (2005). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. *EFSA J.* 175, 1-48.
148. EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA J.* 14, 4524-4531.
149. EFSA. (2013). Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA J.* 11, 3129.
150. EHLING-SCHULZ, M., FRICKER, M., SCHERER, S. (2004a). *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol. Nutr. Food Res.* 48(7), 479-487.
151. EHLING-SCHULZ, M., FRICKER, M., SCHERER, S. (2004b). Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiol. Lett.* 232(2), 189-195.
152. EHLING-SCHULZ, M., GUINEBRETIERE, M. H., MONTHAN, A., BERGE, O., FRICKER, M., SVENSSON, B. (2006). Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 260, 232–240.
153. EHLING-SCHULZ, M., LERECLUS, D., KOEHLER, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiol. Spectr.* 7(3). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018.
154. EHLING-SCHULZ, M., MESSELHÄUSSER, U. (2013). *Bacillus* “next generation” diagnostics: moving from detection toward subtyping and risk-related strain profiling. *Front. Microbiol.* 4. doi: 10.3389/fmicb.2013.00032
155. EHLING-SCHULZ, M., VUKOV, N., SCHULZ, A., SHAHEEN, R., ANDERSSON, M., MÄRTLBAUER, 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(1), 105-113.
156. EL-ARABI, T. F., GRIFFITHS, M. W., SHE, Y. M., VILLEGAS, A., LINGOHR, E. J., KROPINSKI, A. M. (2013). Genome sequence and analysis of a broad-host range lytic bacteriophage that infects the *Bacillus cereus* group. *Viol. J.* 10, 48.
157. ENDERSEN, L., O’MAHONY, J., HILL, C., ROSS, R. P., MCAULIFFE, O., COFFEY, A. (2014). Phage therapy in the food industry. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 5, 327-349.
158. ENEROTH, A., SVENSSON, B., MOLIN, G., CHRISTIANSSON, A. (2001). Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the filling machine. *J. Dairy Res.* 68(2),189-196
159. ESBELIN, J., ARMENGAUD, J., ZIGHA, A., DUPORT, C. (2009). ResDE-dependent regulation of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus*: Evidence for multiple modes of binding for ResD and interaction with Fnr. *J. Bacteriol.* 191, 4419-4426.
160. ESBELIN, J., JOUANNEAU, Y., DUPORT, C. (2012). *Bacillus cereus* Fnr binds a [4Fe-4S] cluster and forms a ternary complex with ResD and PlcR. *BMC Microbiol.* 12:125. doi: 10.1186/1471-2180-12-125.
161. FAGERLUND, A., LINDBÄCK, 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(3), 693-704.
- 162.** FAGERLUND, A., WEEN, O., LUND, T., HARDY, S. P., GRANUM, P. E. (2004). Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology* 150(8), 2689-2697.
- 163.** FAILLE, C., BENEZECH, T., BLEL, W., RONSE, A., RONSE, G., CLARISSE, M., SLOMIANNY, C. (2013). Role of mechanical vs. chemical action in the removal of adherent *Bacillus* spores during CIP procedures. *Food. Microbiol.* 33, 149-157.
- 164.** FAILLE, C., BENEZECH, T., MIDELET-BOURDIN, G., LEQUETTE, Y., CLARISSE, M., RONSE, G., RONSE, A., SLOMIANNY, C. (2014). Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: a potential source of contamination in food processing environments. *Food Microbiol.* 40, 64-74.
- 165.** FAILLE, C., FONTAINE, F., BENEZECH, T. (2001). Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. *J. Appl. Microbiol.* 90, 892-900.
- 166.** FAILLE, C., JULLIEN, C., FONTAINE, F., BELLON-FONTAINE, M.N., SLOMIANNY, C., BENEZECH, T. (2002). Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Can. J. Microbiol.* 48, 728-738.
- 167.** FAILLE, C., SYLLA, Y., LE GENTIL, C., BENEZECH, T., SLOMIANNY, C., LEQUETTE, Y. (2010). Viability and surface properties of spores subjected to a cleaning-in-place procedure: consequences on their ability to contaminate surfaces of equipment. *Food Microbiol.* 27:769-776.
- 168.** FATEMI, P., FRANK, J. F. (1999). Inactivation of *Listeria monocytogenes*/ *Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *J. Food Prot.* 62, 761-765.
- 169.** FENDRI, I., BEN HASSENA, A., GROSSET, N., BARKALLAH, M., KHANNOUS, L., CHUAT, V., GAUTIER, M., GDOURA, R. (2013). Genetic Diversity of Food-Isolated *Salmonella* Strains through Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR). *PLOS ONE* 8 : e81315.
- 170.** FERNANDES, M., LEITE, A., BASTO, M., NOBRE, M. A., VIEIRA, N., FERNANDES, R., NOGUEIRA, P., NICOLA, P. J. (2014). Non-adherence to antibiotic therapy in patients visiting community pharmacies. *Int J Clin Pharm.* 36(1), 86-91.
- 171.** FERNÁNDEZ-NO, I. C., GUARDDON, M., BÖHME, K., CEPEDA, A., CALO-MATA, P., BAROSS-VELÁZQUEZ, J. (2011). Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR. *Food Microbiol.* 28, 605-610.
- 172.** 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* 37, 2235-2247.
- 173.** FINLAY, W. J., LOGAN, N. A., SUTHERLAND, A. D. (1999). Semi automated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1811-1812.
- 174.** FISCHETTI, V. A. (2010). Bacteriophage endolysins : a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 300(6), 357-362.
- 175.** FISCHETTI, V.A. (2008). Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 393-400.
- 176.** FLEMMING, H.C., WINGENDER, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623-633.
- 177.** FLINT, S. H., BREMER, P. J., BROOKS, J. D. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant—

- description, current concerns and methods of control. *Biofouling* 11, 81-97.
- 178.** FLORISTEAN, V., CRETU, C., CARP CARARE, M. (2007). Bacteriological characteristics of *Bacillus cereus* isolates from poultry. *Bulletin USAMV-CN* 64, 425-430.
- 179.** FLUIT, A. C., MAARTEN, R. V., SCHMITZ, F. J. (2001). Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 836-871.
- 180.** FOGLE, B., GRANTA, R., VALCIŃA, O., BĚRZIŃŠ, A. (2018). Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. *Food Control* 83, 69-74.
- 181.** FOOD STANDARDS AUSTRALIA NEW ZEALAND [FSANZ] (2001). Guidelines for microbiological examination of ready-to-eat foods. Available at: www.foodstandards.gov.au/publications/Pages/guidelinesformicrobi1306.aspx
- 182.** FORMINSKA, K., ZASADA, A. A., JAGIELSKI, M. (2012). Evaluation of multiplex PCR to identify the species of microorganisms from *Bacillus cereus* group. *Medycyna Doswiadczalna i Mikrobiologia* 64, 101–108.
- 183.** FOUTS, D. E., RASKO, D. A., CER, R. Z., JIANG, L. X., FEDOROVA, N. B., SHVARTSBEYN, A., VAMATHEVAN, J. J., TALLON, L., ALTHOFF, R., ARBOGAST, T. S., FADROSH, D. W., READ, T. D., GILL, S. R. (2006). Sequencing *Bacillus anthracis* typing phages gammaand cherry reveals a common ancestry. *J. Bacteriol.* 188, 3402-3408.
- 184.** FRANCIS, K. P., MAYR, R., VON STETTEN, F., STEWART, G. S., SCHERER, S. (1998). Discrimination of psychotropic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9),3525-3529.
- 185.** FRANK, J. F., KOFFI, R. A. (1990). Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactants, sanitizers and heat. *J. Food Prot.* 53, 550-554.
- 186.** FRANKLAND, G. C., FRANKLAND, P. F. (1887). Studies on some new micro-organisms obtained from air. *Philos.Trans. R. Soc. Lond. B., Biol. Sci.* 178, 257-287.
- 187.** FRENZEL, E., LETZEL, T., SCHERER, S., EHLING-SCHULZ, M. (2011). Inhibition of cereulide toxin synthesis by emetic *Bacillus cereus* via long-chain polyphosphates. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1475-1482.
- 188.** FRICKER, M., REISSBRODT, R., EHLING-SCHULZ, M. (2008). Evaluation of standard and new chromogenic selective plating media for isolation and identification of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 121(1), 27-34.
- 189.** FULLER, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. App. Bacteriol.* 66(5), 365-378.
- 190.** FULLER, R. (1991). Probiotics in Human Medicine. *Gut* 32(4), 434-442.
- 191.** GARCIA, K. C. O. D., CORREA, I. M. O., PEREIRA, L. Q., SILVA, T. M., MIONI, M. S. R., IZIDORO, A. C. M., BASTOS, I. H. V., GONÇALVES, G. A. M., OKAMOTO, A. S., ANDREATTI FILHO, R. L. (2017). Bacteriophage use to control *Salmonella* biofilm on surfaces present in chicken slaughterhouses. *Poult. Sci.* 96(9), 3392-3398.
- 192.** GARCIA, P., MARTINEZ, B., OBESO, J. M., RODRIGUEZ, A. (2008). Bacteriophages and their application in food safety. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 479-485.
- 193.** GARCIA-CALVO, J., IBEAS, S., ANTON-GARCIA, E. C., TORROBA, T., GONZALEZ-AGUILAR, G., ANTUNES, W., GONZALEZ-LAVADO, E., FANARRAGA M. L. (2017). Potassium-Ion-Selective Fluorescent Sensors To Detect Cereulide, the Emetic Toxin of *B. cereus*, in Food Samples and HeLa Cells. *ChemistryOpen* 6(4), 562-570.
- 194.** GARRY, P., CHRISTIEANS, S., CARTIER, P. (2008). Les procédés de biopréservation

- alimentaire. *Sciences des Aliments* 28(4), 327.
- 195.** GENG, P., TIAN, S., YUAN, Z., HU, X. (2017). Identification and genomic comparison of temperate bacteriophages derived from emetic *Bacillus cereus*. *PLOS ONE* 12 : e0184572.
- 196.** GILBERT, R. J., KRAMER, J. M. (1986). *Bacillus Cereus* Food Poisoning. In *Progress in Food Safety: Proceedings of Symposium*. Cliver D. C., Cochrane B. A. Food Research Institute, University of Wisconsin, Madison, 85-93 pp.
- 197.** GILLIS, A., MAHILLON, J. (2014). Phages Preying on *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*: Past, Present and Future. *Viruses* 6, 2623-2672.
- 198.** GILOIS, N., RAMARAO, N., BOUILLAUT, L., PERCHAT, S., AYMERICH, S., NIELSEN-LEROUX, C., LERECLUS, D., GOHAR, M. (2007). Growth-related variations in the *B. cereus* secretome. *Proteomics* 7, 1719-1728.
- 199.** GIUSEPPE, A., DANIELA, D., ARIANNA, B., PHILIPPA, C., CONNERTONIAN, SILVIA, S., FRANCESCA, M., FRANCESCO, P., GIACOMO, M., NICOLA, D., ELISABETTA, D. G. (2018). Isolation and Morphological Characterization of New Bacteriophages Active against *Campylobacter jejuni*. *Am. J. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 1(1): 1004.
- 200.** GÖDEKE, J., PAUL, K., LASSAK, J., THORMANN, K. M. (2011). Phage-induced lysis enhances biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *ISME J.* 5(4), 613-626.
- 201.** 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(7) : e2793.
- 202.** GOHAR, M., OKSTAD, O. A., GILOIS, N., SANCHIS, V., KOLSTO, A. B., LERECLUS, D. (2002). Twodimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics* 2, 784-791.
- 203.** GONG, C., JIANG, X. (2017). Application of bacteriophages to reduce *Salmonella* attachment and biofilms on hard surfaces. *Poult. Sci.* 96(6), 1838-1848.
- 204.** GRANUM P. E. (2007). *Bacillus cereus*. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Doyle M., Beuchat L. ASM Press, Washington, 445-456 pp.
- 205.** GRANUM, P. E. (1994) *Bacillus cereus* and its toxins. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* 23, 61S-66S.
- 206.** Granum, P. E. (2001). *Bacillus cereus*. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Doyle M. P. ASM Press, Washington, 373-381 pp.
- 207.** GRANUM, P. E., BRYNESTAD, S., KRAMER, J. M. (1993). Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int. J. Food Microbiol.* 17, 269-279.
- 208.** GRANUM, P. E., LUND, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 157(2), 223-228.
- 209.** 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.
- 210.** GRANUM, P.E., TOMAS, J.M., ALOUF, J.E. (1995). A survey of bacterial toxins involved in food poisoning: a suggestion for bacterial food poisoning toxin nomenclature. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 129-144.
- 211.** GRAUMANN, P., MARAHIEL, M. A. (1996). Some like it cold : response of microorganisms to cold shock. *Arch. Microbiol.* 166(5), 293-300.
- 212.** GUÉRIN, A. (2016). Comportement de la bactérie pathogène *Bacillus cereus* dans des

- aliments prêts à l'emploi - Impact des conditions physico-chimiques. Phd thesis, Montpellier SupAgro, France.
- 213.** GUÉRIN, A., RØNNING, H. T., DARGAIGNARATZ, C., CLAVEL, T., BROUSSOLLE, V., MAHILLON, J., GRANUM P. E., NGUYEN-THE, C. (2017). Cereulide production by *Bacillus weihenstephanensis* strains during growth at different pH values and temperatures. *Food Microbiol.* 65, 130-135.
- 214.** 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.
- 215.** 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(1), 31-40.
- 216.** 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.
- 217.** 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 (1), 74-80.
- 218.** GUINEBRETIERE, M. H., SANCHIS, V. (2003). *Bacillus cereus sensu lato*. *Bulletin de la société Française de Microbiologie* 18, 95-103.
- 219.** GUINEBRETIERE, M. H., THOMPSON, F. L., SOROKIN, A., NORMAND, P., DAWYND, P., EHLING-SCHULZ, M., SVENSSON, B., SANCHIS, V., NGUYEN-THE, C., HEYNDRIK, M., DEVOS, P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ. Microbiol.* 10, 851-865.
- 220.** GUINEBRETIERE, M. H., VELGE, P., COUVERT, O., CARLIN, F., DEBUYSER, M. L. (2010). Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *J. Clin. Microbiol.* 48(9), 3388-3391.
- 221.** GUINEBRETIERE, M., NGUYEN-THE, C. (2003). Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 207-215.
- 222.** GUTIERREZ, D., RODRIGUEZ-RUBIO, L., MARTINEZ, B., RODRIGUEZ, A., GARCIA, P. (2016). Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Front. Microbiol.* 7 : 825. doi: 10.3389/fmicb.2016.00825
- 223.** HAEGHBAERT, S., LE QUERREC, F., BOUVET, P., GALLAY, A., ESPIE, E., VAILLANT, V. (2002). Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. *Bull. Epidemiol. Hebd.* 50, 249-254.
- 224.** HÄGGBLUM, M. M., APETROAIE, C., ANDERSSON, M. A., SALKINOJA-SALONEN, M. S. (2002). Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(5), 2479-2483.
- 225.** 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.
- 226.** HANSEN, B. M., HØIBY, P. E., JENSEN, G. B., HENDRIKSEN, N. B. (2003). The *Bacillus cereus*

- bceT enterotoxin sequence reappraised. *FEMS Microbiol. Lett.* 223, 21-24.
- 227.** HANTKE, K. (1978). Major outer membrane protein of *Escherichia coli* k12 serve as receptors for the phage T2 (protein 1a) and 434 (protein 1b). *Mol. Gen. Genet.* 164, 131-135.
- 228.** HARBOTTLE, H., WHITE, D.G., MCDERMOTT, P.F., WALKER, R.D., ZHAO, S. (2006). Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2449-2457.
- 229.** 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(1), 47-51.
- 230.** HARRELL, L. J., ANDERSEN, G. L., WILSON K. H. (1995). Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. *J. Clin. Microbiol.* 33(7), 1847-1850.
- 231.** HARIRAM, U., LABBÉ, R. (2015). Spore prevalence and toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates from U.S. retail spices. *J. Food Prot.* 78(3), 590-596.
- 232.** HARPER, D. R., PARRACHO, H. M., WALKER, J., SHARP, R., HUGHES, G., WERTHÉN, M., LEHMAN, S., MORALES, S. (2014). Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics* 3(3),270–284.
- 233.** HAUG, T. M., SAND, S. L., SAND, O., PHUNG, D., GRANUM, P. E., HARDY, S. P. (2010). Formation of very large conductance channels by *Bacillus cereus* Nhe in Vero and GH 4 cells identifies NheA+ B as the inherent pore-forming structure. *J. Membr. Biol.* 237(1), 1-11.
- 234.** HAUGE, S. (1950). Food Poisoning caused by *Bacillus cereus*. A Preliminary Report. *Nordisk Hygienisk Tidsskrift*, 6, 189-206.
- 235.** HAVELAAR, A. H., HAAGSMA, J. A., MANGEN, M. J., KEMMEREN, J. M., VERHOEF, L. P., VIJGEN, S. M., WILSON, M., FRIESEMA, I. H., KORTBEEK, L. M., VAN DUYNHOVEN, Y. T., VAN PELT, W. (2012). Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009. *Int. J. Food Microbiol.* 156(3), 231-238.
- 236.** HAYRAPETYAN, H. (2017). *Bacillus cereus* growth and biofilm formation: the impact of substratum, iron sources, and transcriptional regulator Sigma 54. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands.
- 237.** HEINRICHS, J. H., BEECHER, D. J., MACMILLAN, J. D., ZILINSKAS, B. A. (1993), Molecular cloning and characterization of the gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 175, 6760-6766.
- 238.** HELGASON, E., CAUGANT, D. A., LECADET, M. M., CHEN, Y., MAHILLON, J., LÖVGREN, A., HEGNA, I., KVALØY, K., KOLSTØ, A. B. (1998). Genetic diversity of *Bacillus cereus/Bacillus thuringiensis* isolates from natural sources. *Curr. Microbiol.* 37, 80-87.
- 239.** HELGASON, E., CAUGANT, D. A., OLSEN, I., KOLSTØ, A. B. (2000a). Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. *J. Clin. Microbiol.* 38(4), 1615-1622.
- 240.** HELGASON, E., ØKSTAD, O. A., CAUGANT, D. A., JOHANSEN, H. A., FOUET, A., MOCK, M., HEGNA, I., KOLSTØ, A. B. (2000b). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* — one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 66,2627-2630.
- 241.** HELGASON, E., TOURASSE, N. J., MEISAL, R., CAUGANT, D. A., KOISTE, A. B. (2004). Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl.*

- Environ. Microbiol.* 70, 191-201.
- 242.** HENDRIKSEN, N. B., HANSEN, B. M., JOHANSEN, J. E. (2006). Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89(2), 239–249.
- 243.** HERINGA, S. D., KIM, J. K., JIANG, X., DOYLE, M. P., ERICKSON M. C. (2010). Use of a mixture of bacteriophages for biological control of *Salmonella enterica* strains in compost. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5327-5332.
- 244.** HERNANDEZ, E., RAMISSE, F., CRUEL, T., LE VAGUERESSE, R., CAVALLO, J. D. (1999). *Bacillus thuringiensis* serotype H34 isolated from human and insecticidal strains serotypes 3a3b and H14 can lead to death of immunocompetent mice after pulmonary infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24(1), 43-47.
- 245.** HEYNDRIKX, M. (2011). The importance of endospore-forming bacteria originating from soil for contamination of industrial food processing. *Appl. Environ. Soil Sci.* 2011(11). <http://dx.doi.org/10.1155/2011/561975>.
- 246.** HIBMA, A. M., JASSIM, S. A. A., GRIFFITHS, M. W. (1997). Infection and removal of L-forms of *Listeria monocytogenes* with bred bacteriophage. *Int. J. Food Microbiol.* 34, 197-207.
- 247.** HILL, K. K., TICKNOR, L. O., OKINAKA, R. T., ASAY, M., BLAIR, H., BLISS, K. A., LAKER, M., PARDINGTON, P. E., RICHARDSON, A. P., TONKS, M., BEECHER, D. J., KEMP, J. D., KOLSTO, A. B., WONG, A. C., KEIM, P., JACKSON, P. J. (2015). Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1068–1080.
- 248.** HILTON A.C., BANKS J.G., PENN C.W. (1996). Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) of *Salmonella*: strain differentiation and characterization of amplified sequences. *J. App. Microbiol.* 81, 575-584.
- 249.** 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., MAIDEN, M. C., PRIEST, F. G., BARKER, M., JIANG, L., CER, R. Z., RILSTONE, J., PETERSON, S. N., WEYANT, R. S., GALLOWAY, D. R., READ, T. D., POPOVIC, T., FRASER, C. M. (2004). Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8449-8454.
- 250.** HOLBROOK, R., ANDERSON, J. M. (1980). An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Can. J. Microbiol.* 26, 753-759.
- 251.** HONG, S., ELIMELECH, M. (1997). Chemical and physical aspects of natural organic matter (NOM) fouling of nanofiltration membranes. *J. Membrane Sci.* 132(2), 159-181.
- 252.** HORNSTRA, L. M., LEEUW, P. L. A., MOEZELAAR, R., WOLBERT, E. J., DE VRIES, Y. P., DE VOS ABEE, T. (2007). Germination of *Bacillus cereus* spores adhered to stainless steel. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 367-371.
- 253.** HOTON, F. M., ANDRUP, L., SWIECICKA, I., MAHILLON, J. (2005). The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiology* 151(7), 2121-2124.
- 254.** HOTON, F. M., FORNELOS, N., N'GUESSAN, E., HU, X., SWIECICKA, I., DIERICK, K., JÄÄSKELÄINEN E, SALKINOJASALONEN M, MAHILLON, J. (2009). Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* cereulide-producing strains. *Environ. Microbiol. Rep.* 1(3), 177-183.

255. HOURY, A., BRIANDET, R., AYMERICH, S., GOHAR, M. (2010). Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology* 156, 1009-1018.
256. HPA (2011). Reported outbreaks of *Bacillus* spp. Health Protection agency, 1992-2010.
257. HSU, F. C., SHIEH, Y. S., SOBSEY, M. D. (2002). Enteric bacteriophages as potential fecal indicators in ground beef and poultry meat. *J. Food Prot.* 65, 93-99.
258. HUDSON, J. A., BILLINGTON, C., CAREY-SMITH, G., GREENING, G. (2005). Bacteriophages as biocontrol agents in food. *J. Food Prot.* 68, 426-437.
259. HULTON C. S., HIGGINS C. F., SHARP P. M. (1991). ERIC sequences: A novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5(4), 825-834.
260. HUNT, S. M., WERNER, E. M., HUANG, B., HAMILTON, M. A., STEWART, P. S. (2004). Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(12), 7418-7425.
261. HUYS, I., PIRNAY, J. P., LAVIGNE, R., JENNES, S., DE VOS, D., CASTEELS, M., VERBEKEN, G. (2013). Paving a regulatory pathway for phage therapy. *EMBO Rep.* 14, 951-954.
262. HWANG, J.Y., PARK, J. H. (2010). Survival and growth of *Bacillus cereus* group and presumptive *Cronobacter* spp. contaminated naturally in rehydrated Sunsik. *Food Sci. Biotechnol.* 19, 1683-1687.
263. 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(43). doi: 10.1186/s12941-015-0104-2.
264. InVS (2017). Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire 2017. Available at: <http://www.invs.sante.fr/Dossiersthematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-declaration-obligatoire/Toxiinfections-alimentaires-collectives/Donnees-epidemiologiques-INV5>.
265. ISO (2004). ISO 7932:2004, Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*- colony count technique at 30 °C. International Organization for Standardization.
266. IVANOVA, N., SOROKIN, A., ANDERSON, I., GALLERON, N., CANDELON, B., KAPATRAL, V., BHATTACHARYYA, A., REZNIK, G., MIKHAILOVA, N., LAPIDUS, A., CHU, L., MAZUR, M., GOLTSMAN, E., LARSEN, N., D'SOUZA, M., WALUNAS, T., GRECHKIN, Y., PUSCH, G., HASELKORN, R., FONSTEIN, M., EHRLICH, S. D., OVERBEEK, R., KYRPIDES, N. (2003). Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* 423, 87-91.
267. JÄÄSKELÄINEN, E. L., HÄGGBLUM, M. M., ANDERSSON, M. A., and SALKINOJA-SALONEN, M. S. (2004). Atmospheric oxygen and other conditions affecting the production of cereulide by *Bacillus cereus* in food. *Int. J. Food Microbiol.* 96(1), 75-83.
268. JAMAL, M., HUSSAIN, T., DAS, C. R., ANDLEEB, S. (2015). Characterization of Siphoviridae phage Z and studying its efficacy against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* planktonic cells and biofilm. *J. Med. Microbiol.* 64, 454-462.
269. JAN, S., BRUNET, N., TECHER, C., LE MARECHAL, C., KONE, A. Z., GROSSET, N., COCHET, M. F., GILLARD, A., GAUTIER, M., PUTERFLAM, J., BARON, F. (2011). Biodiversity of psychrotrophic bacteria of the *Bacillus cereus* group collected on farm and in egg product industry. *Food Microbiol.* 28, 261-265.
270. JENSEN, G. B., HANSEN, B. M., EILENBERG, J., MAHILLON, J. (2003). The hidden lifestyles

- of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ. Microbiol.* 5(8), 631-640.
271. JESSBERGER, N., DIETRICH, R., BOCK, S., DIDIER, A., MÄRTLBAUER, E. (2014). *Bacillus cereus* enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. *Toxicon* 77, 49-57.
272. 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 (560). doi: 10.3389/fmicb.2015.00560.
273. JIMÉNEZ, G., URDIAIN, M., CIFUENTES, A., LÓPEZ-LÓPEZ, A., BLANCH, A. R., TAMAMES, J., KÄMPFER, P., KOLSTØ, A. B., RAMÓN, D., MARTÍNEZ, J. F., CODONER, F. M., ROSSELLÓ-MÓRA, R. (2013). Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst. Appl. Microbiol.* 36(6), 383-391.
274. JOHN, J., ROEDIGER, K., SCHROEDL, W., ALDAHER, N., VERVUERT, I. (2015). Development of intestinal microflora and occurrence of diarrhoea in sucking foals: effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* supplementation. *BMC Vet. Res.* 11(34). doi: 10.1186/s12917-015-0355-3.
275. JUNG, M. Y., KIM, J. S., PAEK, W. K., LIM, J., LEE, H., KIM, P. I., MA, J.Y., KIM, W., CHANG, Y.H. (2011). *Bacillus manliponensis* sp. nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment. *J. Microbiol.* 49(6), 1027-1032.
276. JUNG, M. Y., PAEK, W. K., PARK, I. S., HAN, J. R., SIN, Y., PAEK, J., RHEE, M. S., KIM, H., SONG, H.S., CHANG, Y.H. (2010). *Bacillus gaemokensis* sp. nov., isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea. *J. Microbiol.* 48(6), 867-871.
277. KALYOUSSEF, S., FEJA, K. N. (2014). Foodborne illnesses. *Adv. Pediatr.* 61(1), 287-312.
278. KAMIYA, H., EHARA, T., MATSUMOTO, T. (2012). Inhibitory effects of lactoferrin on biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Chemother.* 18(1), 47-52.
279. KAPLAN, J. B., FINE, D. H. (2002). Biofilm dispersal of *Neisseria subflava* and other phylogenetically diverse oral bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(10), 4943-4950.
280. KARACA, B., AKCELIK, N., AKCELIK, M. (2015). Effects of P22 bacteriophage on *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* DMC4 strain biofilm formation and eradication. *Arch. Biol. Sci.* 67(4), 1361-1367.
281. KEIM, P., MOCK, M., YOUNG, J., KOEHLER, T.M. (2006). The international *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis* conference, "Bacillus-ACT05." *J. Bacteriol.* 188, 3433-3441.
282. KIDD, T. J., GRIMWOOD, K., RAMSAY, K. A., RAINEY, P. B., BELL, S. C. (2011). Comparison of Three Molecular Techniques for Typing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Sputum Samples from Patients with Cystic Fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 49(1), 263-268.
283. KIM, J. B., KIM, J. M., KIM, S.Y., KIM, J. H., PARK, Y. B., CHOI, N. J., OH, D. H. (2010). Comparison of Enterotoxin Production and Phenotypic Characteristics Between Emetic and Enterotoxic *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.* 73, 1219-1224.
284. KIM, K., SEO, J., WHEELER, K., PARK, C., KIM, D., PARK, S., KIM, W., CHUNG, S. I., LEIGHTON, T. (2005). Rapid genotypic detection of *Bacillus anthracis* and the *Bacillus cereus* group by multiplex real time PCR melting curve analysis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 43(2), 301-310.

- 285.** KING, A. M. Q., LEFKOWITZ, E., ADAMS, M. J., CARSTENS, E. B. E. (2016). Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, London, 1327 pp.
- 286.** KINLEY, B. (2009). Prevalence and biological control of *Salmonella* contamination in rendering plant environments and the finished rendered meals. Phd thesis, Clemson Univ., Clemson, SC.
- 287.** KLAUSEN, M., HEYDORN, A., RAGAS, P., LAMBERTSEN, L., AAES-JØRGENSEN, A., MOLIN, S., TOLKER-NIELSEN, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* 48(6), 1511-1524.
- 288.** KLUMPP, J., CALENDAR, R., LOESSNER, M. J. (2010). Complete Nucleotide Sequence and Molecular Characterization of Bacillus Phage TP21 and its Relatedness to Other Phages with the Same Name. *Viruses.* 2(4), 961-971.
- 289.** KLUMPP, J., LOESSNER, M. J. (2013). *Listeria* phages: Genomes, evolution, and application. *Bacteriophage* 3, e26861.
- 290.** KNEIFEL, W., BERGER, E. (1994). Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market. *J. Food Prot.* 57, 893-901.
- 291.** KOLSTO, A. B., GRONSTAD, A., OPPEGAARD, H. (1990). Physical map of the *Bacillus cereus* chromosome. *J. Bacteriol.* 172(7), 3821-3825.
- 292.** KOTIRANTA, A., LOUNATMAA, K., HAAPASALO, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect.* 2(2), 189-198.
- 293.** KRAMER, J. M., GILBERT, R. J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In *Food-borne bacterial pathogens*. DOYLE, M.P. CRC Press, New York, 816 pp.
- 294.** KRAUSE, N., MORAVEK, M., DIETRICH, R., WEHRLE, E., SLAGHUIS, J., MÄRTLBAUER, E. (2010). Performance characteristics of the Duopath(R) cereus enterotoxins assay for rapid detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 322-326.
- 295.** KRESKE, A. C., RYU, J. H., BEUCHAT, L. R. (2006B). Evaluation of chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer for effectiveness in killing *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in suspensions, on the surface of stainless steel, and on apples. *J. Food Prot.* 69, 1892-1903.
- 296.** KRESKE, A. C., RYU, J. H., PETTIGREW, C. A., BEUCHAT, L. R. (2006a). Lethality of chlorine, chlorine dioxide, and a commercial produce sanitizer to *Bacillus cereus* and *Pseudomonas* in a liquid detergent, on stainless steel, and in biofilm. *J. Food Prot.* 69, 2621-2634.
- 297.** KUMARI, S., SARKAR, P. K. (2014). *In vitro* model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. *Food Control* 36, 153-158.
- 298.** KUMARI, S., SARKAR, P. K. (2016). *Bacillus cereus* hazard and control in industrial processing environment. *Food Control* 69, 20-29.
- 299.** LABRIE, S. J., SAMSON, J. E., MOINEAU, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 317-327.
- 300.** LANGSRUD, S., BAARDSEN, B., SUNDHEIM, G. (2000). Potentiation of the lethal effect of peroxygen on *Bacillus cereus* spores by alkali and enzyme wash. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 81-86.
- 301.** LAPIDUS, A., GOLTSMAN, E., AUGER, S., GALLERON, N., SÉGURENS, B., DOSSAT, C., LAND

- M. L., BROUSSOLLE, V., BRILLARD, J., GUINEBRETIÈRE, 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(2), 236-249.
- 302.** LECHNER, S., MAYR, R., FRANCIS, K. P., PRÜß, B.M., KAPLAN, T., WIEßNER-GUNKEL, E., STEWART, G. S., SCHERER, A. B. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48(4), 1373-1382.
- 303.** LEE, H. Y., CHAI, L. C., TANG, S. Y., JINAP, S., GHAZALI, M., NAKAGUCHI, Y., NISHIBUCHI, M., SON, R. (2009). Application of MPN-PCR in biosafety of *Bacillus cereus* s.l. for ready-to-eat cereals. *Food Control* 20 (11), 1068-1071.
- 304.** LEE, J. H., SHIN, H., RYU, S. (2014). Characterization and comparative genomic analysis of bacteriophages infecting members of the *Bacillus cereus* group. *Arch. Virol.* 159, 871-884.
- 305.** LEE, J. H., SHIN, H., SON, B., HEU, S., RYU, S. (2013). Characterization and complete genome sequence of a virulent bacteriophage B4 infecting food-borne pathogenic *Bacillus cereus*. *Arch. Virol.* 158 (10), 2101-2108.
- 306.** LEE, N., KIM, M. D., CHANG, H. J., CHOI, S. W., CHUN, H. S. (2017). Genetic diversity, antimicrobial resistance, toxin gene profiles, and toxin production ability of *Bacillus cereus* isolates from doenjang, a Korean fermented soybean paste. *J. Food Saf.* 37(4): e12363. <https://doi.org/10.1111/jfs.12363>.
- 307.** LEE, N., SUN, J. M., KWON, K. Y., KIM, H. J., KOO, M., CHUN, H. S. (2012). Genetic diversity, antimicrobial resistance, and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* strains isolated from sunsik. *J. Food Prot.* 75, 225-230.
- 308.** LEE, W. J., BILLINGTON, C., HUDSON, J. A., HEINEMANN, J. A. (2011). Isolation and characterization of phages infecting *Bacillus cereus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 52, 456-464.
- 309.** LELIEVRE, C., ANTONINI, G., FAILLE, C., BENEZECH, T. (2002). Cleaning-in-place: modelling of cleaning kinetics of pipes soiled by *bacillus* spores assuming a process combining removal and deposition. *Food Bioprod. Process.* 80, 305-311.
- 310.** LELIEVRE, C., FAILLE, C., BENEZECH, T. (2001). Removal kinetics of *Bacillus cereus* spores from stainless steel pipes under CIP procedure: influence of soiling and cleaning conditions. *J. Food Process Eng.* 24, 359-379.
- 311.** LEMON, K., DARREN, P., HIGGINS, E., KOLTER, R. (2007). Flagellar Motility Is Critical for *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* 189, 4418-4424.
- 312.** LEMOS, M., MERGULHÃO, F., MELO, L., SIMÕES, M. (2015). The effect of shear stress on the formation and removal of *Bacillus cereus* biofilms. *Food Bioprod. Process.* 93,242-248.
- 313.** LEPPER, P. M., GRUSA, E., REICHL, H., HOGEL, J., TRAUTMANN, M. (2002). Consumption of imipenem correlates with beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(9), 2920-2925.
- 314.** LEQUETTE, Y., BOELS, G., CLARISSE, M., FAILLE, C. (2010). Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling* 26: 421-431.
- 315.** LIAQAT, I., SAIYED, I. A., NUSRAT, J. (2013). Biofilm formation and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Int. J. Microbiol. Res. Rev.* 1, 61-67.
- 316.** LINDBÄCK, T., FAGERLUND, A., RODLAND, M. S., GRANUM, P. E. (2004). Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology* 150, 3959-3967.

317. LINDBÄCK, T., GRANUM, P. E. (2015). 29 - *Bacillus cereus* phospholipases, enterotoxins, and other hemolysins. In *The Comprehensive Source book of Bacterial Protein Toxins*. ALOUF, J., LADANT, D., POPOFF, M. Elsevier, Boston, 1200 pp.
318. LINDBÄCK, T., HARDY, S. P., DIETRICH, R., HARDY, S. P., DIETRICH, R., SØDRING, M., DIDIER, A., MORAVEK, M., FAGERLUND, A., BOCK, S., NIELSEN, C., CASTEEL, M., GRANUM, P. E., MÄRTLBAUER, E. (2010). Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin requires specific binding order of its three exoprotein components. *Infect. Immun.* 78, 3813-3821.
319. LINDBÄCK, T., OKSTAD, O. A., RISHOVD, A. L., KOLSTO, A. B. (1999). Insertional inactivation of *hblC* encoding the L2 component of *Bacillus cereus* ATCC 14579 haemolysin BL strongly reduces enterotoxigenic activity, but not the haemolytic activity against human erythrocytes. *Microbiology* 145, 3139-3146.
320. LIU, B., LIU, G. H., HU, G. P., CETIN, S., LIN, N. Q., TANG, J. Y., TANG, W. Q., LIN, Y.Z. (2014). *Bacillus bingmayongensis* sp. nov., isolated from the pit soil of Emperor Qin's Terra-cotta warriors in China. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105(3), 501-510.
321. LIU, P. Y., KE, S. C., CHEN, S. L. (1997). Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate a pseudo-outbreak of *Bacillus cereus* in a pediatric unit. *J. Clin. Microbiol.* 35(6), 1533-1535.
322. 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). doi: 10.1038/srep14082.
323. LOESSNER, M. J., MAIER, S. K., DAUBEK-PUZA, H., WENDLINGER, G., SCHERER, S. (1997). Three *Bacillus cereus* bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different bacilli. *J. Bacteriol.* 179, 2845-2851.
324. LOGAN, N. A. (2012). *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J. Appl. Microbiol.* 112(3), 417-429.
325. LOGAN, N., TURNBULL, P. C. B. (2003). *Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria. In *Manual of Clinical Microbiology*, 8th Edition. Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H. et al. American Society for Microbiology, Washington, 445-460 pp.
326. LOPEZ, A., MINNAARD, J., PEREZ, P., ALIPPI, A. (2015). A case of intoxication due to a highly cytotoxic *Bacillus cereus* strain isolated from cooked chicken. *Food Microbiol.* 46(0), 195-199.
327. LÜCKING, G., STOECKEL, M., ATAMER, Z., HINRICHS, J., EHLING-SCHULZ, M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 270-279.
328. LUNA, V. A., KING, D. S., GULLEDGE, J., CANNONS, A. C., AMUSO, P. T., CATTANI, J. (2007). Susceptibility of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* and *Bacillus thuringiensis* to 24 antimicrobials using Sensititre automated microbroth dilution and Etest agar gradient diffusion methods. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 555-567.
329. LUND, T., DE BUYSER, M. L., GRANUM, P. E. (2000). A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.* 38(2), 254-261.
330. 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.

- 331.** LUND, T., GRANUM, P. E. (1997). Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology* 143, 3329-3336.
- 332.** 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.
- 333.** MA, L., CONOVER, M., LU, H., PARSEK, M. R., BAYLES, K., WOZNIK, D. J. (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLOS Pathog.* 5 (3) : e1000354.
- 334.** MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. (1997). Brock biology of microorganisms. Prentice Hall, 912 pp.
- 335.** 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(16), 1142-1148.
- 336.** MAJED, R., C. FAILLE, M. KALLASSY, GOHAR, M. (2016). *Bacillus cereus* biofilms - same, only different. *Front. Microbiol.* 7 (1054). doi: 10.3389/fmicb.2016.01054.
- 337.** MANTYNEN, V., LINDSTRÖM, K. (1998). A rapid PCR based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1634-1639.
- 338.** MANUEL, S. G., RAGUNATH, C., SAIT, H. B., IZANO, E. A., KAPLAN, J. B., RAMASUBBU, N. (2007). Role of active-site residues of dispersin B, a biofilmreleasing β -hexosaminidase from a periodontal pathogen, in substrate hydrolysis. *FEBS J.*274(22), 5987-5999.
- 339.** MANZANO, M., GIUSTO, C., IACUMIN, L., CANTONI, C., COMI, G. (2009). Molecular methods to evaluate biodiversity in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains from different origins. *Food Microbiol.* 26, 259-264.
- 340.** MARTÍNEZ-BLANCH, J. F., SÁNCHEZ, G., GARAY, E., AZNAR, R. (2010). Evaluation of real-time PCR assay for the detection and quantification of *Bacillus cereus* group spores in food. *J. Food Prot.* 73(8), 1480-1485.
- 341.** MATTILA, T., MANNINEN, M., KYLÄSIUROLA, A. L. (1990). Effect of cleaning-in-place disinfectants on wild bacterial strains isolated from a milking line. *J. Dairy Res.* 57, 33-39.
- 342.** MAYR, B., KAPLAN, T., LECHNER, S., SCHERER, S. (1996). Identification and purification of a family of dimeric major cold shock protein homologs from the psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201. *J. Bacteriol.* 178(10), 2916-2925.
- 343.** MEAD, P. S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCAIG, L. F., BRESEE, J. S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P. M., TAUXE, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infect. Dis.* 5(5), 607-625.
- 344.** MEI, X., XU, K., YANG, L., YUAN, Z., MAHILLON, J., HU, X. (2014). The genetic diversity of cereulide biosynthesis gene cluster indicates a composite transposon Tnces in emetic *Bacillus weihenstephanensis*. *BMC Microbiol.* 14(149). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-149>.
- 345.** MERIC, G., MAGEIROS, L., PASCOE, B., WOODCOCK, D. J., MOURKAS, E., LAMBLE, S., BOWDEN, R., JOLLEY, K. A., RAYMOND, B., SHEPPARD, S. K. (2018). Lineage-specific plasmid acquisition and the evolution of specialized pathogens in *Bacillus thuringiensis* and the *Bacillus cereus* group. *Mol. Ecol.* 27, 1524-1540.
- 346.** MERZOUGUI, S., COHEN, N., GROSSET, N., GAUTIER, M., LKHIDER, M. (2013b). Enterotoxigenic Profiles of psychrotolerant and mesophilic strains of the *Bacillus cereus*

- group isolated from food in Morocco. *Int. J. Eng. Res. Appl.* 3, 964-970.
- 347.** MERZOUGUI, S., LKHIDER, M., GROSSET, N., GAUTIER, M., COHEN, N. (2014). Prevalence, PFGE typing and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* group isolated from food in Morocco. *Foodborne Pathog. Dis.* 11, 145-149.
- 348.** MERZOUGUI, S., LKHIDER, M., GROSSET, N., GAUTIER, M., COHEN, N. (2013a). Differentiation by molecular typing of *Bacillus cereus* isolates from food in Morocco: PFGE-Eric PCR. *J. Food Public Health* 3, 223-227.
- 349.** MESSAOUDI, K., CLAVEL, T., SCHMITT, P., DUPORT, C. (2010). Fnr mediates carbohydrate-dependent regulation of catabolic and enterotoxin genes in *Bacillus cereus* F4430/73. *Res. Microbiol.* 161, 30-39.
- 350.** MESSELHÄUSSER, U., FRENZEL, E., BLÖCHINGER, C., ZUCKER, R., KÄMPF, 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.* Article ID 465603. <https://doi.org/10.1155/2014/465603>.
- 351.** MIKKOLA, R., SARIS, N. E. L., GRIGORIEV, P. A., ANDERSSON, M. A., SALKINOJA-SALONEN, M. S. (1999). Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide. *FEBS J.* 263(1), 112-117.
- 352.** MILLER, R. A., BENO, S. M., KENT, D. J., CARROLL, L. M., MARTIN, N. H., BOOR, K. J., KOVAC, J. (2016). *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66(11), 4744-4753.
- 353.** MILLER, R. A., JIAN, J., BENO, S. M., WIEDMANN, M., KOVAC, J. (2018). Intraclade Variability in Toxin Production and Cytotoxicity of *Bacillus cereus* Group Type Strains and Dairy-Associated Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 84: pii= e02479-17. doi:10.1128/AEM.02479-17.
- 354.** MINAKHIN, L., SEMENOVA, E., LIU, J., VASILOV, A., SEVERINOVA, E., GABISONIA, T., INMAN, R., MUSHEGIAN, A., SEVERINOV, K. (2005). Genome sequence and gene expression of *Bacillus anthracis* bacteriophage Fah. *J. Mol. Biol.* 354, 1-15.
- 355.** MITTELMAN, M. W. (1998). Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *J. Dairy sci.* 81(10), 2760–2764.
- 356.** MMWR (2013). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks — United States, 1998–2008. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance Summaries 62 (SSO2), 1-34.
- 357.** MOCK, M., FOUET, A. (2001). Anthrax. *Annu. Rev. Microbiol.* 55(1), 647-671.
- 358.** Monroe, D. (2007). Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLOS Biol.* 5(11) : e307.
- 359.** MORAVEK, M., DIETRICH, R., BUERK, C., BROUSSOLLE, V., GUINEBRETIERE, M. H., GRANUM, P. E., NGUYEN-THE, C., MÄRTLBAUER, E. (2006). Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *FEMS Microbiol. Lett.* 257, 293-298.
- 360.** MORAVEK, M., WEGSCHEIDER, M., SCHULZ, A., DIETRICH, R., BURK, C., MARTLBAUER, E. (2004). Colony immunoblot assay for the detection of hemolysin BL enterotoxin producing *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett.* 238 (1), 107-113.
- 361.** MORTIMER, P. R., MCCANN, G. (1974). Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. *Lancet* 303(7865), 1043-1045.

362. MOSSEL, D. A. A., KOOPMAN, M. J., JONGERIUS, E. (1967). Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Appl. Microbiol.* 15(3), 650-653.
363. MOUFFOK, F. (2011). Situation en matière de TIA en Algérie de 2010 à 2011. 2^{ème} congrès Maghrébin sur les TIA, Tunis le 14-15 décembre, 2011.
364. MOUMEN, B., NGUEN-THE, C., SOROKIN, A. (2012). Sequence analysis of inducible prophage phiS3501 integrated into the haemolysin II gene of *Bacillus thuringiensis* var israelensis ATCC35646. *Genet. Res. Int.* 2012 : 543286.
365. MULLER, R., EIDT, A., HILLER, K.A., KATZUR, V., SUBAT, M., SCHWEIKL, H., IMAZATO, S., RUHL, S., SCHAMLZ, G. (2009). Influences of protein films on antibacterial or bacteria-repellent surface coatings in a model system using silicon wafers. *Biomater.* 30, 4921-4929.
366. NAKAMURA, L. K. (1998). *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48(3), 1031-1035.
367. NAKAMURA, L. K., JACKSON, M. A. (1995). Clarification of the taxonomy of *Bacillus mycooides*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 45(1), 46-49.
368. NARANJO, M., DENAYER, S., BOTTELDOORN, N., DELBRASSINNE, L., VEYS, J., WAEGENAERE, J., SIRTAINÉ, 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(12), 4379-4381.
369. NCBI (2008) Entrez Genome. URL www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/phg.html
370. NEWELL, D. G., KOOPMANS, M., VERHOEF, L., DUIZER, E., AIDARA-KANE, A., SPRONG, H., OPSTEEGH, M., LANGELAAR, M., THREFFALL, J., SCHEUTZ, F., VAN DER GIESSEN, J., KRUSE, H. (2010). Food-borne Diseases-the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int. J. Food Microbiol.* 139, S3-S15.
371. NEYRET, C., HERRY, J. M., MEYLHEUC, T., DUBOIS-BRISONNET, F. (2014). Plant-derived compounds as natural antimicrobials to control paper mill biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 87-96.
372. NGANGBAM, A. K., DEVI, N. B. L. (2012). Molecular characterization of *Salmonella* bacteriophage isolated from natural environment and its potential role in phage therapy. *IOSR J. Agric. Vet. Sci.* 1, 7-11.
373. NIEMANN, S., DAMMANN-KALINOWSKI, T., NAGEL, A., SELBITSCHKA W. (1999). Genetic basis of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR fingerprint pattern in *Sinorhizobium meliloti* and identification of *S. meliloti* employing PCR primers derived from an ERIC-PCR fragment. *Arch. Microbiol.* 172(1), 22-30.
374. NITSCHKE, M., COSTA, S. G. V. A. O. (2007). Biosurfactants in food industry. *Food Sci. Technol.* 18, 225-259.
375. NOLLER, A. C., MCELLISTREM, M. C., STINE, O. C., MORRIS JR, J. G., BOXRUD, D.J., DIXON, B., HARRISON, L. H. (2003). Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157: H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 41 (2), 675-679.
376. NORTJE, G. L., VORSTER, S. M., GREEBE, R. P., STEYN, P. L. (1999). Occurrence of *Bacillus cereus* and *Yersinia enterocolitica* in South African retail meats. *Food Microbiol.* 16, 213-217.
377. NYACHUBA, D. G. (2010). Foodborne illness: is it on the rise? *Nutr. Rev.* 68(5), 257-269.

- 378.** OCHMAN, H., LAWRENCE, J. G., GROISMAN, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405(6784), 299-304.
- 379.** OCHMAN, H., MORAN, N. A. (2001). Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* 292(5519), 1096-1099.
- 380.** OH, H., SEO, D. J., JEON, S. B., PARK, H., JEONG, S., CHUN, H. S., OH, M., CHOI, C. (2017). Isolation and Characterization of *Bacillus cereus* Bacteriophages from Foods and Soil. *Food Environ. Virol.* 9(3), 260-269.
- 381.** OH, M. H., HAM, J. S., COX, J. M. (2012). Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Food Microbiol.* 152(1-2), 1-8.
- 382.** OLIVE D. M., BEAN P. (1999). Principales and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37(6),1661-1669.
- 383.** OMS (2015). Estimations par l’OMS de la charge mondiale des maladies d’origine alimentaire. Available at:
http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/maladies-alimentaires-general.pdf?ua=1
- 384.** OMS (2018). Sécurité sanitaire des aliments. Available at:
<https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- 385.** ORANUSI, U. S., BRAIDE, W., OSIGWE, G. A. (2012). Investigation on the microbial profile of canned foods. *J. Biol. Food Sci. Res.* 1(1), 15–18.
- 386.** OTLEWSKA, A., OLTUSZAK-WALCZAK, E., WALCZAK, P. (2013). Differentiation of strains from the *Bacillus cereus* group by RFLP-PFGE genomic fingerprinting. *Electrophoresis* 00:1-6.
- 387.** PACE, L. J., PARK RUPP, E., ROGER, G. (2006). Biofilms, infection and antimicrobial therapy. CRC Press, Taylor and Francis Group.
- 388.** PAINTER, J. A., HOEKSTRA, R. M., AYERS, T., TAUXE, R. V., BRADEN, C. R., ANGULO, F. J., GRIFFIN, P. M. (2013). Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008. *Emerging Infect. Dis.* 19(3), 407-415.
- 389.** PALMA, L., MUÑOZ, D., BERRY, C., MURILLO, J., CABALLERO, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins (Basel)* 6(12), 3296-3325.
- 390.** PARK, A. I., DAESCHEL, M. A., ZHAO, Y. (2004). Functional properties of antimicrobial lysozyme–chitosan composite films. *J. Food. Saf.* 69, 215-221.
- 391.** PARK, J., YUN, J., LIM, J. A., KANG, D.H., RYU, S. (2012). Characterization of an endolysin, LysBPS13, from a *Bacillus cereus* bacteriophage. *FEMS Microbiol. Lett.* 332, 76-83.
- 392.** PARK, S. H., KIM, H. J., KIM, J. H., KIM, T. W., KIM, H. Y. (2007). Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 1177-1182.
- 393.** PARK, Y. B., KIM, J. B., SHIN, S. W., KIM, J. C., CHO, S. H., LEE, B. K., AHN, J., KIM, J. M., OH, D.H. (2009). Prevalence, genetic diversity, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* strains isolated from rice and cereals collected in Korea. *J. Food Prot.* 72, 612-617.
- 394.** PARKAR, S. G., FLINT, S. H., BROOKS, J. D. (2004). Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *J. Appl. Microbiol.* 96, 110-116.

- 395.** PENG, J. S., TSAI, W. C., CHOU, C. C. (2001). Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *Int. J. Food Microbiol.* 65, 105-111.
- 396.** PENG, J. S., TSAI, W. C., CHOU, C. C. (2002). Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int. J. Food Microbiol.* 77, 11-18.
- 397.** PENG, Q., YUAN, Y. (2018). Characterization of a novel phage infecting the pathogenic multidrug-resistant *Bacillus cereus* and functional analysis of its endolysin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102(18), 7901-7912.
- 398.** PFRUNDER, S., GROSSMANN, J., HUNZIKER, P., BRUNISHOLZ, R., GEKENIDIS, M. T., DRISSNER, D. (2016). *Bacillus cereus* Group-Type Strain-Specific Diagnostic Peptides. *J. Proteome Res.* 15, 3098–3107.
- 399.** PIGNATELLI, M., MOYA, A., TAMAMES, J. (2009). EnvDB, a database for describing the environmental distribution of prokaryotic taxa. *Environ. Microbiol. Rep.* 1(3), 191-197.
- 400.** PINTO, M., ROBINE-LEON, S., APPAY, M. D., REDINGER, M., TRIADOU, N., DUSSAULX, E., LACROIX, B., SIMON-ASSMANN, P., HAFFEN, K., FOGH, J., ZWEIBAUM, A. (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* 47, 323-330.
- 401.** PIRES, D. P., MELO, L. D., BOAS, D. V., SILLANKORVA, S., AZEREDO, J. (2017). Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections. *Curr. Opin. Microbiol.* 39, 48-56.
- 402.** PIRHONEN, T., ANDERSSON, M., JÄÄSKELÄINEN, E., SALKINOJA-SALONEN, M., HONKANEN- BUZALSKI, T., JOHANSSON, T. (2005). Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food poisoning. *Food Microbiol.* 22, 87-91.
- 403.** PIRTTIJÄRVI, T. S., ANDERSSON, M. A., SCOGING, A. C., SALKINOJA-SALONEN, M. S. (1999). Evaluation of methods for recognising strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. *Syst. Appl. Microbiol.* 22(1), 133-144.
- 404.** PITCHAYAWASIN, S., KUSE, M., KOGA, K., ISOBE, M., AGATA, N., OHTA, M. (2003). Complexation of cyclic dodecadepsipeptide, Cereulide with ammonium salts. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 3507-3512.
- 405.** PLANCHON, S., DARGAIGNARATZ, C., LEVY, C., GINIES, C., BROUSSOLLE, V., CARLIN, F. (2011). Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10°C and 30°C display variations in their properties. *Food Microbiol.* 28(2), 291-297.
- 406.** POMERANTSEV, A. P., KALNIN, K. V., OSORIO, M., LEPPLA, S. H. (2003). Phosphatidylcholine specific phospholipase C and sphingomyelinase activities in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Infect. Immun.* 71, 6591-6606.
- 407.** POMPERMAYER, D. M. C., GAYLARDE, C. C. (2000). The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *E. coli* to polypropylene. *Food microbiol.* 17, 361-365.
- 408.** PORTNOY, B. L., GOEPFERT, J. M., HARMON, S. M. (1976). An outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning resulting from contaminated vegetable sprouts. *Am. J. Epidemiol.* 103, 589-594.
- 409.** PÓSFAY-BARBE, K. M., SCHRENZEL, J., FREY, J., STUDER, R., KORFF, C., BELLI, D. C., PARVEX, P., RIMENSBERGER, P. C., SCHÄPPI, M. G. (2008). Food poisoning as a cause of acute liver failure. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 27(9), 846-847.

410. POULSEN, L. V. (1999). Microbial Biofilm in Food Processing. *LWT - Food Sci. Technol.* 32, 321-326.
411. PRIEST, F. G., BARKER, M., BAILLIE, L.W., HOLMES, E.C., MAIDEN M. C. (2004). Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J. Bacteriol.* 186, 7959-7970.
412. PRIEST, F.G., KAJI, D. A., ROSATA, Y.B., CANHOS, V.P. (1994). Characterization of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria by ribosomal RNA gene restriction fragment length polymorphisms. *Microbiology* 140, 1015-1022.
413. PRÜSS, B. M., DIETRICH, R., NIBLER, B., MÄRTLBAUER, E., SCHERER, S. (1999). The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5436-5442.
414. PUBLIC HEALTH ENGLAND [PHE] (2009). Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market. Available at: www.gov.uk/government/publications/ready-to-eat-foods-microbiological-safety-assessment-guidelines.
415. QURESHI, N., CHAWLA, S., LIKITVIVATANAVONG, S., LEE, H. L., GILL, S. S. (2014). The cry toxin operon of *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia* is highly toxic to *Aedes Larval Mosquitoes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5689-5697.
416. RADNEDGE, L., AGRON, P. G., HILL, K. K., JACKSON, P. J., TICKNOR, L. O., KEIM, P., ANDERSEN, G. L. (2003). Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2755-2764.
417. RAHIMI, E., ABDOS, F., MOMTAZ, H., BAGHBADORANI, Z. T., JALALI, M. (2013). *Bacillus cereus* in Infant Foods: Prevalence Study and Distribution of Enterotoxigenic Virulence Factors in Isfahan Province, Iran. *Sci. World J.* Article ID 292571. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/292571>
418. RAHMATI, T., LABBE, R. (2008). Levels and toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from retail seafood. *J. Food Prot.* 71(6), 1178–1185.
419. RAJKOVIC, A., UYTENDAELE, M., DIERICK, K., SAMAPUNDO, S., BOTTELDOORN, N., MAHILLON, J., HEYNDRICKX, M. (2008b). Risk profile of the *Bacillus cereus* group implicated in food poisoning. *Report for the Superior Health Council Belgium. CSS-HGR 8316 public health implications of Bacillus cereus in food*, 80 pp.
420. RAJKOVIC, A., UYTENDAELE, M., VERMEULEN, A., ANDJELKOVIC, M., FITZ-JAMES, I., IN 'T VELD, P., DENON, Q., VÉRHE, R., DEBEVERE, J. (2008a). Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Lett. Appl. Microbiol.* 46(5), 536-541.
421. RAMARAO, N., LERECLUS, D. (2005). The InhA1 metalloprotease allows spores of the *B. cereus* group to escape macrophages. *Cell. Microbiol.* 7, 1357-1364.
422. 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.
423. RAMARAO, N., SANCHIS, V. (2013). The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review. *Toxins (Basel)* 5(6), 1119-1139.
424. RAMISSE, V., PATRA, G., GARRIGUE, H., GUESDON, J. L., MOCK, M. (1996). Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 145(1), 9-16.
425. RAO, V. S., KUMAR, R. N., KASHINATH, L., BHASKAR, V., POLASA, K. (2012) Microbiological hazard identification and exposure assessment of poultry products sold in various

- localities of Hyderabad, India. *Sci World J.* 2012 :736040. doi : 10.1100/2012/736040
- 426.** RASKO, D. A., ALTHERR, M. R., HAN, C. S., RAVEL, J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 303-329.
- 427.** RATHER, M. A., AULAKH, R. S., GILL, J. P., MIR, A. Q., HASSAN, M. N. (2012). Detection and sequencing of plasmid encoded tetracycline resistance determinants (*tetA* and *tetB*) from food-borne *Bacillus cereus* isolates. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 5, 709-712.
- 428.** REITER, L., KOLSTØ, A. B., PIEHLER, A. P. (2011). Reference genes for quantitative, reverse-transcription PCR in *Bacillus cereus* group strains throughout the bacterial life cycle. *J. Microbiol. Methods* 86, 210-217.
- 429.** REM (1999 à 2011). Situation épidémiologique de l'année 2009 sur la base des cas déclarées l'I.N.S.P. Relevés Épidémiologiques mensuels, 1-22.
- 430.** RESCH, A., FEHRENBACHER, B., EISELE, K., SCHALLER, M., FRIEDRICH, G. (2005). Phage release from biofilm and planktonic *Staphylococcus aureus* cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 252, 89-96.
- 431.** REVAZISHVILI, T., KOTETISHVILI, M., STINE, O. C., KREGER, A. S., MORRIS JR, J. G., SULAKVELIDZE, A. (2004). Comparative analysis of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for characterizing *Listeria monocytogenes* strains isolated from environmental and clinical sources. *J. Clin. Microbiol.* 42(1), 276-285.
- 432.** RIVERA, A. M. G., GRANUM, P. E., PRIEST, F. G. (2000). Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 190, 151-155.
- 433.** ROSENQUIST, H., SMIDT, L., ANDERSEN, S. R., JENSEN, G. B., WILCKS, A. (2005). Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiol. Lett.* 250(1), 129-136.
- 434.** ROSMANINHO, R., SANTOS, O., NYLANDER, T., PAULSSON, M., MULLER-STEINHAGEN, H., MELO, L. (2007). Modified stainless steel surfaces targeted to reduce fouling – evaluation of fouling by milk components. *J. Food. Eng.* 80: 1176-1187.
- 435.** ROY A., MOKTAN, B., SARKAR, P. K. (2007). Characteristics of *Bacillus cereus* isolates from legume-based Indian fermented foods. *Food control* 18, 1555-1564.
- 436.** RUHFEL, R. E., ROBILLARD, N. J., THORNE, C. B. (1984). Interspecies transduction of plasmids among *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 157, 708-711.
- 437.** 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(8), 2551-2556.
- 438.** RYU, J. H., BEUCHAT, L. R. (2005). Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *J. Food Prot.* 68, 2614-2622.
- 439.** SADEKUZZAMAN, M., MIZAN, M. F. R., YANG, S., KIM, H.S., HA, S.D. (2018). Application of bacteriophages for the inactivation of *Salmonella* spp. in biofilms. *Food Sci. Technol. Int.* 24(5), 424-433.
- 440.** SAGRIPANTI, J. L., BONIFACINO, A. (1999). Bacterial Spores Survive Treatment with Commercial Sterilants and Disinfectant. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4255-4260.

- 441.** SAILE, E., KOEHLER, T. M. (2006). *Bacillus anthracis* multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3168-3174.
- 442.** SALUSTIANO, V. C., N. J. ANDRADE, N. F. F. SOARES, J. C. LIMA, P. C. BERNARDES, L. M. P. LUIZ, FERNANDES, P. E. (2009). Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. *Food Control* 20(4), 439-442.
- 443.** SAMAPUNDO, S., EVERAERT, H., WANDUTU, J. N., RAJKOVIC, A., UYTENDAELE, M., DEVLIEGHIERE, F. (2011a). The influence of headspace and dissolved oxygen level on growth and haemolytic BL enterotoxin production of a psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* isolate on potato based ready-to-eat food products. *Food Microbiol.* 28(2), 298-304.
- 444.** SAMAPUNDO, S., HEYNDRIKX, M., XHAFERI, R., DEVLIEGHIERE, F. (2011b). Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *Int. J. Food Microbiol.* 150, 34-41.
- 445.** SAMBROOK, J., RUSSELL, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 446.** SAMSON, J. E., MAGADAN, A. H., SABRI, M., MOINEAU, S. (2013). Revenge of the phages: Defeating bacterial defences. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 675-687.
- 447.** SCHLEGELOVA, J., BABAK, V., HOLASOVA, M., KONSTANTINOVA, L., NECIDOVA, L., SISAK, F., VLKOVA, H., ROUBAL, P., JAGLIK, Z. (2010). Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. *Czech J. Food Sci.* 28, 450-461.
- 448.** SCHMELCHER, M., LOESSNER, M. J. (2014). Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage* 4(2) : e28137.
- 449.** 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(3), 775-806.
- 450.** SCHOENI, J. L., LEE WONG, A. C. (2005). *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J. Food Prot.* 68(3), 636- 648.
- 451.** SCHOOLING, S., CHARAF, U., ALLISON, D., GILBERT, P. (2004). A role for rhamnolipid in biofilm dispersion. *Biofilms* 1(2), 91-99.
- 452.** SCHUCH, R., FISCHETTI, V. A. (2006). Detailed genomic analysis of the Wbeta and gamma phages infecting *Bacillus anthracis*: implications for evolution of environmental fitness and antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 188(8), 3037-3051.
- 453.** SCHUPP, J. M., KLEVYTSKA, A. M., ZINSER, G., PRICE, L. B., KEIM, P. (2000). *vrkB*, a hypervariable open reading frame in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 182, 3989-3997.
- 454.** SCHWARTZ, D. C., CANTOR, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 37(1), 67-75.
- 455.** SEKI, T., CHUNG, C. K., MIKAMI, H., OSHIMA, Y. (1978). Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus *Bacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28(2), 182-189.
- 456.** SENESI, S., GHELARDI, E. (2010). Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. *Toxins (Basel)* 2(7), 1690-1703.
- 457.** SHAH, R. C., WADHER, B. J., BHOOSREDDY, G. L. (1996). Incidence and characteristics of

- Bacillus cereus* isolated from Indian foods. *J. Food Sci. Tech.* 33(3), 249-250.
458. SHAHEEN, R., SVENSSON, B., ANDERSSON, M. A., CHRISTIANSSON, A., SALKINJOVA-SALONEN, M. (2009). Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiol.* 27 (3), 347-55.
459. SHANGKUAN Y. H., YANG J. F., LIN H. C., SHAI M. F. (2000). Comparaison of PCR-RFLP, ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains. *J. Appl. Microbiol.* 89(3), 452-462.
460. SHANGKUAN, Y. H., CHANG, Y. H., YANG, J. F., LIN, H. C., SHAI M. F. (2001). Molecular characterization of *Bacillus anthracis* using multiplex PCR, ERIC-PCR and RAPD. *Lett. Appl. Microbiol.* 32(3), 139-145.
461. SHARMA, M., ANAND S. K. (2002). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy industry : A case. *Food Control* 13, 469-477.
462. SHARMA, M., RYU, J. H. BEUCHAT L. R. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. *J. Appl. Microbiol.* 99, 449-459.
463. SHARMA, A., SATYANARAYANA, T. (2013). Comparative genomics of *Bacillus* species and its relevance in industrial microbiology. *Genomics Insights* 6, 25-36.
464. SHIN, H., BANDARA, N., SHIN, E., RYU, S., KIM, K. (2011). Prevalence of *Bacillus cereus* bacteriophages in fermented foods and characterization of phage JBP901. *Res. Microbiol.* 162, 791-797.
465. SHIN, H., LEE, J. H., PARK, J., HEU, S., RYU, S. (2014). Characterization and genome analysis of the *Bacillus cereus*-infecting bacteriophages BPS10C and BPS13. *Arch. Virol.* 159(8), 2171-2175.
466. SHINAGAWA, K., UENO, Y., HU, D. L., UEDA, S., SUGII, S. (1996). Mouse lethal activity of a HEp- 2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. *J. Vet. Med. Sci.* 58, 1027- 1029.
467. SHIVU, M. M., RAJEEVA, B. C., GIRISHA, S. K., KARUNASAGAR, I., KROHNE, G., KARUNASAGAR, I. (2007). Molecular characterization of *Vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India. *Environ. Microbiol.* 9, 322-331.
468. SILLANKORVA, S., NEUBAUER, P., AZEREDO, J. (2008). *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A. *BMC Biotechnol.* 8(79). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-79>
469. SIMMONDS, P., MOSSEL, B. L., INTARAPHAN, T., DEETH, H. C. (2003). Heat resistance of *Bacillus* spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. *J. food prot.* 66, 2070-2075.
470. SIMÕES M., SIMÕES L. C., VIEIRA M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 573-583.
471. SIMÕES, M., BENNETT, R. N., ROSA, E. A. S. (2009). Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Nat. Prod. Rep.* 26, 746-757.
472. SIMÕES, M., SIMÕES, L. C., MACHADO, I., PEREIRA, M. O., VIEIRA, M. J. (2006). Control of flow-generated biofilms using surfactants: evidence of resistance and recovery. *Food Bioprod. Process.* 84, 338-345.

- 473.** SIMÕES, M., VIEIRA, M. J. (2009). Persister cells in *Pseudomonas fluorescens* biofilms treated with a biocide. In *Proceedings of the international conference processes in biofilms: Fundamentals to applications*. Davis, CA, USA, 58-62 pp.
- 474.** SINGH, P. K., PARSEK, M. R., GREENBERG, E. P., WELSH, M. J. (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* 417, 552-555.
- 475.** SMELT, J. P. P. M., BOS, A. P., KORT, R., BRUL, S. (2008). Modelling the effect of sub(lethal) heat treatment of *Bacillus subtilis* spores on germination rate and outgrowth to exponentially growing vegetative cells. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 34-40.
- 476.** SOMERS, E. B., WONG, A. C. (2004). Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat-meat residue. *J. Food Prot.* 67, 2218-2229.
- 477.** SOMMER, P., MARTIN-ROUAS, C., METTLER E. (1999). Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. *Food microbiol.* 16, 503-515.
- 478.** SON, B., YUN, J., LIM, J.A., SHIN, H., HEU, S. RYU, S. (2012). Characterization of LysB4, an endolysin from the *Bacillus cereus*-infecting bacteriophage B4. *BMC Microbiol.* 12(33). doi: 10.1186/1471-2180-12-33.
- 479.** SONI, K. A., NANNAPANENI, R. (2010). Removal of *Listeria monocytogenes* Biofilms with Bacteriophage P100. *J. Food Prot.* 73(8), 1519-1524.
- 480.** SOUFIANE, B., COTE, J. C. (2009). Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, *gyrB* and *aroE* gene sequence analyses. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95(1), 33-45.
- 481.** SREY, S., JAHID, I. K., HA, S. D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food control* 31, 572-585.
- 482.** 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(4), 579-606.
- 483.** STENFORS, L. P., GRANUM, P. E. (2001). Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 197(2), 223-228.
- 484.** STENFORS, L. P., MAYR, R., SCHERER, S., GRANUM, P. E. (2002). Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 215(1), 47-51.
- 485.** STEWART, C. R., CASJENS, S. R., CRESAWN, S. G., HOUTZ, J. M., SMITH, A. L., FORD, M. E., PEEBLES, C. L., HATFULL, G. F., HENDRIX, R. W., HUANG, W. M., PEDULLA, M. L. (2009). The genome of *Bacillus subtilis* bacteriophage SPO1. *J. Mol. Biol.* 388(1), 48-70
- 486.** STEWART, J. C., SEIBERLING, D. A. (1996). The secrets out: clean in place. *Chem. Eng.* 103, 72-79.
- 487.** STORGÅRDS, E., K. TAPANI, P. HARTWALL, R. SALEVA, SUIHKO, M. L. (2006). Microbial attachment and biofilm formation in brewery bottling plants. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 64(1), 8-15.
- 488.** SUREKHAMOL, I. S., DEEPA, G. D., SOMNATH PAI, S., SREELAKSHMI, B., VARGHESE, S., BRIGHT SINGH, I. S. (2013). Isolation and characterization of broad spectrum bacteriophages lytic to *Vibrio harveyi* from shrimp farms of Kerala, India. *Lett. Appl. Microbiol.* 58, 197-204.
- 489.** SWANSON, M. M., REAVY, B., MAKAROVA, K. S., COCK, P. J., HOPKINS, D. W., TORRANCE,

- L., KOONIN, E. V., TALIANSKY, M. (2012). Novel bacteriophages containing a genome of another bacteriophage within their genomes. *PLOS ONE* 7 : e40683.
490. TATARA, R., NAGAI, T., SUZUKI, M., OH, I., FUJIWARA, S., NORIZUKI, M., MUROI, K., OZAWA, K. (2013). Sepsis and meningoenzephalitis caused by *Bacillus cereus* in a patient with myelodysplastic syndrome. *Intern. Med.* 52, 1987-1990.
491. 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.
492. 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(5), 1344-1358.
493. TENG, F., SINGH, K.V., BOURGOGNE, A., ZENG, J., MURRAY, B.E. (2009). Further Characterization of the *epa* Gene Cluster and *Epa* Polysaccharides of *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 77, 3759-3767.
494. TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P. A., MURRAY, B. E., PERSING, D. H., SWAMINATHAN, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233-2239.
495. TEPLOVA, V. V., MIKKOLA, R., TONSHIN, A. A., SARIS, N. E. L., SALKINOJA-SALONEN, M. S. (2006). The higher toxicity of cereulide relative to valinomycin is due to its higher affinity for potassium at physiological plasma concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 210(1-2), 39-46.
496. TEWARI, A., ABDULLAH, S. (2015). *Bacillus cereus* food poisoning: international and Indian perspective. *J. Food. Sci. Technol.* 52(5), 2500-2511.
497. TEWARI, A., SINGH, S. P., SINGH, R. (2015). Incidence and enterotoxigenic profile of *Bacillus cereus* in meat and meat products of Uttarakhand, India. *J. Food Sci. Technol.* 52(3), 1796-1801.
498. THALLINGER, B., PRASETYO, E. N., NYANHONGO, G. S., GUEBITZ, G. M. (2013). Antimicrobial enzymes : an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnol. J.* 8(1), 97-109.
499. THOMAS, D. J., MORGAN, J. A., WHIPPS, J. M., SAUNDERS, J. R. (2000). Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in lepidopteran and coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 118-124.
500. 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 preincubation conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 134(1-2), 133-139.
501. 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(7), 5118-5121.
502. THORSEN, L., KANDO, C. K., SAWADOGO, H., LARSEN, N., DIAWARA, B., OUÉDRAOGO, G. A., HENDRIKSEN, N. B., JESPERSEN, L. (2015). Characteristics and phylogeny of *Bacillus cereus* strains isolated from Maari, a traditional West African food condiment. *Int. J. Food*

- Microbiol.* 196, 70-78.
- 503.** TICKNOR, L. O., KOLSTO, A. B., HILL, K. K., KEIM, P., LAKER, M. T., TONKS M. (2001). Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates *Appl. Environ. Microbiol.* 67(10), 4863-4873.
- 504.** TOURNAY, M. (2018). Evaluation du potentiel du phage Deep-Blue pour le biocontrôle des souches émétiques du groupe *Bacillus cereus* dans la filière agro-alimentaire. Faculté des bioingénieurs, Université catholique de Louvain, Belgique.
- 505.** TOURASSE, N. J., KOLSTO, A. B. (2008). Survey of group I and group II introns in 29 sequenced genomes of the *Bacillus cereus* group: insights into their spread and evolution. *Nucleic Acids Res* 36, 4529-4548.
- 506.** TURNBULL, P. C. B., SIRIANNI, N. M., LEBRON, C. L., SAMAAN, M. N., SUTTON, F. N., REYES, A. E., PERUSKI JR, L. F. (2004). MICs of selected antibiotics for *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, 68 *Bacillus thuringiensis*, and *Bacillus mycoides* from a range of clinical and environmental sources as determined by Etest. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3626-3634.
- 507.** ULRICH, S., GOTTSCHALK, C., DIETRICH, R., MÄRTLBAUER, E., GAREIS, M. (2019). Identification of cereulide producing *Bacillus cereus* by MALDI-TOF MS. *Food Microbiol.* 82, 75-81.
- 508.** US FDA/CFSAN (2006). Bad bug book: handbook of foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. Available at: <https://www.fda.gov/downloads/food/foodsafety/foodborneillness/foodborneillnessfoodbornepathogensnaturalttoxins/badbugbook/ucm297627.pdf>
- 509.** VACHON, V., LAPRADE, R., SCHWARTZ, J. L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *J. Invertebr. Pathol.* 111(1), 1-12.
- 510.** VAILLANT, V., DE VALK, H., SAURA, C. (2012). Systèmes de surveillance des maladies d'origine alimentaire : sources, méthodes, apports, limites. *Santé animale-alimentation*, 3.
- 511.** VÄISÄNEN, O. M., MENTU, J., SALKINOJA-SALONEN, M. S. (1991). Bacteria in food packaging paper and board. *J. Appl. Microbiol.* 71, 130-133.
- 512.** VALERO, M., HERNANDEZ-HERRERO, L. A., FERNANDEZ, P. S., SALMERON, M. C. (2002). Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. *Food Microbiol.* 19, 491-499.
- 513.** VALJEVAC, S., HILAIRE, V., LISANTI, O., RAMISSE, F., HERNANDEZ, E., CAVALLO, J. D., POURCEL, C., VERGNAUD, G. (2005). Comparison of minisatellite polymorphisms in the *Bacillus cereus* complex: a simple assay for large-scale screening and identification of strains most closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6613-6623.
- 514.** VAN CAUTEREN, D., LE STRAT, Y., SOMMEN, C., BRUYAND, M., TOURDJMAN, M., DA SILVA, N. J., COUTURIER, E., FOURNET, N., DE VALK, H., DESENCLOS, J. C. (2017). Estimated Annual Numbers of Foodborne Pathogen-Associated Illnesses, Hospitalizations, and Deaths, France, 2008-2013. *Emerg. Infect. Dis.* 23(9), 1486-1492.
- 515.** VAN DER AUWERA, G., MAHILLON, J. (2005). TnXO1, a germination-associated class II transposon from *Bacillus anthracis*. *Plasmid* 53, 251-257.
- 516.** VAN DER AUWERA, G., TIMMERY, S., HOTON, F., MAHILLON, J. (2007). Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. *Int. J. food*

microbiol. 113(2),164-172.

- 517.** VAN DER VOORT, M., KUIPERS, O. P., BUIST, G., DE VOS, W. M., ABEE, T. (2008). Assessment of CcpA-mediated catabolite control of gene expression in *Bacillus cereus* ATCC 14579. *BMC Microbiol.* 8:62. doi: 10.1186/1471-2180-8-62.
- 518.** VAN DER ZWET, W. C., PARLEVIET, G. A., SAVELKOUL, P. H., STOOF, J., KAISER, A.M., VAN FURTH, A. M. (2000). Outbreak of *Bacillus cereus* infections in a neonatal intensive care unit traced to balloons used in manual ventilation. *J. Clin. Microbiol.* 38(11), 4131-4136.
- 519.** VAN OSS C. J. (1993). Acid-base interfacial interaction Forces in Aqueous Media. *Colloid. Surface. A.* 78, 1-49.
- 520.** VAN OSS, C. J. (2003). Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. *J. Mol. Recognit.* 16(4),177-90.
- 521.** VANGOITSENHOVEN, R., MARIS, M., OVERBERGH, L., VAN LOCO, J., MATHIEU, C., VAN DER SCHUEREN, B. (2015). Cereulide food toxin, beta cell function and diabetes: Facts and hypotheses. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 109(1), 1-5.
- 522.** VANHAECKE, E., REMON, J. P., MOORS, M. (1990). Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion to 304 and 316-L Stainless Steel: Role of Cell Surface Hydrophobicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 788-795.
- 523.** VERHEUST, C., FORNELOS, N., MAHILLON, J. (2004). The *Bacillus thuringiensis* phage GIL01 encodes two enzymes with peptidoglycan hydrolase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 237, 289-295.
- 524.** VERHEUST, C., PAUWELS, K., MAHILLON, J., HELINSKI, D., HERMAN, P. (2010). Contained use of bacteriophages: Risk assessment and biosafety recommendations. *App. Biosaf.* 15, 32-44.
- 525.** VERSALOVIC, J., KOEUTH, T., LUPSKIL, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19, 6823-6831.
- 526.** VERSTRAETEN, N., BRAEKEN, K., DEBKUMARI, B., FAUVART, M., FRANSAER, J., VERMANT J., MICHIELS J. (2008). Living on a Surface : swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol.* 16, 496-506.
- 527.** VIBOUD, G. I., MCCONNELL, M. M., HELANDER, A., SVENNERHOLM, A. M. (1996). Binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* expressing different colonization factors to tissue-cultured Caco-2 cells and to isolated human enterocytes. *Microbiol. Pathogen.* 21, 139-147.
- 528.** VIEIRA, M. J., MELO, L., PINHEIRO, M. M. (1993). Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling* 7, 67-80.
- 529.** VILAS-BOAS, G., PERUCA, A., ARANTES, O. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* 53(6), 673-687.
- 530.** VILAS-BOAS, G., SANCHIS, V., LERECLUS, D., LEMOS, M. V. F., BOURGUET, D. (2002). Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(3), 1414-1424.
- 531.** VILAS-BOAS, L. A., VILAS-BOAS, G. F., SARIDAKIS, H. O., LEMOS, M. V., LERECLUS, D., ARANTES, O. M. (2000). Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 255-259.

532. VON STETTEN, F., FRANCIS, K. P., LECHNER, S., NEUHAUS, K., SCHERER S. (1998). Rapid discrimination of psychrotolerant and mesophilic strains of the *Bacillus* group by PCR targeting of 16S r DNA. *J. Microbiol. Meth.* 34, 99-106.
533. VON STETTEN, F., MAYR, R., SCHERER, S. (1999). Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. *Environ. Microbiol.* 1, 503-515.
534. VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES M. (1995). AFLP : A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23(21), 4407-4414.
535. WALSH, P. S., METZGER, D. A., HIGUCHI, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Bio Techniques* 10, 506-513.
536. WANG, A., ASH, G. J. (2015). Whole genome phylogeny of *Bacillus* by Feature Frequency Profiles (FFP) *Sci Rep.* 5(13644). doi: 10.1038/srep13644.
537. WEBER, D. J., SAVITEER, S. M., RUTALA, W. A., THOMANN, C. A. (1988). In vitro susceptibility of *Bacillus* spp. to selected antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemothe.* 32, 642-645.
538. WEHRLE, E., DIDIER, A., MORAVEK, M., DIETRICH, R., MÄRTLBAUER, E. (2010). Detection of *Bacillus cereus* with enteropathogenic potential by multiplex real-time PCR based on SYBR Green I. *Mol. Cell. Probes* 24, 124-130.
539. WEHRLE, E., MORAVEK, M., DIETRICH, R., BÜRK, C., DIDIER, A., MÄRTLBAUER, E. (2009). Comparison of multiplex PCR, enzyme immunoassay and cell culture methods for the detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus*. *J. Microbiol. Meth.* 78, 265-270.
540. WELLS-BENNIK, M. H., EIJLANDER, R. T., DEN BESTEN, H. M., BERENDSEN, E. M., WARDA, A. K., KRAWCZYK, A. O., NIEROP GROOT, M. N., XIAO, Y., ZWIETERING, M. H., KUIPERS, O. P., ABEE, T. (2016). Bacterial spores in food: survival, emergence, and outgrowth. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 7, 457-482.
541. WENG, Y. M., CHEN, M. J., CHEN, W. (1999). Antimicrobial food packing materials from poly (ethylene-co-methacrylic acid). *LWT – Food. Sci. Technol.* 32, 191-195.
542. WHITEHEAD, K. A., COLLINGON, J. S., VERRAN, J. (2004). The production of surfaces of defined topography and chemistry for microbial retention studies, using ion beam sputtering technology. *Inter. Biodeterior. Biodegrad.* 54, 143-151.
543. WHITMAN, P. A., MARSHALL, R. T. (1971). Isolation of psychrophilic bacteriophage-host systems from refrigerated food products. *Appl. Microbiol.* 22, 220-223.
544. WHO (2008). Foodborne disease outbreaks: Guidelines for investigation and control. Geneva. Available at: http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/outbreak_guidelines.pdf
545. WHO (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1
546. WHO (2017). Stage 1: investigating foodborne disease outbreaks in Strengthening surveillance of and response to foodborne diseases: a practical manual. Geneva. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259475/9789241513234->

eng.pdf;jsessionid=7C1298192700EB745CCB93203B827CE5?sequence=1

- 547.** WIENCEK, K. M., KLAPES, N. A., FOEGEDING, P. M. (1990). Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* Spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(9), 2600-2605.
- 548.** WIJMAN, J., DE LEEUW, P., MOEZELAAR, R., ZWIETERING, M., ABEE, T. (2007). Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation and dispersion. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1481-1488.
- 549.** WIJNANDS, L. M., DUFRENNE, J. B., ROMBOUTS, F. M., IN 'T VELD, P. H., VAN LEUSDEN, F. M. (2006). Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in the Netherlands. *J. Food Prot.* 69(11), 2587–2594.
- 550.** WILLIAMS J. G., KUBELIK A. R., LIVAK K. J., RAFALSKI J. A., TINGEY S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18(22), 6531-6535.
- 551.** WOMMACK, K. E., WILLIAMSON, K. E., HELTON, R. R., BENCH, S. R., WINGET, D. M. (2009). Methods for the isolation of viruses from environmental samples. *Bacteriophages* 1, 3-14.
- 552.** WONG, A. C. L. (1998). Biofilms in food processing environments. *J. Dairy Sci.* 81(10), 2765-2770.
- 553.** WOTEKI, C. E., KINEMAN, B. D. (2003). Challenges and approaches to reducing foodborne illness. *Annu. Rev. Nutr.* 23(1), 315-344.
- 554.** YANG, I. C., SHIH, D. Y., HUANG, T. P., HUANG, Y. P., WANG, J. Y., PAN, T. M. (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.
- 555.** YANG, Y., GU, H., YU, X., ZHAN, L., CHEN, J., LUO, Y., ZHANG, Y., ZHANG, Y., LU, Y., JIANG, J., MEI, L. (2017). Genotypic heterogeneity of emetic toxin producing *Bacillus cereus* isolates from China. *FEMS Microbiol. Lett.* 364(1). doi: 10.1093/femsle/fnw237.
- 556.** YIBAR, A., ÇETINKAYA, F., SOYUTEMİZ, E., YAMAN, G. (2017). Prevalence, enterotoxin production and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* isolated from milk and cheese. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Der.* 23 (4), 635-642.
- 557.** YUAN, Y., GAO, M., PENG, Q., WU, D., LIU, P., WU, Y. (2014). Genomic analysis of a phage and prophage from a *Bacillus thuringiensis* strain. *J. Gen. Virol.* 95, 751-761.
- 558.** YUAN, Y., GAO, M., WU, D., LIU, P., WU, Y. (2012). Genome Characteristics of a Novel Phage from *Bacillus thuringiensis* Showing High Similarity with Phage from *Bacillus cereus*. *PLOS ONE* 7(5) : e37557.
- 559.** ZERAIK, A., E., NITSCHKE, M. (2010). Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogeni bacteria to polystyrene surfaces: effect of temperature and hydrophobicity. *Curr. Microbiol.* 61, 554-559.
- 560.** ZHANG, J., HODGMAN, T. C., KRIEGER, L., SCHNETTER, W., SCHAIRER, H. U. (1997). Cloning and analysis of the first cry gene from *Bacillus popilliae*. *J. Bacteriol.* 179, 4336-4341.
- 561.** ZHANG, Z., FENG, L., XU, H., LIU, C., SHAH, N. P., WEI, H. (2015). Detection of viable enterotoxin-producing *Bacillus cereus* and analysis of toxigenicity from ready to- eat foods and infant formula milk powder by multiplex PCR. *J. Dairy Sci.* 99, 1047-1055.
- 562.** ZHANG, Y., HU, Z. (2013). Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with bacteriophages and chlorine. *Biotechnol. Bioeng.* 110(1), 286-295.

563. ZHENG, J., GAO, Q., LIU, L., LIU, H., WANG, Y., PENG, D., RUAN, L., RAYMOND, B., SUN M. (2017). Comparative genomics of *Bacillus thuringiensis* reveals a path to specialized exploitation of multiple invertebrate hosts. *MBio* 8(4) : e00822.
564. ZHOU, G., ZHENG, D., DOU, L., CAI, Q., YUAN, Z. (2010). Occurrence of psychrotolerant *Bacillus cereus* group strains in ice creams. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 143-146.
565. ZIGHA, A., ROSENFELD, E., SCHMITT, P., DUPORT, C. (2006). Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression. *Arch. Microbiol.* 185, 222-233.
566. 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.
567. ZOTTOLA, A. E., SASAHARA, K. C. (1994). Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern? *Int. J. Food Microbiol.* 23, 125-148.
568. ZWICK, M. E., JOSEPH, S. J., DIDELOT, X., CHEN, P. E., BISHOP-LILLY, K. A., STEWART, A. C., WILLNER, K., NOLAN, N., LENTZ, S., THOMASON, M. K., SOZHAMANNAN, S., MATECZUN, A. J., DU, L., and READ, T. D. (2012). Genomic characterization of the *Bacillus cereus sensu lato* species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. *Genome Res.* 22(8), 1512-1524.

Titre : Maitrise des risques de contamination des produits alimentaires par le groupe *Bacillus cereus*.

Mots clés : groupe *Bacillus cereus*, aliments, risque, diversité, biofilm, bactériophages, biocontrôle, Tunisie

Cette thèse s'est intéressée à évaluer le niveau de risque représenté par les bactéries du groupe *Bacillus cereus* dans des aliments tunisiens et à tester l'efficacité de leur contrôle par le traitement des surfaces industrielles par des bactériophages. Une collection de 191 isolats a été créée à partir de 687 matrices alimentaires. Près de 40 % des isolats se sont avérés appartenir au groupe, avec une forte diversité génétique (143 profils PFGE et 99 profils ERIC-PCR) et un profil thermique intermédiaire (signatures *16S rDNA-1 m* et-*2 p*). Près de 60 % des isolats du groupe appartiennent au groupe phylogénétique III, potentiellement pathogène. Les spores présentent majoritairement un taux d'adhésion plus fort que les cellules végétatives. Douze groupes toxigènes ont été mis en évidence. Au moins un des gènes de chacun des complexes NHE et HBL sont présents, associés

ou non à *bceT*, *cytK-2* et *ces*. Après 18 h d'incubation à 30°C, près de 71% des isolats sont cytotoxiques. Différentes combinaisons de facteurs de virulence sont associées au potentiel cytotoxique et un lien apparaît clairement entre cytotoxicité et type d'aliment. La collection s'est montrée sensible à de nombreux antibiotiques, alors qu'elle présente une résistance à l'ampicilline et à la novobiocine. Sur les 7 bactériophages sélectionnés, 5 possèdent un profil protéique unique alors qu'ils présentent tous une taille de génome et des profils de restriction similaires. Ils permettent de prévenir la formation de biofilms et de les traiter. Ce travail confirme le risque sanitaire lié à la présence du groupe *B. cereus* dans les aliments tunisiens et le rôle prometteur des bactériophages comme outils de biocontrôle.

Title : Contamination risks control of food products by *Bacillus cereus* group.

Keywords : *Bacillus cereus* group, food, risk, diversity, biofilm, bacteriophages, biocontrol, Tunisia

This thesis focused on evaluating the level of risk represented by *Bacillus cereus* group bacteria in Tunisian food and testing the effectiveness of their control by treating industrial surfaces with bacteriophages. A collection of 191 isolates was created from 687 food matrices. Nearly 40% of the isolates were found to belong to the group, with high genetic diversity (143 PFGE profiles and 99 ERIC-PCR profiles) and an intermediate thermal profile (signatures *16S rDNA-1 m* and-*2 p*). Nearly 60% of the group's isolates belong to the phylogenetic group III, which is potentially pathogenic. Spores have a higher rate of adhesion than vegetative cells. Twelve toxigenic groups have been identified. At least one of the genes of each of the NHE and HBL complexes are present, whether or not associated with

bceT, *cytK 2* and these. After 18 hours of incubation at 30°C, nearly 71% of the isolates are cytotoxic. Different combinations of virulence factors are associated with cytotoxic potential and a clear link appears between cytotoxicity and food type. The collection has been shown to be sensitive to many antibiotics, while it is resistant to ampicillin and novobiocin. Of the 7 bacteriophages selected, 5 have a unique protein profile while all have similar genome size and restriction profiles. They are used to treat and prevent the formation of biofilms. This work confirms the health risk associated with the presence of the *B. cereus* group in Tunisian foods and the promising role of bacteriophages as biocontrol tools.

