

Université catholique de Louvain
Faculté d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale



Caractéristiques phénotypiques des *Bacillus cereus* émétiques

Elise N'guessan

Thèse présentée en vue
de l'obtention du grade de Docteur en
Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique

Président	Prof. Pierre Defourny
Promoteur	Prof. Jacques Mahillon
Lecteurs	Prof. Michel Ghislain Prof. Marianne Sindic Dr. Katelijne Dierick Dr. Marie-Laure De Buyser

Année académique 2010-2011
Louvain-la-Neuve

A ma famille

Remerciements

À la clôture de cette thèse, je voudrais adresser un mot de remerciements à tous ceux et toutes celles qui de près ou de loin m'ont aidé dans la réalisation de ce travail. Merci au Professeur Jacques Mahillon qui malgré son agenda extrêmement chargé, a toujours été disponible pour des réunions et des conseils précieux. Son implication particulière, ainsi que ses conseils instructifs et pédagogiques m'ont permis de mener à bien ce travail. Merci aux Docteurs Katelijne Dierick et Marie-Laure De Buyser, aux Professeurs Marianne Sindic, Michel Ghislain et Pierre Defourny, d'avoir pris de leur temps à parcourir ce travail et d'avoir accepté de l'évaluer en tant que membres du Jury. Merci au Professeur Mireille Dosso, grâce à qui l'isolement de mes souches émétiques a été possible en CI. Merci également à Annette Kreuwels pour sa disponibilité ainsi que pour son soutien exceptionnel. Merci à Marleen Abdel Massih et à Pauline Modrie pour leurs soutiens et encouragements ainsi que leur accueil chaleureux durant ces années. Quant à Sophie Timmerly et à François Louesse, je leur dis merci pour leur collaboration assidue. Que dire à Sophie Hardenne, Abir et à Valentine pour leur disponibilité et leur coup de main précieux lors du séquençage de ma souche ? Soyez infiniment remerciées. Merci aussi à Laurence Delbrassinne qui a su trouver le temps de relire une partie de ce travail. Je voudrais également dire merci à Géraldine, à Daniel, à Nadine, à Elise, à Carole, à Virginie, à Sandy, à Olivier, à Annika, à Florence pour avoir tous participé de près ou de loin à la réussite de cette thèse. Jamais je ne refermerai cette liste de remerciements sans m'adresser à mon Frère et sincère Ami, Dr Edouard Kouakou, qui bien qu'étant à des milliers de kilomètres d'ici, n'a cessé de m'apporter son soutien, ses conseils et ses encouragements. Enfin, Je dis merci à ma fille adorée Eva dont le sourire radieux m'a permis de surmonter plusieurs difficultés, à mes parents pour leur soutien tout au long de ces années d'études, à Alabi Taofic, Lucie Kablan ainsi qu'à tous mes amis, pour avoir contribué à ces merveilleuses années. MERCI à TOUS !

Résumé

Bacillus cereus est un pathogène alimentaire, responsable de deux types de syndromes d'intoxication. La forme diarrhéique, au travers de la production d'entérotoxines et la forme émétique, via la production de la toxine émétique, le céréulide. *B. cereus* peut être isolé à partir de plusieurs types d'aliments. Cependant, les données épidémiologiques montrent que le syndrome émétique est généralement associé à la consommation d'aliments farineux tels que le riz et les pâtes. Afin de mieux comprendre pourquoi d'autres denrées telles que les légumes, les salades ou même le lait ne sont pas associés à ce type d'intoxication, différents aliments ont été analysés en vue d'isoler et de caractériser des *B. cereus* émétiques. Sur 393 échantillons d'aliments investigués, 409 souches de *B. cereus* ont été isolées et six souches émétiques ont été identifiées. La moitié des souches émétiques a été isolée à partir d'aliments, n'étant généralement pas impliqués dans les intoxications émétiques.

Les *B. cereus* isolés ont été inclus dans une étude de distribution et de diversité réalisée sur une collection de 2,000 souches provenant de diverses origines. Cette étude a mis en évidence une importante diversité au sein des souches émétiques. Afin d'étudier en détail cette diversité, plus de 70 propriétés métaboliques d'une collection de 33 souches émétiques ont été analysées. Plusieurs différences phénotypiques ont été mises en évidence.

Dans la plupart des intoxications alimentaires émétiques, les tests microbiologiques effectués révèlent un nombre important de souches émétiques. Afin de mieux comprendre le comportement de ces dernières vis-à-vis d'autres *B. cereus* non émétiques, une souche

émétique mutante spontanée, résistante à l'antibiotique rifampicine a été utilisée comme inoculum. L'objectif étant d'imiter la réalité des intoxications émétiques, des échantillons de riz ont été utilisés comme matrices alimentaires. Une forte croissance de la souche émétique mutante a été observée 24 heures après inoculation, atteignant des taux de 10^3 - 10^8 unités formant colonies par gramme de riz. La toxine émétique a également été détectée dans le riz par la chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse.

Table des matières

Chapitre 1. Introduction	1
I.1 Le groupe <i>Bacillus cereus</i>	3
I.1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
I.1.2 <i>Bacillus anthracis</i>	8
I.1.3 <i>Bacillus mycoides</i> et <i>Bacillus pseudomycoides</i>	10
I.1.4 <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	11
I.2 <i>Bacillus cereus</i> sensu stricto	12
I.2.1 Ecologie de <i>Bacillus cereus sensu stricto</i>	13
I.2.1.1 Réservoirs primaires	13
I.2.1.2 <i>Bacillus cereus</i> dans les aliments	13
I.2.2 Toxi-infection et intoxications alimentaires liées à <i>Bacillus cereus</i>	14
I.2.2.1 Le syndrome diarrhéique	14
I.2.2.2 Le syndrome émétique	15
I.2.2.3 Enumération de <i>Bacillus cereus</i> dans les aliments	17
I.3 Toxines de <i>Bacillus cereus</i>	20
I.3.1 Toxines diarrhéiques	20
I.3.2 Toxine émétique	22
I.3.2.1 Historique de la toxine émétique	22
I.3.2.2 Structure du céréulide : la toxine émétique	23
I.3.2.3 Diversité des souches émétiques	28

I.3.2.4 Méthode de détection et de quantification du cereulide ..	29
I.4 Régulation des facteurs de virulence chez <i>Bacillus cereus</i>	30
I.4.1 Les régulons <i>PlcR</i> et <i>NprR</i>	30
I.4.2 Régulation de l'expression du céréulide	33
I.4.2.1 Régulation génétique	33
I.4.2.2 Facteurs affectant la production du céréulide	34
Chapitre 2. Objectifs de l'étude.....	38
Chapitre 3. Résultats.....	40
3.1 Distribution et diversité des souches émétiques	40
3.2 Diversité phénotypique des souches de <i>Bacillus cereus</i> émétiques ..	64
3.3 Comportement d'une souche émétique de <i>Bacillus cereus</i> dans le riz	94
Chapitre 4. Discussion générale.....	120
4.1 Souches émétiques et sécurité alimentaires	120
4.2 Diversité phénotypique des souches émétiques.....	123
4.3 Comportement d'une souche émétique de <i>Bacillus cereus</i> dans le riz	127
Chapitre 5. Conclusions et perspectives.....	131
Chapitre 6. Références	135

Liste des abréviations

AFSCA	agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire
BCET	enterotoxines de <i>Bacillus cereus</i>
BHI	brain heart infusion
CcpA	catabolite control protein A
Ces	cereulide
CFU	colony forming unit
Cry	gène de l'endotoxine cristalline
cspA	cold-shock protein A
Cyt K	cytotoxine K
EFSA	european food safety authority
HBL	hemolysine BL
ISO	international organization for standardization
ISP	institut de santé publique
k5975cR	<i>Kinrooi</i> 5975 c rifampicin-résistant
LacI/GalR	lactose repressor/galactose repressor protein
LB	Luria Bertani
LC-MS	liquid chromatography-ion trap mass spectrometry
MLST	multi locus sequence typing
MYP	mannitol-egg yolk-polymixin
NHE	non-hemolytic enterotoxin
NprA	neutral protease A
NprR	neutral protease R
NRPS	non-ribosomal peptide synthetase
PBW	peptone buffer water
PCR	polymerase chain reaction
PFGE	pulsed-field gel electrophoresis
PlcR	phospholipase C regulator
PrgX	sex pheromone receptor
Rap	regulator aspartyl-phosphate
RAPD	random amplified polymorphic DNA
<i>s.l.</i>	<i>sensu lato</i>
<i>s.s.</i>	<i>sensu stricto</i>

Chapitre 1 : Introduction

Les spores de *B. cereus* sont ubiquistes et peuvent contaminer les aliments via les matières premières. Elles sont capables de résister aux traitements thermiques ainsi qu'à d'autres procédures telles que la déshydratation, la dessiccation, la désinfection et autres facteurs environnementaux, qui empêchent le développement d'autres bactéries capables de rentrer en compétition avec elles. Ce pathogène alimentaire peut ainsi causer de sérieux problèmes tels que le changement de texture et le développement de saveurs indésirables dans l'industrie alimentaire. Aussi, compte tenu de sa psychrotolérance, cette bactérie constitue un potentiel pathogène émergent des produits réfrigérés prêts à la consommation (Rajkovic *et al.*, 2006a; Bartoszwicz *et al.*, 2008).

B. cereus demeure une cause importante d'intoxications alimentaires dans le monde (Schmidt, 2001). Cependant, le nombre d'intoxications qui lui sont liées est généralement sous-estimé, étant donné que leur déclaration n'est pas obligatoire (El-Banna, A.A., 2009). Les deux principaux types de syndromes diarrhéique et émétique provoqués par *B. cereus* sont généralement bénins, cependant certains cas graves et même mortels ont été rapportés ces dernières années (Malher *et al.*, 1997; Lund *et al.*, 2000; Dierick *et al.*, 2005; Posfay-Barbe *et al.*, 2008; Shiota *et al.*, 2010).

En Belgique, deux cas d'intoxications émétiques ont été signalés (M. Naranjo and colleagues, com. Pers., 2009; Dierick *et al.*, 2005). Ils concernaient une fillette de 7 ans et un jeune homme d'une vingtaine d'années, tous deux décédés après avoir consommé des plats de pâtes contenant un nombre important de *B. cereus* émétiques. Plusieurs

travaux ont établi un lien direct entre les intoxications émétiques et la consommation de produits alimentaires farineux, alors que *B. cereus* est très répandu dans la nature. Il est évident qu'une meilleure connaissance de ces souches émétiques s'avère nécessaire afin de mieux comprendre leur mode de fonctionnement. Cela pourrait contribuer à un développement futur de méthodes permettant de détecter facilement les souches émétiques et de réduire potentiellement les intoxications alimentaires qui leur sont attribuées.

I. 1 Le groupe *B. cereus*

Le groupe *B. cereus* comprend six espèces de bactéries Gram-positives formant des endospores et qui sont génétiquement très proches. Ces espèces, regroupées sous le nom de *Bacillus cereus sensu lato* sont : *B. cereus sensu stricto*, un pathogène opportuniste pour les humains ainsi que les animaux ; *Bacillus anthracis*, responsable de l'anthrax également chez les humains et les animaux ; *Bacillus thuringiensis*, un pathogène des insectes ; *Bacillus weihenstephanensis* qui est psychrotolérant ; *Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycoides*, des espèces non pathogènes et qui se distinguent des autres membres du groupe par l'aspect particulier de leurs colonies rhizoïdes sur milieu nutritif solide. La distinction entre ces deux espèces est basée sur leur composition en acide gras. Les membres de ce groupe appartiennent à la famille des *Bacillaceae*. Ce sont, pour la plupart des anaérobies facultatives, mobiles par flagelles péritriche ou immobiles.

Malgré leur proximité génétique, les relations phylogénétiques et taxonomiques précises des membres du groupe *B. cereus*, restent encore controversées (Helgason *et al.*, 2004). La classification des bactéries de ce groupe était initialement basée sur des caractères phénotypiques tels que la formation d'inclusions cristallines parasporales composées de protéines insecticides chez *B. thuringiensis* et la présence de capsule chez *B. anthracis*. Cependant, malgré ces différences phénotypiques, la comparaison des séquences nucléotidiques de leurs ARN ribosomiaux 16S a montré moins de 1 % de divergence (Ash *et al.*, 1991). Selon plusieurs études, *B. cereus s.s.*, *B. anthracis*, et *B. thuringiensis* pourraient être considérés comme appartenant à une même espèce. En effet, les principales différences

entres ces espèces sont basées sur leurs facteurs de virulences, codés par des gènes qui sont portés par des plasmides. En outre, certains de ces plasmides peuvent être échangés entre les membres du groupe *B. cereus* (Thomas *et al.*, 2000 ; Van Der Auwera *et al.*, 2007). Par conséquent, si une souche de *B. thuringiensis* perd ses plasmides, elle devient indiscernable de *B. cereus sensu stricto*. Plusieurs méthodes d'analyses décrites dans la littérature visent à distinguer les membres du groupe *B. cereus* : MLEE (MultiLocus Enzyme Electrophoresis) (Carlson *et al.*, 1994; Helgason *et al.*, 1998; Helgason *et al.*, 2000), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Hill *et al.*, 2004; Keim *et al.*, 1997; Ticknor *et al.*, 2001), rep-PCR (Cherif *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2001; Reyes-Ramirez & Ibarra, 2005) et MLST (MultiLocus Sequence Typing) (Helgason *et al.*, 2004; Sorokin *et al.*, 2006). Cependant, aucune de ces études ne permet de séparer clairement ces espèces. Néanmoins, la pathogénicité de *B. anthracis* et l'utilisation de *B. thuringiensis* comme agent de lutte biologique en agriculture ont pris le dessus sur les considérations taxonomiques. Ces espèces sont par conséquent toujours considérées comme séparées. Une division du groupe *B. cereus sensu lato* en sept grand groupes phylogéniques (I-VII), basés sur des critères génétiques et phénotypiques a été proposée récemment (Table 1) (Guinebretière *et al.*, 2008). Selon cette classification, chaque groupe correspond à un « thermotype » particulier qui montre clairement la différence entre les capacités à se développer à basses ou hautes températures. Aussi, des capacités de virulence peuvent être associées à chaque groupe. Les bactéries du groupe VII dans cette nouvelle classification, qui se développent à haute température constituent une nouvelle espèce appelée « *B. cytotoxicus* » (Carlin *et al.*, 2009).

Tableau 1. Les sept groupes de *B. cereus* (Guinebretière *et al.*, 2008)

Groupes Espèces	Espèces	Association à des toxi-infections alimentaires	Températures (°C) de croissance	Résistance des spores ^a	Observations ^b
I	<i>B. pseudomycoides</i>	Non	10-40	nd	Mésophiles ; colonies rhizoïdes sur agar
II	<i>B. cereus</i> II, <i>B. thuringiensis</i> II	Oui	7-40	++	La plupart des souches sont psychrotolérantes. Le variant psychrotolérant du gène <i>cspA</i> est absent
III	Souches émétiques <i>B. cereus</i> III, <i>B. thuringiensis</i> III <i>B. anthracis</i>	Oui	15-45	+++	Mésophile
IV	<i>B. cereus</i> IV, <i>B. thuringiensis</i> IV	Oui	10-45	++	Mésophile
V	<i>B. cereus</i> V, <i>B. thuringiensis</i> V	Oui	8-40	++	Mésophile
VI	<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycoides</i> <i>B. thuringiensis</i> VI	Non	5-37	+	Toutes les souches sont psychrotolérantes. Le variant psychrotolérant du gène <i>cspA</i> est présent
VII	<i>B. cytotoxicus</i>	Oui	20-50	+++	Thermotolérant; très peu de souches de ce groupe ont été trouvées, mais très souvent associées à des toxi-infections alimentaires

nd, non déterminé

^a Classement établi par Afchain *et al.* (2008); Carlin *et al.* (2006, 2009).

^bCspA : Major Cold Shock Protein A

I.1.1 *B. thuringiensis*

B. thuringiensis est une bactérie ubiquiste, d'origines diverses telles que le sol, les insectes, les excréments d'animaux végétariens, les produits végétaux entreposés ainsi que les habitats aquatiques (Martin and Travers, 1989). L'énorme succès biotechnologique de ce pathogène réside dans sa capacité à produire des inclusions cristallines protéiques (δ -endotoxines) nommées « protéine Cry », au cours de la sporulation. Les δ -endotoxines, utilisées comme pesticides biologiques ont un large spectre d'action spécifique contre plusieurs groupes d'insectes : Lépidoptères, Diptères, Coléoptères, certains Nématodes et aussi les Protozoaires (Feitelson *et al.*, 1992 ; Sauka and Benintende, 2008). Trois applications principales des protéines Cry ont été rapportées. Il s'agit du contrôle des ravageurs de cultures, du contrôle des moustiques qui véhiculent des maladies humaines et du développement des plantes résistantes aux insectes transgéniques (Bravo *et al.*, 2007).

Les protéines Cry sont codées par les gènes *cry*, localisés sur des grands plasmides, de 50 à 350 kb en taille (Gonzalez *et al.*, 1982 ; Höfte and Whiteley, 1989) et très rarement sur des chromosomes (Kronstad *et al.*, 1983). *B. thuringiensis* possède des similarités phénotypiques avec *B. cereus* s.s., incluant la mobilité, l'activité hémolytique, la résistance à l'ampicilline. Comme indiqué précédemment, la seule caractéristique qui permet de différencier ces deux espèces est la présence d'inclusions cristallines protéiques chez *B. thuringiensis*. Selon plusieurs études, le transfert par conjugaison des gènes qui codent pour ces inclusions cristallines est plus fréquent chez les insectes que dans le sol stérilisé. (Vilas-Boas *et al.*, 2000). A ce

jour, plus de 400 gènes *cry* ont été séquencés et classés en 51 groupes différents en fonction de la similarité (Vilas-Boas *et al.*, 2007). Les protéines Cry appartiennent à la classe des toxines bactériennes « PFT » (Pore-Forming Toxin). En plus de la toxine Cry, cette classe contient d'autres toxines bactériennes telles que la colicine A de *Pseudomonas*, ou encore la toxine diphtérique (Parker and Feil, 2005).

Le mode d'action des protéines cristallines comprend plusieurs étapes qui conduisent à la lyse de la cellule hôte. Après ingestion, les cristaux protéiques sont solubilisés dans l'environnement alcalin de l'intestin des insectes sensibles. Les pro-toxines Cry libérées sont ensuite activées par les protéases intestinales. Ces formes actives des toxines vont se fixer spécifiquement sur des récepteurs de l'épithélium intestinal, s'insérer dans la membrane et créer des pores provoquant la fuite du contenu de la cellule, ce qui conduit à la mort des cellules intestinales et bien évidemment à la mort de la larve (Schnepf *et al.*, 1998 ; Bravo *et al.*, 2007).

La spécificité et l'innocuité de ces δ -endotoxines vis-à-vis des végétaux, des animaux et de la faune entomologique non cible (abeilles, coccinelles) justifient, l'utilisation depuis plusieurs années de *B. thuringiensis* comme insecticide à l'échelle industrielle. En plus d'être introduits dans des microorganismes tels que *Escherichia coli*, plusieurs gènes *cry* sont utilisés dans les plantes telles que le tabac, le riz, le coton ou le maïs. Ces plantes transgéniques appelées « plantes Bt », ciblent certains ravageurs (Lépidoptères, Coléoptères) (Shelton *et al.*, 2002). Leur culture a non seulement des effets économiques positifs pour les producteurs mais permet aussi une réduction de l'utilisation des insecticides chimiques néfastes pour l'environnement. Cependant, parce qu'elles exposent les larves en

permanence à l'insecticide, les plantes transgéniques favorisent et accélèrent le développement de résistances chez les insectes. Des stratégies sont donc développées pour diminuer ou retarder l'apparition de ces populations d'insectes (Gould, 1998 ; Bourguet, 2004).

Certaines souches de *B. thuringiensis* produisent d'autres protéines ayant une activité insecticide en plus des toxines Cry. Parmi elles, les cytotoxines (Cyt) qui contrairement aux toxines Cry ne sont pas spécifiques des insectes mais sont hémolytiques et cytolytiques contre les cellules de mammifères.

Compte tenu de la similarité taxonomique de *B. thuringiensis* et de *B. cereus*, ainsi que l'introduction de plusieurs souches de *B. thuringiensis* dans les aliments via les insecticides à base de ce pathogène, il est raisonnable de penser que certaines infections alimentaires généralement attribuées à *B. cereus*, auraient pu être causées par *B. thuringiensis* (Rosenquist *et al.*, 2005). Des toxoinfections occasionnelles impliquant *B. thuringiensis* ont par ailleurs été rapportées (Jackson *et al.*, 1995).

I.1.2 *B. anthracis*

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). Les spores de *B. anthracis* sont très résistantes aux conditions environnementales défavorables et sont capables de survivre dans les sols contaminés pendant de longues périodes (Mock and Fouet, 2001). Ce pathogène est responsable de l'anthrax, la maladie du

charbon qui affecte les animaux, particulièrement les herbivores mais aussi les humains.

La maladie se présente sous trois formes distinctes : pulmonaire, gastro-intestinale et cutanée. La forme pulmonaire contractée par inhalation est la plus sévère. Les spores inhalées arrivent dans l'alvéole puis sont transportées par les macrophages jusqu'au système lymphatique, d'où elles vont germer et produire des exotoxines causant des problèmes pulmonaires aigus. La mort survient deux à trois jours après le début de l'infection et la létalité avoisine les 90% des cas humains (Spencer, 2003). Dans le cas de la maladie cutanée, l'infection se produit soit par pénétration de l'agent pathogène dans l'organisme lors de coupures ou de petites lésions cutanées, soit par contact avec des produits animaux contaminés (cuir) ou encore par contact direct avec des animaux infectés. Des pustules ressemblant à des piqûres d'insectes apparaissent sur la peau. La forme gastro-intestinale survient après ingestion de la viande mal cuite, provenant d'animaux ayant été contaminés par *B. anthracis*. Elle se traduit par une inflammation du tube digestif et provoque des nausées, des vomissements ainsi que des crampes d'estomac. Cette forme de l'anthrax, bien que très rare, peut être fatale.

La virulence de *B. anthracis* est associée à deux grands plasmides: pXO1 et pXO2 (Mikesell *et al.*, 1983). Le plasmide pXO1 contient les gènes *lef*, *cya*, and *pag* qui codent l'antigène protecteur (PA), le facteur létal (PF) et le facteur oedematogène (EF), respectivement. La combinaison de ces composants forme la toxine oedematogène (PA-EF) et la toxine létale (PA-LF). Le plasmide pXO2 contient les gènes *capA*, *capB*, et *capC*, nécessaires à la formation de la capsule. La

présence de ces deux plasmides est nécessaire pour une virulence totale de la bactérie (Uchida *et al.*, 1985; Wahab *et al.*, 2005).

B. anthracis a connu une triste notoriété. En effet, plusieurs pays ont utilisé cette espèce pour produire de l'anthrax, dans le cadre de leurs programmes d'armes biologiques. L'anthrax, en tant que vecteur de maladie, est le plus classique des toxiques biologiques de combat, en raison de sa longue capacité de survie dans l'environnement. Des enveloppes contaminées par des spores de *B. anthracis* ont provoqué 22 cas de maladie et causé la mort de cinq personnes au cours de l'année 2001, aux Etats Unis (Jernigan *et al.*, 2001 ; Wahab *et al.*, 2005).

I.1.3 *B. mycoides* et *B. pseudomycoides*

B. mycoides et *B. pseudomycoides* ont été initialement décrit par Flugge Validly, (1886, cité par Nakamura, 1998) et Nakamura, (1998), respectivement. Elles forment des colonies filamenteuses adhérentes sur les milieux nutritifs solides. Ces colonies rhizoïdes peuvent s'étendre sur plusieurs centimètres, dans le sens, ou le sens contraire, des aiguilles d'une montre (Fig. 1) (Di Franco *et al.*, 2002). *B. mycoides* et *pseudomycoides* peuvent être isolées à partir du sol, de la boue et des rhizosphères. Elles se différencient de *B. cereus* par l'apparence rhizoïde de leurs colonies et par leur composition en acides gras. Cependant des souches de *B. mycoides* ne présentant pas des colonies filamenteuses ont été identifiées (Jensen *et al.*, 2003). *B. mycoides* possède un pouvoir antagoniste contre les champignons tels que *Pythium mamillatum* qui affectent le concombre de serre (Pandey *et al.*, 1997 ; 2001 ; Guetsky *et al.*, 2001). Cependant, contrairement à la

plupart des membres du groupe *B. cereus*, *B. mycoides* et *B. pseudomycoides* ne sont jusqu'à présent pas reconnus comme des agents pathogènes pour l'homme (Guinebretière, 2008).

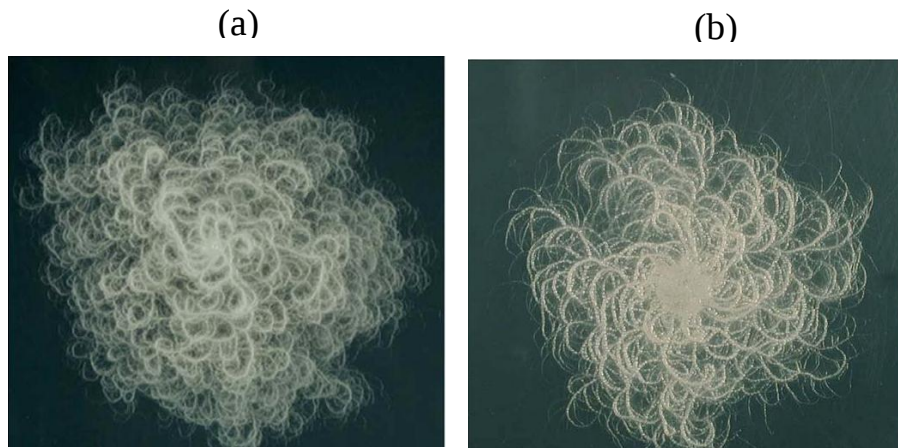


Fig. 1. Colonies de *B. mycoides*. (a) Les colonies s'étendent dans le sens des aiguilles d'une montre. (b) Dans le sens contraire des aiguille d'une montre (Di Franco *et al.*, 2002).

I.1.4 *B. weihenstephanensis*

Ces dernières années, plusieurs études concernant les souches psychrotolérantes de *B. cereus* ont été rapportées (Sutherland and Murdoch, 1994; Páčová *et al.*, 2003). L'espèce *B. weihenstephanensis* a été initialement proposée par Lechner *et al.* (1998) pour désigner des souches de *B. cereus*, capables de se développer entre 4°C et 7°C mais pas à 43°C et pouvant être identifiées par un variant particulier (psychrotolérant) du gène *cspA* codant pour la « cold-shock protein ». Malgré ces différences, l'existence d'une espèce distincte de *B. weihenstephanensis* est controversée.

Récemment, Guinebretière *et al.* (2008) ont montré que *B. cereus* peut être subdivisé en sept grands groupes génétiques (I à VII) sur base de limites de température. Ainsi, les souches psychrotolérantes sont réparties en deux différents groupes (II et VI) selon ces auteurs (Tableau 1). Cette division montre que le variant particulier du gène *cspA* n'est pas spécifique à tous les psychrotolérants et que toutes les souches psychrotolérantes de *B. cereus* ne sont pas nécessairement des *B. weihenstephanensis*. Cette distinction soulève une question de discrimination des deux types de psychrotolérants. Jusqu'ici, *B. weihenstephanensis* n'a pas pu être détecté dans des denrées impliquées dans une toxi-infection alimentaire, malgré son isolement à partir de différents produits alimentaires (Carlin *et al.*, 2009). Ce constat n'est cependant pas le cas des psychrotolérants du groupe II.

I.2 *B. cereus sensu stricto*

B. cereus sensu stricto est un bacille en forme de bâtonnet, ayant un diamètre d'environ 1.0 – 1.2 μm et une longueur de 3.0 – 5.0 μm . Les spores de *B. cereus* sont très résistantes aux conditions défavorables telles que la chaleur, la déshydratation, le dessèchement, ainsi qu'aux désinfectants et agents de nettoyage. Elles sont hautement hydrophobes, adhèrent facilement aux équipements et sont difficiles à éliminer. En plus de l'hydrophobicité, la présence d'exosporium et d'appendices (0,45-3,8 μm en longueur) contribueraient à la persistance des spores sur les équipements de traitement des denrées alimentaires et également à la formation de biofilm (Granum, 2007 ; Ankolekar and Labbé, 2010).

I.2.1 Ecologie de *B. cereus* s.s.

I.2.1.1 Réservoirs primaires

B. cereus est largement distribué dans l'environnement et possède plusieurs habitats. Le sol est considéré comme le réservoir primaire de cette bactérie, un gramme de sol est par ailleurs capable de contenir jusqu'à 4×10^5 spores de *B. cereus* (Chistiansson *et al.*, 1999). Selon Vilain *et al.* (2006), *B. cereus* serait capable de se développer et d'avoir un cycle de vie dans le sol. Outre le sol, les intestins des insectes et des rongeurs pourraient également constituer des niches naturelles de *B. cereus*, (Jensen *et al.*, 2003; Swiecicka *et al.*, 2006).

I.2.1.2 *B. cereus* dans les aliments

B. cereus peut être isolé à partir de différents types d'aliments et de plats préparés (Wijnands *et al.* 2006). Selon certaines études, ce pathogène est souvent isolé à partir des champs de riz et également du riz (Gilbert and Parry 1977; Ueda and Kwabara, 1993 ; Altayar and Sutherland, 2006). En effet, pendant la récolte et le traitement, le riz peut être contaminé par des spores de *B. cereus* présentes dans l'environnement. Ces dernières peuvent survivre au traitement thermique appliqué au riz puis proliférer lorsque le riz est entreposé à une température abusive.

I.2.2 Toxi-infection et intoxications alimentaires liées à *B. cereus*

I.2.2.1 Le syndrome diarrhéique

Le syndrome diarrhéique est la forme la plus anciennement diagnostiquée des infections provoquées par *B. cereus*. Les premiers incidents entraînant une hospitalisation de 300 personnes, furent décrits dès 1906. Une souche de *B. peptonificans* ayant toutes les caractéristiques d'un *B. cereus* actuel avait été identifiée. C'est en 1950 que *B. cereus* a véritablement été associé pour la première fois à une intoxication alimentaire de type diarrhéique (Hauge, 1955 cité dans Dromigny, 2008). Le syndrome diarrhéique est caractérisé par des douleurs abdominales, une diarrhée et occasionnellement des nausées et vomissements. Les symptômes apparaissent 8 à 16 heures après l'ingestion d'aliments contenant un nombre élevé de *B. cereus*, environ 10^4 CFU par gramme d'aliment. Le consommateur peut être exposé soit à des spores de *B. cereus*, soit à des cellules végétatives ou à la combinaison des deux, en fonction du type d'aliment consommé ou du traitement subi par l'aliment. Selon Andersson *et al.* (1998), la forme sous laquelle *B. cereus* est ingéré peut avoir un effet sur la production de la toxine dans l'intestin grêle. Trois entérotoxines sont proposées comme étant la cause des symptômes diarrhéiques : HBL et NHE qui sont des entérotoxines à trois composantes, et Cyt K qui est une protéine cytotoxique (Kramer and Gilbert, 1989; Michelet and Mahillon, 2003; Granum, 2007).

I.2.2.2 Le syndrome émétique

Le syndrome émétique est généralement associé à la consommation d'aliments farineux tels que les nouilles, les pâtes, le riz ainsi que les préparations à base de riz. Il est caractérisé par des nausées et des vomissements, qui se manifestent entre 0,5-6 h après ingestion de l'aliment contaminé. La rapidité de l'apparition des symptômes suggère que la toxine est préformée dans l'aliment (Agata *et al.*, 2002 ; Ehling-Schulz *et al.*, 2004a). L'agent responsable du syndrome émétique est un petit dodecadepsipeptide cyclique : le céréulide. Compte tenu de sa résistance, cette toxine émétique n'est détruite ni par la cuisson, ni par les enzymes digestives. Le syndrome émétique est généralement peu sévère, cependant, des cas d'intoxications graves, voire létales ont été rapportés ces dernières années en Europe et en Asie (Mahler *et al.*, 1997; Dierick *et al.*, 2005 ; M. Naranjo and colleagues, in preparation; Shiota *et al.*, 2010). Le récapitulatif de ces cas de syndrome émétique est présenté dans le Tableau 2.

Tableau 2: Récapitulatif des cas de syndromes émétiques (modifié de Shaheen, 2009)

Pays	Aliments impliqués	Description des cas	Tests réalisés	références
Suisse	Pâtes	Un adolescent de 17 ans et son père Gastro-entérite aigüe, insuffisance hépatique sévère Décès de l'adolescent, survenu trois jours après le repas <i>B. cereus</i> et la toxine émétique ont respectivement été isolé et détectée dans les pâtes	Test de vacuolation des cellules HEP-2	Mahler <i>et al.</i> , 1997
Belgique	Salade de pâtes	Cinq membres d'une famille contaminés Vomissements Décès de la fillette de 7 ans, 13 h après le repas, suite à une défaillance du foie <i>B. cereus</i> a été isolé à partir de l'intestin et de la rate : > 10 ⁸ CFU/g d'aliment	Isolement de <i>B. cereus</i> sur MYP PCR basée sur la détection du gène <i>ces</i>	Dierick <i>et al.</i> , 2005
Finlande	Salade de Pâtes et viande	Deux adultes 68% des <i>B. cereus</i> isolés étaient émétiques Détection de la toxine émétique	Isolement de <i>B. cereus</i> Test du sperme de verrat LC-MS	Pirhonen <i>et al.</i> , 2005
Allemagne	Riz et légumes	17 enfants de 3 à 5 ans Vomissement, une heure après le repas	PCR à temps réel Test de vacuolation des cellules HEP-2	Fricker <i>et al.</i> , 2007
Suisse	Pâtes, sauce	Une fillette de 9 ans Apparition des symptômes, 2 h après le repas Insuffisance rénale et hépatique La fillette recouvre la santé après une transplantation du foie	PCR basée sur la détection du gène <i>ces</i>	Pósfay-Barbe <i>et al.</i> , 2008
Japon	Riz cuit à l'huile	Un adolescent de 11 ans Vomissement et crampe abdominales, 30 min après le repas L'adolescent recouvre la santé, 41 jours après son admission à l'hôpital	Nd	Ichikawa <i>et al.</i> , 2009
Japon	Riz cuit à l'huile	Deux enfants et leur mère Vomissement, fièvre et perte de conscience Décès de l'enfant âgé de 1 an, 6 h après le repas La mère et la fillette de 2 ans ont recouvré la santé après un traitement consistant à un changement du plasma et à des hémodialyses <i>B. cereus</i> a été isolé à partir de l'estomac et du riz contaminé. Détection du céréulide dans le sérum sanguin des enfants	PCR à temps réel, basée sur la détection du gène <i>ces</i>	Shiota <i>et al.</i> , 2010
Belgique	Pâtes bolognaïses	Un jeune homme de 20 ans	Nd	M. Naranjo and coll. Com. Pers., 2009
nd, non déterminé				

I.2.2.3 Enumération de *B. cereus* dans les aliments

La détection et la quantification de *B. cereus* est un important devoir pour les laboratoires d'analyses cliniques et alimentaires. La méthode officielle décrite par la norme ISO 7932: 2004 (International Organization for Standardization) est actuellement préconisée pour l'énumération de ce pathogène (ISO, 2004). Selon cette méthode, l'isolement et le dénombrement de *B. cereus* à partir des aliments doivent se faire sur le milieu conventionnel MYP (Mannitol-Egg yolk-Polymyxine-Agar). Un aperçu schématique de cette énumération est présenté à la Fig. 2. Le milieu MYP, proposé en 1967 par Mossel et ses collaborateurs, est hautement adapté aux propriétés de *B. cereus*. Ce milieu contient en plus de l'agar, la polymixin B qui est un supplément électif. L'agar de base contient du D-mannitol et du rouge de phénol comme indicateur de coloration. Le milieu MYP permet de détecter la dégradation du mannitol par le changement de couleur de l'indicateur, du rouge vers le jaune. Compte tenu de l'incapacité de *B. cereus* à fermenter le mannitol, il n'y a pas de formation d'acide et le rouge de phénol ne vire pas au jaune. Les colonies de ce pathogène sont par conséquent, rose blanchâtre, entourées d'un précipité blanc qui indique l'hydrolyse de la lécithine contenu dans le jaune d'œuf, par la lécithinase produit par *B. cereus*. L'énumération de *B. cereus* sur le milieu MYP est délicate pour plusieurs raisons. Les colonies ne sont quelque fois pas distinctes du précipité qui les entoure. De plus, lorsque plusieurs souches sur la même boîte fermentent le mannitol, la coloration rose blanchâtre des colonies de *B. cereus* est moins visible. Certaines souches de *B. cereus*

produisent très peu ou pas de lecithinase (Slamti *et al.*, 2004). Les colonies formées par ces souches sont donc dépourvues du halo de précipité.

Selon la méthode officielle décrite par la norme, un test de confirmation des colonies présomptives de *B. cereus* doit être réalisé sur du milieu au sang de mouton. *B. cereus* est caractérisé par une activité hémolytique positive qui se traduit par la formation d'un halo transparent autour de la colonie, sur le milieu au sang. Cependant des études ont montré que certaines souches émétiques de *B. cereus* présentent une faible activité hémolytique ou sont totalement dépourvues de cette activité (Apetroaie *et al.*, 2005 ; Ehling Shulz *et al.* 2004a). Cela signifie qu'en cas d'analyses, ces souches pathogènes ne seraient pas considérées comme des souches de *B. cereus*.

L'usage du milieu MYP dans les laboratoires, pour les analyses de routine peut contribuer à une sous-estimation de l'occurrence de *B. cereus* dans les aliments et entraîner par la même occasion une sous-estimation de la proportion d'infections alimentaires attribuées à cette bactérie (Fricker *et al.*, 2007).

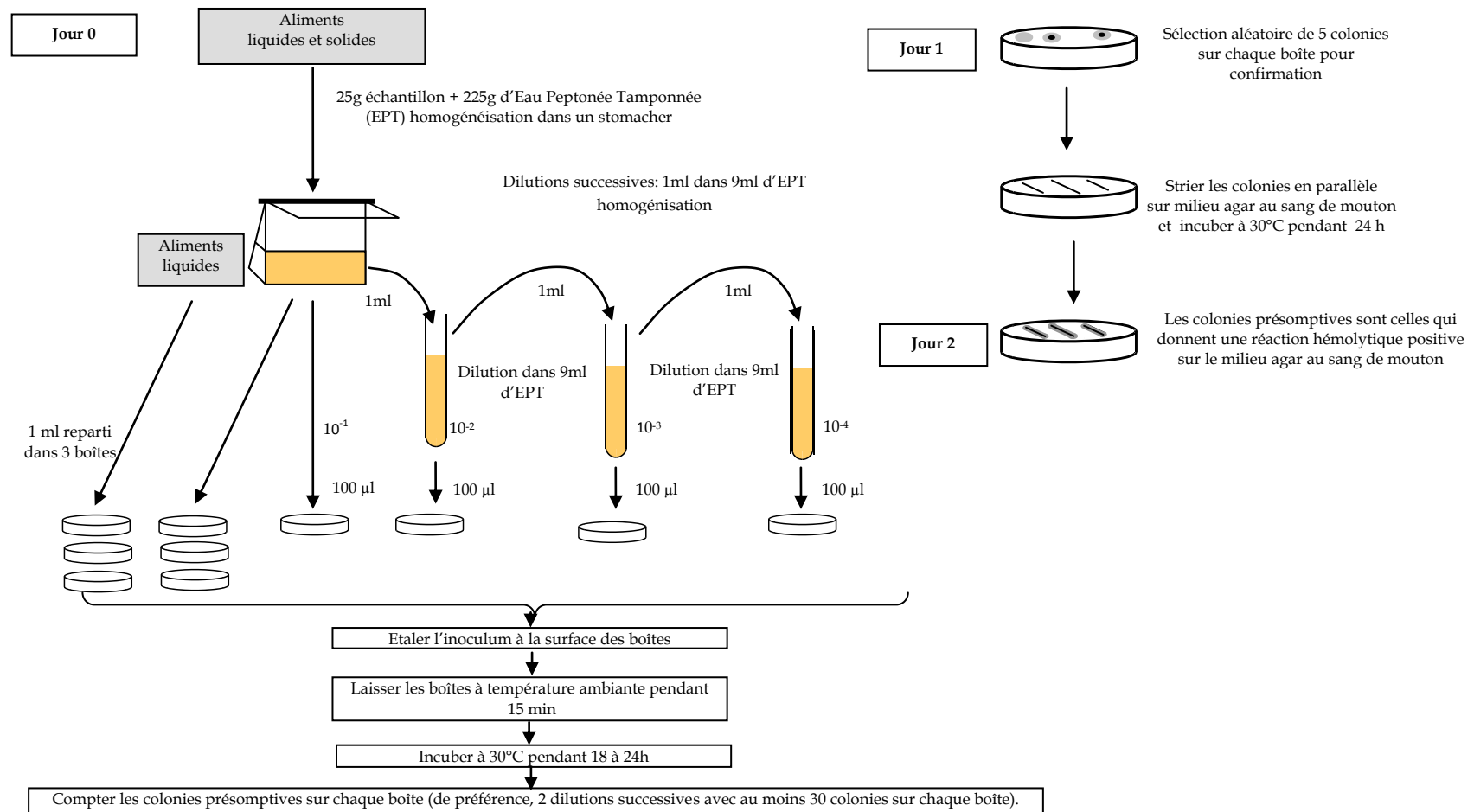


Fig. 2. Méthode pour l'énumération des colonies présomptives de *B. cereus* à 30 °C (D'après M. Abdelmassih, Laboratoire MBLA)

I.3 Toxines de *B. cereus*

I.3.1 Toxines diarrhéiques

Les toxines diarrhéiques regroupent l'hémolysine BL (HBL), la toxine non hémolytique (NHE) et la cytotoxine K (CytK) (Granum and Lund, 1997; Lund *et al.*, 2000). Deux autres entérotoxines, T (bceT) et FM ont été décrites. Cependant, leur implication dans les toxi-infections diarrhéiques n'a pas encore été mise en évidence (Choma and Granum, 2002). La toxine HBL est la mieux caractérisée chez *B. cereus sensu lato*. Elle est composée de trois sous unités protéiques : la sous-unité B, permettant la liaison de la toxine à la cellule cible et les sous-unités lytiques L1 et L2. *hblA*, *hblD* et *hblC* codent respectivement pour B, L1 et L2. La toxine NHE regroupe également trois composants protéiques codés par les gènes *nheA*, *nheB* et *nheC*, qui sont organisés en opérons. Le gène qui code NHE est présent dans toutes les souches de *B. cereus* testées lors de plusieurs études. Cependant, ceux qui codent pour HBL et CytK sont retrouvés dans moins de 50% des souches (Ehling-Schulz *et al.*, 2005a; Ngamwongsatit *et al.*, 2008).

En plus de son activité entérotoxique, HBL possède une activité hémolytique et dermonécrotique. Elle provoque en outre l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Beecher *et al.*, 1995). NHE peut causer une rupture de la membrane plasmique et former des pores dans les bicouches lipidiques (Fagerlund *et al.*, 2008). La présence de tous les composants des entérotoxines NHE et HBL est nécessaire pour une activité cytotoxique maximale.

La cytotoxine K (CytK) est une protéine de 34 kDa qui présente une activité dermonécrotique et une activité hémolytique. Son activité toxique sur les cellules Vero, sur les cellules CaCo2 et sur les cellules de l'épithélium intestinal de l'homme a également été montrée. Cette protéine est par ailleurs capable de former des pores dans les bicouches lipidiques (Lund *et al.*, 2000 ; Hardy *et al.*, 2001). CytK est une simple protéine cytotoxique qui appartient à la famille des « β -barrel pore-forming toxins ». Les toxines de cette famille sont sécrétées sous forme soluble puis assemblées en un pore transmembranaire. L' α -toxine, les leucocidines, la γ hemolysine de *Staphylococcus aureus*, ainsi que la β -toxine de *Clostridium perfringens* appartiennent également à cette famille (Michelet *et al.*, 2006; Andreeva *et al.*, 2007).

CytK a été isolée à partir de la souche de *B. cereus* NVH 391/98, qui a causé des gastroentérites sévères et la mort de trois personnes. Deux différentes formes, CytK-1 et CytK-2 ont été récemment décrites chez *B. cereus*. Bien que leurs séquences d'acides aminés présentent 89% d'identité, CytK-1 et CytK-2 diffèrent par leur activité biologique. CytK-1 est plus toxique que CytK-2 pour les cellules Véro et pour les cellules CaCo2. Cette toxine représente de ce fait un risque plus important pour l'homme (Guinebretiere *et al.*, 2006). A ce jour, seules les souches de *B. cereus* NVH 391/98, NVH 883/00 et INRA AF2 ont été identifiées comme comportant CytK-1. Ces souches possèdent en plus de *cytK-1*, les gènes codant pour un nouveau variant de la toxine NHE. La séquence ADN de ce nouveau variant présente 80% d'identité avec le variant original NHE (Fagerlund *et al.*, 2007). Il n'existe pas de séquence similaire entre CytK et les autres entérotoxines de *B. cereus*.

L'hémolysine II (hlyII) est capable de perturber la perméabilité membranaire des cellules, conduisant à la libération du contenu et à une apoptose de la cellule chez l'homme et la souris. Elle est fortement impliquée dans la virulence des *B. cereus* contre les insectes (Andreeva *et al.*, 2007). Les gènes *hlyII* sont présents dans seulement 19% des souches de *B. cereus*. Cette toxine semble avoir un rôle différent de NHE, HBL et CytK car son expression est indépendante du régulateur pleiotropique (PlcR). Récemment, une étude réalisée sur 57 *B. cereus* incluant des souches associées à des maladies gastro-intestinales et non gastro-intestinales, a montré que le gène *hlyII* est uniquement présent chez les souches pathogènes. En plus, les gènes qui codent pour inhA1 et NprA, les deux métalloprotéases impliquées dans la pathogénicité de *B. cereus*, sont présents et fortement exprimés chez les souches pathogènes et absents chez les non pathogènes. L'observation de la corrélation entre ces trois facteurs a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'expression de ces gènes confère un avantage aux souches qui les portent, dans leur habilité à induire une infection (Cadot *et al.*, 2010).

I.3.2 Toxine émétique

I.3.2.1 Historique de la toxine émétique

En 1976, une souche de *B. cereus* isolée d'une toxi-infection alimentaire, induit des vomissements chez le singe rhésus (Melling *et al.*, 1976). Une autre souche isolée d'une toxi-infection alimentaire, provoque la diarrhée et pas de vomissement dans les mêmes conditions de culture. Les auteurs de ces travaux suggèrent

l'implication de deux toxines différentes dans ces infections: l'une serait responsable de l'intoxication émétique et l'autre de la toxoinfection diarrhéique. En 1979, Turnbull *et al.* montrent que la toxine émétique est très stable chimiquement et thermiquement et se distingue clairement en ce point, de la toxine diarrhéique et autres facteurs toxiques. Plusieurs années après, sa structure est décrite. Sa propriété ionophorique et son habilité à provoquer le gonflement des cellules Hep-2 sont rapportées (Agata *et al.*, 1994; 1995). Une étude détaillée de la toxine émétique, basée sur la formation d'un complexe avec l'ion potassium (K^+) est par ailleurs réalisée en 2003, par Pitchayawasin *et al.* Au cours des années 2003-2005, la méthode LC-MS est développée pour détecter et quantifier le céréulide. Aussi, les premiers outils moléculaires pour la détection des gènes responsables de la production du céréulide sont mis en évidence (Jääskeläinen *et al.*, 2003; Andersson *et al.*, 2004; Horwood *et al.*, 2004; Ehling-Schulz *et al.*, 2004b; 2005a). En 2005, Hoton *et al.* révèlent que ces gènes sont portés par un méga-plasmide de 270 kb, proche du plasmide pXO1 de *B. anthracis*.

I.3.2.2 Structure du céréulide : la toxine émétique

Le céréulide est un dodecadepsipeptide cyclique de 1.2 kDa (Fig. 3). Il consiste en trois répétitions de deux acides aminés et de deux hydroxyle acides (D-O-Leu, D-Ala, L-O-Val and L-Val)₃ (Agata *et al.* 1994; Isobe *et al.*, 1995). Cette toxine est thermiquement stable (121°C pendant 90 min) et résiste à une large gamme de pH (2-11), ainsi qu'aux enzymes protéolytiques (Kramer *et al.*, 1989; Rajkovic *et al.*,

2008). Elle peut par conséquent subsister dans l'aliment après un traitement thermique capable de détruire toute forme végétative de bactérie (Pirhonen *et al.*, 2005). Selon Rajkovic *et al.* (2008), aucun traitement thermique dans le domaine de l'industrie alimentaire ne peut détruire le céréulide. Grâce à sa stabilité, la toxine émétique peut atteindre l'intestin après son ingestion, sans être inactivée. Elle est produite en fin de phase exponentielle et pendant la phase stationnaire de croissance, ce qui suggère que l'induction de l'intoxication émétique requiert une quantité élevée de cellules bactériennes (Finlay *et al.*, 2000; 2002).

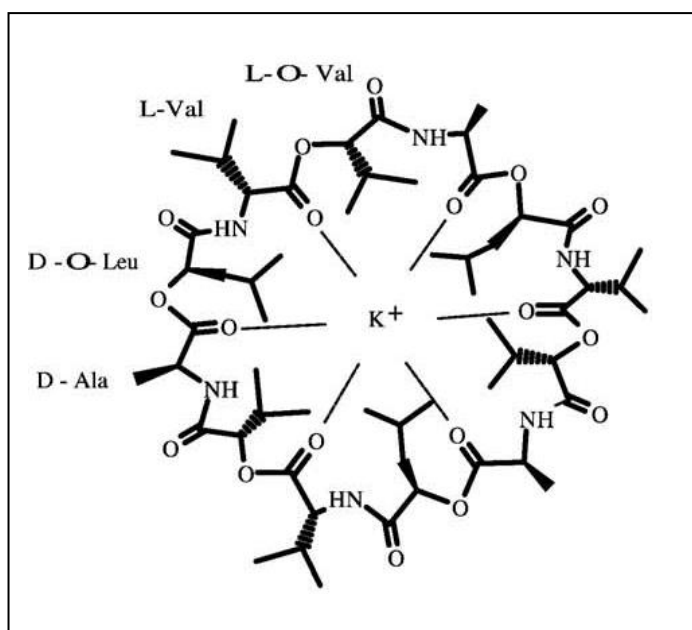


Fig. 3. Structure du céréulide en interaction avec l'ion potassium (Teplova *et al.*, 2006).

La structure et les propriétés du céréulide sont très proches de celles de la valinomycine, un ionophore du potassium, produite par

Streptomyces fulvissimus. Le céréulide est un ionophore du potassium, plus puissant que la valinomycine. En effet, son activité ionophorique est exprimée à de faibles concentrations en ion potassium (1-3 mM K⁺), comparée à la valinomycine (20-30 mM K⁺). Aussi, sa grande propriété lipophile améliore sa pénétration dans les cellules (Teplova *et al.*, 2006; Makarassen *et al.*, 2009).

Récemment, Kroten *et al.* (2010) ont réalisé une comparaison du céréulide et de la valinomycine. Selon ces auteurs, malgré les ressemblances biochimiques entre la toxine et l'antibiotique, leurs opérons (*ces* et *vlm*) présentent des différences significatives. Aussi, l'opéron *ces* est restreint à une lignée évolutive de souches émétiques de *B. cereus* alors que l'opéron *vlm* est largement distribué. La valinomycine est connue pour son activité antibiotique (anti-tumeur, antibactérien, antivirale) alors que le céréulide n'est présentement connu que pour les intoxications alimentaires qu'il provoque.

Il a été montré que les déterminants génétiques impliqués dans la production de la toxine émétique sont portés par un plasmide d'environ 200 Kb, nommé pCERE01 (Hoton *et al.*, 2005). Ce plasmide est apparenté au plasmide pXO1 qui porte les gènes de la toxine de *B. anthracis* (Rasko *et al.*, 2007).

Le céréulide est la substance la plus toxique parmi les toxines d'origine microbienne, stables à la chaleur. Grâce à sa stabilité thermique et chimique, cette toxine émétique peut facilement traverser l'estomac sans être inactivée. Une fois dans l'intestin, elle se lie au récepteur 5-HT₃ qui provoque une stimulation du nerf vague, conduisant ainsi aux vomissements chez la personne contaminée. Le céréulide est un ionophore du potassium. Il s'insère dans la membrane interne des mitochondries et agit comme un canal

permettant le passage du potassium de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale. Pour contrer cette entrée massive de potassium, des systèmes d'antiports s'activent et utilisent les protons contenus dans l'espace inter-membranaire. Cette perturbation du gradient transmembranaire de protons interfère avec la phosphorylation oxydative. Dans les cas mortels d'intoxications alimentaires causés par des souches émétiques, les victimes présentaient des nécroses au foie qui ont provoqué une insuffisance hépatique sévère (Dierick *et al.*, 2005). Il a été montré que le céréulide est capable de causer des dommages cellulaires sur des modèles d'animaux. La toxine provoque notamment la lyse des mitochondries des cellules Hep-2 et une perte de mobilité des spermatozoïdes (Agata *et al.*, 1995 ; Shinagawa *et al.*, 1995 ; Jääskeläinen *et al.*, 2003). D'autre part, il a également été rapporté que le céréulide inhibe l'action de certains lymphocytes et peut de ce fait avoir un effet sur le système immunologique (Paananen *et al.*, 2002).

Le mode d'action du céréulide comparé à celui de la valinomycine est présenté dans le Tableau 3.

Tableau 3. Comparaison des modes d'action du céréulide et de la valinomycine (modified from Kroten *et al.*, 2010)

Mode d'action	Valinomycine	Céréulide	Références
Détresse respiratoire	+	+	Granum and Lund, 1997
Douleurs abdominales, vomissement	nd	+	Granum and Lund, 1997 ; Dierick <i>et al.</i> , 2005
Perte de conscience, coma	nd	+	Dierick <i>et al.</i> , 2005
Acidose métabolique	nd	+	Dierick <i>et al.</i> , 2005 ; Mahler <i>et al.</i> , 1997
Mortalité	nd	+	Dierick <i>et al.</i> , 2005
Hémorragie pulmonaire, saignements	nd	+	Dierick <i>et al.</i> , 2005
Domage du système nerveux central et périphérique	+	nd	Briley <i>et al.</i> , 2001
Domages mitochondriaux, arrêt de la phosphorylation oxydative, réduction de la mobilité des spermatozoïdes	+	+	Jääskeläinen <i>et al.</i> 2003
Toxicité contre les cellules NK	+	+	Paananen <i>et al.</i> , 2002
Diminution de la production de cytokine	+	+	Paananen <i>et al.</i> , 2002
Augmentation de l'apoptose	+	+	Paananen <i>et al.</i> , 2000 ; 2005

nd : Non Déterminé

I.3.2.3 Diversité des souches émétiques

Il a longtemps été suggéré, sur base d'études phénotypiques et génotypiques, que les souches émétiques forment une classe spécifique de *B. cereus*, voire un clone (Agata *et al.*, 1996 ; Pirttijärvi *et al.*, 1999; Andersson *et al.*, 2004 ; Ehling-Schulz *et al.*, 2005b). Selon ces études, les souches émétiques se distinguent des autres souches de *B. cereus* s.s. par leur incapacité à hydrolyser l'amidon et à fermenter la salicine. Elles présentent une faible hémolyse sur milieu au sang de mouton, sont négatives à la décomposition de la tyrosine et possèdent un ribotype spécifique. De plus, leurs limites de croissance sont décalées vers des températures plus élevées, par rapport aux souches non-émétiques. Ainsi, les souches émétiques de *B. cereus* s.s. sont incapables de croître à moins de 10°C, alors qu'à 7°C, on observe déjà la croissance de 49% des souches non-émétiques. La majorité des souches émétiques est capable de se développer à 48°C, alors que seulement 39% des souches non-émétiques y parviennent (Carlin *et al.*, 2006).

Bien que la plupart des souches émétiques partagent les traits de caractères ci-dessus, certaines exceptions ont été mises en évidence ces dernières années. En 2006, Altayar *et al.* ont décrit une souche émétique psychrotolérante sans déterminer s'il s'agissait d'un *B. weihenstephanensis*. Peu de temps après, deux souches émétiques identifiées comme des *B. weihenstephanensis* ont été rapportées. Ces souches fermentent la salicine, hydrolysent l'amidon et possèdent les gènes *hblA* et *hblD* du complexe entérotoxique HBL. Elles sont capables de croître et produire le céréulide à 8°C. Elles possèdent

également des différenciations dans le gène d'une adénylate kinase (*adk*) et dans leur ribotype (Thorsen *et al.*, 2006 ; Vassileva *et al.*, 2007).

I.3.2.4 Méthode de détection et de quantification du céréulide

Les méthodes immunologiques sont très souvent utilisées dans les laboratoires d'analyse, pour la détection des toxines. Elles sont généralement rapides, faciles à réaliser et peu coûteuses. Cependant, la détection du céréulide par cette méthode semble impossible. En effet, le céréulide ne présente pas de propriétés antigéniques à cause de sa structure et de son petit poids moléculaire. Il n'existe de ce fait, pas de kit commercialement disponible, permettant une détection et/ou une quantification rapide du céréulide.

Les tests biologiques réalisés à l'origine pour distinguer les souches diarrhéiques des émétiques étaient basés sur l'alimentation du singe rhésus et la ligature de l'anse du lapin (Griffiths and Schraft, 2002). Cependant, la législation européenne en vigueur depuis le 1^{er} juin 2007 n'autorise plus l'usage d'animaux vivants pour des essais toxicologiques. Les tests *in vitro* sont par conséquent les seuls préconisés pour la détection de la toxine dans les aliments.

Selon certaines études, les essais biologiques basés sur la formation de vacuole dans les cellules HEp2 et sur le sperme de verrat sont couramment utilisés pour la détection du céréulide. La chromatographie liquide, associée à la spectrométrie de masse (LC-MS) qui est une méthode chimique, permet de quantifier le céréulide dans des suspensions de bactéries, des échantillons alimentaires et environnementaux (Haggbloom *et al.*, 2002; Jääskelainen *et al.* 2003). En

plus des essais biologiques et chimiques, la PCR conventionnelle et la PCR à temps réel, basées sur la détection du gène de la céréulide synthétase (*ces*) ont été développées ces dernières années (Ehling Schulz *et al.* 2004b; 2005a; Yabutani *et al.*, 2009). La méthode PCR est rapide et permet la détection de potentielles souches productrices du céréulide.

I.4 Régulation des facteurs de virulence chez *B. cereus*

I.4.1 Les régulateurs PlcR et NprR

Au sein du groupe *B. cereus*, l'expression de la plupart des facteurs de virulence est régulée par un système de quorum sensing comprenant un régulateur transcriptionnel pléiotropique PlcR (Phospholipase C Regulator) et un peptide de médiation PapR (Fig. 5) (Lereclus *et al.*, 1996; Rocha-Estrada *et al.*, 2010). Ce système contrôle l'expression de plus de 50 gènes codant pour des protéines extracellulaires. Les fonctions de ces protéines incluent l'approvisionnement en nutrition (toxines, phospholipases, protéases), la protection des cellules (bactériocines, toxines, transporteurs, consolidation de la paroi cellulaire) et les signaux d'intégration de l'environnement (capteurs sensoriels) (Gohar *et al.*, 2008). L'activation du PlcR dépend du PapR, un peptide de médiation formé de 48 acides aminés et encodé en aval du PlcR. PapR est sécrété, mûri dans le milieu extracellulaire, puis importé à l'intérieur de la bactérie via le système Opp (oligopeptide perméase) où il interagit avec le PlcR. Cette interaction spécifique permet la

fixation du PlcR à la séquence d'ADN cible (PlcR box) localisé en amont des gènes pour activer leur transcription (Agaisse *et al.*, 1999). L'expression du *plcR* est réprimée par la fixation du régulateur transcriptionnel Spo0A~P sur les deux boîtes Spo0A (responsable de la sporulation) qui encadrent le « PlcR box » (Lereclus *et al.*, 2000).

En 2000, Salamitou *et al.* ont mis en évidence l'existence d'un lien direct entre le régulon PlcR et la pathogénicité de *B. cereus* et *B. thuringiensis*. Selon ces auteurs, une perturbation du PlcR conduit à une réduction de la virulence de ces bactéries contre des larves d'insectes, la souris et le lapin.

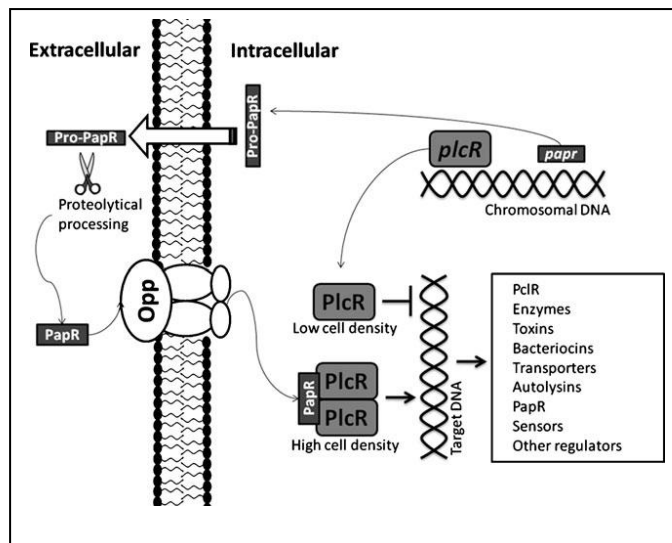


Fig. 5. Modèle de mécanisme du PlcR et du PapR. PapR est synthétisé puis exporté à l'extérieur de la cellule où il est sécrété et mûr. Il est réimporté à l'intérieur de la bactérie via le système Opp (oligopeptide perméase). A forte densité bactérienne, PapR se lie au PlcR et provoque un changement conformationnel de ce dernier. Ce qui favorise la fixation du PlcR à ses séquences d'ADN cibles et son activation (Rocha-Estrada *et al.*, 2010).

Chez *B. anthracis* cependant, le *PlcR* est muté. A ce jour, toutes les souches de *B. anthracis* dont le *PlcR* a été séquencé, ont montré une mutation non-sens toujours localisée au même endroit du génome, qui conduit à une production de PlcR tronqué (Salamitou *et al.*, 2000 ; Slamti *et al.*, 2004).

En comparant 29 souches appartenant au groupe de *B. cereus*, Slamti and Lereclus (2005) ont identifié quatre classes de paire « PlcR-PapR » et définies quatre formes de phérotypes chez le groupe de *B. cereus*. L'étude de ces phérotypes et l'analyse structurale du complexe PlcR-PapR ont montré que le PlcR appartient à la famille RNPP (Rap/NprR/PlcR/PrgX) (Declerck *et al.*, 2007), qui regroupe des protéines impliquées dans la communication cellulaire chez les Gram-positives. Ces protéines possèdent un domaine d'interaction protéine-protéine ou protéine-peptide et interagissent directement avec un peptide de signalisation sécrété. Le NprR, initialement décrit chez *B. subtilis* par Uehara *et al.* (1974) est un régulateur transcriptionnel de début de phase stationnaire, activé par le peptide de signalisation NprX. Le peptide NprX est sécrété, mûri sous la forme d'un heptapeptide et réimporté dans les bactéries. Le système de quorum sensing NprR/NprX permet la transcription de gènes codant pour des enzymes dégradatives (protéases, chitinases). Il pourrait jouer un rôle sur la sporulation (Perchat *et al.*, in preparation).

Récemment, une analyse des séquences en amont et en aval du gène *nprR* a été réalisée chez plusieurs espèces de *Bacillus* par Rocha-Estrada *et al.* (2010). Ces auteurs ont mis en évidence un gène qui code pour une bacillolysine chez les souches de *B. thuringiensis* et *B. cereus* ainsi qu'un gène similaire au *nprE* (gène de structure qui code

pour une métalloprotéase chez *B. subtilis*). La localisation de ces gènes en aval du *nprR* suggère qu'ils sont régulés par ce dernier, comme chez *B. subtilis* et *B. stearothermophilus*.

I.4.2 Régulation de l'expression du céréulide

I.4.2.1 Régulation génétique

La régulation de l'expression des entérotoxines de *B. cereus* a été largement étudiée par plusieurs auteurs. Ces études ont mis en évidence le rôle majeur du régulateur PlcR dans l'activation des gènes des entérotoxines, ainsi que d'autres facteurs de virulences (Agaisse *et al.*, 1999; Gohar *et al.*, 2008). La synthèse du céréulide, contrairement aux entérotoxines n'est pas contrôlée par le PlcR, mais par le Spo0A-AbrB (Lücking *et al.*, 2009). Spo0A est un régulateur transcriptionnel essentiel pour la sporulation. Il a un effet sur l'expression globale des gènes chez les espèces de *Bacillus*. Cependant, l'un des rôles cruciaux de Spo0A est la répression de la transcription du régulateur AbrB, qui contrôle des gènes de production d'antibiotiques, d'enzymes de dégradation, de mobilité, de formation de biofilms, de sporulation et de nombreuses autres activités métaboliques ou physiologiques, chez *B. subtilis*. Il agit en supprimant l'expression des gènes de la phase stationnaire, pendant la phase de croissance exponentielle. Selon Lücking *et al.* (2009), AbrB régule négativement la synthèse du céréulide.

I.4.2.2 Facteurs affectant la production du céréulide

Selon plusieurs études, la quantité de céréulide produite est fonction de la température d'incubation, du milieu de culture, ainsi que d'autres facteurs tels que le pH, l'aération et la présence d'acide aminés spécifiques (Ehling-Schulz *et al.*, 2004a). Finlay *et al.* (2000) avaient initialement rapporté que la température minimale de production du céréulide était de 12 °C. Il a également été rapporté qu'aucune toxine émétique n'a été détectée à 12 °C, dans du bouillon BHI inoculé par les souches émétiques F4810/72, NS115 et NS117 (Rajkovic *et al.*, 2006b). L'absence de production de la toxine émétique en dessous de 12 °C pourrait s'expliquer par la température limite de croissance des souches. En effet, certaines études avaient montré que la production de la toxine émétique est restreinte aux *B. cereus* émétiques mésophiles, dont la température limite de croissance est estimée entre 10 °C et 15 °C (Ehling-Schulz *et al.*, 2004b; 2005b). Récemment, Thorsen *et al.* (2006; 2009a) ont rapporté que certaines souches émétiques sont capables de se développer et produire le céréulide à basse température (8 °C). Après avoir analysé la production du céréulide par les souches émétiques mésophiles et psychrotrophes, Apetroaie *et al.* (2008) ont observé une production importante de la toxine entre 20 et 25 °C. La production du céréulide peut être influencée par la température de réfrigération précédant un abus de température. En effet, selon Thorsen *et al.* (2009b), la conservation d'un aliment pendant deux à trois semaines à 5 °C – 8 °C, peut réduire la quantité de céréulide produite dans cet aliment, à 25 °C.

L'importance de l'oxygène dans la production du céréulide a été mise en évidence par Jääskeläinen *et al.* (2004). Ces auteurs ont observé une forte accumulation de céréulide (2-7 µg/g) dans le riz, le haricot, ainsi que dans un milieu de laboratoire, inoculés par une souche émétique, quatre à cinq jours après incubation à température ambiante. En parallèle, dans les aliments ou milieux de cultures incubés sous atmosphère contrôlée (> 99,5% N₂), moins de 0,05 µg/g de céréulide ont été accumulés. Il a également été rapporté que la suppression de l'oxygène ou sa limitation en dessous de 1,6% peut empêcher la production du céréulide. Aussi, l'incubation sans agitation favorise la production du céréulide comparé à une incubation avec agitation (Rajkovic *et al.*, 2006b ; Shaheen *et al.*, 2006), mais l'influence de ce facteur reste encore controversée. Certains acides aminés, notamment la L-leucine, la L-valine et L-threonine influencent la production du céréulide. Jääskeläinen *et al.* (2004) ont observé qu'une addition de la L-leucine et la L-valine sous forme d'acide aminé libre, peut stimuler la production du céréulide 10 à 20 fois dans un milieu de laboratoire (R2A) ou dans de l'agar à l'eau de riz. En utilisant un milieu déficient en acides aminés pour l'analyse de la production du céréulide, Agata *et al.* (1999) ont montré que la L-leucine, la L-valine et la L-threonine sont non seulement essentielles pour le développement de *B. cereus*, mais également pour la production du céréulide.

La production du céréulide peut être influencée par la composition de l'aliment. Une quantification du céréulide dans plusieurs types d'aliments a montré que la toxine est produite en faible quantité dans les aliments tels que les œufs, la viande, le lait. Cependant, dans le riz cuit et les aliments farineux, d'importantes quantités de céréulide ont

été détectées, bien que le nombre de bactéries soit égal dans tous les aliments testés (Agata *et al.*, 2002). Rajkovic *et al.* (2006b) ont montré qu'un pH faible ainsi qu'une faible a_w peuvent contribuer à un faible taux de production du céréulide dans les aliments.

Tableau 4. Facteurs affectant la production du céréulide

Facteurs	Description	Références
Température	Température minimale de production du céréulide: 8°C Production importante de céréulide entre 20°C et 25°C	Thorsen <i>et al.</i> , 2006 Rajkovic <i>et al.</i> , 2006b Apetroaie <i>et al.</i> , 2008
Aération	L'effet de l'aération sur la production du céréulide reste controversé. Rajkovic <i>et al.</i> , 2006b ont montré une corrélation négative entre l'agitation pendant l'incubation et la production du céréulide. Cependant, certains résultats de la littérature suggèrent le contraire.	Jääskeläinen <i>et al.</i> , 2004 Rajkovic <i>et al.</i> , 2006b
pH, a _w	Un pH faible ainsi qu'une faible a _w peuvent empêcher la production du céréulide. Aucune toxine émétique n'a été détectée dans les aliments ayant un faible pH et a _w .	Rajkovic <i>et al.</i> , 2006b
Atmosphère	L'atmosphère contrôlée (> 99,5% N ₂), supprime à 90% la production du céréulide dans le haricot et presque totalement (≤ 0.05 µg g ⁻¹ dans le riz. L'exclusion ou la limitation de O ₂ à 1,6% peut empêcher la production du céréulide.	Jääskeläinen <i>et al.</i> , 2004
Acide aminés	Les acides aminés suivant : L-valine, L-leucine et L-thréonine semblent essentiels pour la production du céréulide	Jääskeläinen <i>et al.</i> , 2004 Agata <i>et al.</i> , 1999
Type d'aliments	Le céréulide est produit en faible quantité dans les aliments tels que les œufs, la viande, le lait. Il est produit en grande quantité dans les aliments tels que le riz cuit, la purée de pomme de terre.	Agata <i>et al.</i> , 2002 ; Rajkovic <i>et al.</i> , 2006b
Souche émétique	La production de céréulide varie d'une souche à l'autre	Rajkovic <i>et al.</i> , 2006b

Chapitre 2 : Objectifs de l'étude

B. cereus est reconnu comme un pathogène alimentaire capable de causer une toxi-infection diarrhéique, à travers la production d'entérotoxines et une intoxication émétique via la production de la toxine émétique, le céréulide. Le syndrome émétique est généralement associé aux aliments farineux tels que le riz, les pâtes, ainsi que les nouilles, bien que *B. cereus* soit généralement isolé à partir du sol, de l'environnement et de plusieurs types d'aliments. Afin de mieux cerner le comportement de ces souches émétiques, trois voies ont été explorées.

La première a consisté à investiguer plusieurs types d'aliments, en vue de l'isolement, l'identification et la caractérisation des *B. cereus* émétiques. Ces derniers ont par la suite été inclus dans une étude de distribution des souches émétiques, dans l'environnement et les produits alimentaires, pour évaluer leur occurrence, ainsi que leur diversité.

La deuxième voie a consisté en une étude détaillée de la diversité phénotypique d'une large collection de souches émétiques, provenant de diverses origines et appartenant au groupe de *B. cereus sensu lato*. Plus de 70 tests métaboliques ont été réalisés à cet effet. D'autres tests phénotypiques tels que l'activité lécithinase et l'hémolyse ont également été effectués.

Enfin, le comportement des souches émétiques vis-à-vis d'autres bactéries et en particulier de *B. cereus* a été étudié au cours de cette thèse. Le but de l'étude est d'investiguer un possible effet inhibiteur des souches émétiques vis-à-vis d'autres bactéries. Le riz a été choisi comme matrice alimentaire, non seulement à cause de son

implication dans plusieurs intoxications émétiques, mais également pour simuler la réalité des intoxications émétiques.

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Distribution et diversité des souches émétiques

Le groupe *B. cereus sensu lato* inclus diverses espèces pathogènes dont les pathotypes émétiques causant des intoxications alimentaires potentiellement mortelles. Plusieurs études montrent que le syndrome émétique est généralement associé à la consommation d'aliments farineux. Dès lors, la question qui se pose est de savoir pourquoi les autres aliments tels que les produits viandeux, halieutiques, végétaux ou laitiers ne sont pas souvent impliqués dans les intoxications émétiques. Pour tenter de répondre à cette question, plusieurs aliments, farineux ou pas, ont été investigués en Belgique et en Côte d'Ivoire, en vue de l'isolement et de la caractérisation des *B. cereus* émétiques (Tableau 5). Sur un total de 393 échantillons d'aliments investigués (toutes catégories confondues), 409 souches de *B. cereus* ont été isolées et six souches émétiques, productrices de céréulide ont été identifiées. Ces dernières ont été détectées par la « polymerase chain reaction ». Deux paires d'amorces ont été utilisées à cet effet. La première, EMIR/F cible les régions conservées du gène *NRPS* (*non-ribosomal peptides synthetase*), impliquées dans la synthèse de peptides indépendantes des ribosomes.

Tableau 5. Isolement de souches émétiques à partir de denrées alimentaires
prélevées en Belgique et en Côte d'Ivoire

	Produits alimentaires	Nombre d'échantillons investigués	Nombre de souches testées par PCR	Nombre de souches émétiques isolées (%)
BELGIQUE	Pâtes	27	36	0
	Riz cuit	18	24	0
	Farine de maïs	18	21	0
	Viande	26	7	0
	Pommes de terre	62	126	0
	Lait	10	9	1 (11,1)
	Epices	31	24	0
	Vegetaux	30	12	1 (8,3)
	Miel	51	30	1 (3,3)
	Total	273	289	3 (1,0)
COTE d'IVOIRE	Pâtes	30	50	1 (2,0)
	Riz cuit	30	15	0
	Farine de maïs	30	45	2 (4,4)
	Viande	30	10	0
	Total	120	120	3 (2,5)
Grand total		393	409	6 (1,5)

La deuxième, CesF1/R2 cible les déterminants génétiques directement impliqués dans la production du céréulide.

Il est important de noter que la moitié des souches émétiques détectées, provient d'aliments tels que le miel, qui ne sont généralement pas associés au syndrome émétique.

Les *B. cereus* isolées ont été inclus dans la présente étude de distribution, réalisée en collaboration avec F. Hoton. L'objectif était d'évaluer la répartition des souches émétiques au sein des membres du groupe *B. cereus*. Pour ce faire, un screening a été réalisé sur une collection de 2,000 souches de *B. cereus* provenant de diverses origines géographiques, en vue d'identifier les souches émétiques. Ces dernières ont ensuite été caractérisées phénotypiquement et génotypiquement dans le but de mettre en évidence leurs liens phylogénétiques ainsi que leurs différences.

Cette étude, qui est une première à être réalisée sur une aussi large collection de *B. cereus*, a mis en évidence des résultats très surprenants. Elle a d'abord confirmé la rareté des souches émétiques dans l'environnement, puis a souligné leur absence au sein d'un nombre important de *B. thuringiensis*, *B. mycoides* ou *B. pseudomycoides* formellement identifiés. Des *B. weihenstephanensis* productrices de céréulide ont cependant été caractérisés. Les investigations phénotypiques et génotypiques ont mis en évidence, deux clusters distincts (I et II) au sein des souches émétiques, montrant ainsi qu'elles sont plus diverses que ce qui était généralement admis dans la littérature.

¹Ce manuscrit a été publié dans la revue « *Environmental Microbiology Reports* »

¹ **Hoton FM, Fornelos N, N'Guessan E, Hu X, Swiecicka I, Dierick K, et al.,** 2009. Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* cereulide-producing strains. *Env. Microbiol. Rep*, **1**: 177-183.

Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* cereulide-producing strains

Hoton Florence M.¹, Fornelos Nadine¹, N'Guessan Elise¹, Hu Xiaomin¹, Swiecicka Izabela², Dierick Katelijne³, Jääskeläinen Elina⁴, Salkinoja-Salonen Mirja⁴, and Mahillon Jacques^{1*}

¹Laboratory of Food and Environmental Microbiology, Université catholique de Louvain, Croix du Sud, 2/12, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

²Department of Microbiology, University of Bialystok, 20B Swerkowa Street, 15-950 Bialystok, Poland.

³Institute of Public Health, Food section, 14 Rue Juliette Wijtsman, B-1050 Brussels, Belgium.

⁴Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, P.O. Box 56, Viikinkaari 9, 00014 Helsinki, Finland.

Keywords: *Bacillus cereus*, *Bacillus weihenstephanensis*, cereulide, emetic strain, plasmid, genotyping.

Running title: *B. cereus* cereulide-producing strains.

*Corresponding author

Phone: +32-10-473370

Fax: +32-10-473440

Email: jacques.mahillon@uclouvain.be

SUMMARY

Two thousand *Bacillus cereus sensu lato* isolates from food and environmental matrices were screened by PCR for the presence of cereulide-producing strains. This survey identified 73 potential emetic strains, most of which originated from non-random food and clinical samplings. None of the 460 *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides* and *Bacillus pseudomycoides* strains were PCR-positive for the cereulide genetic determinants. The chromosomal and extrachromosomal gene pool diversity of a subset of 30 cereulide-producing strains was then assessed using multilocus sequence typing, large plasmid gel electrophoresis and Southern blot hybridization. The strain toxicity on boar sperm and cereulide production were also analysed. The most striking observation was the identification of two distinct clusters of cereulide-producing strains, with members of the second group (cluster II) identified as psychrotolerant *B. weihenstephanensis* able to grow at 8 °C. Moreover, the location of the cereulide genetic determinants was shown to vary depending on the strain, indicating a probable genomic mobility.

INTRODUCTION

The *Bacillus cereus* group consists of *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* and *B. pseudomycoides*. Several studies have suggested that *B. cereus* s.s., *B. anthracis* and *B. thuringiensis* should be considered as members of a single species designated as *B. cereus sensu lato* (Daffonchio *et al.*, 2000; Helgason *et al.*, 2000a,b). However, these closely related bacteria have traditionally been classified as different species based on their distinct virulence characteristics that are largely defined by plasmid-encoded features. *Bacillus cereus sensu stricto* is a common cause of bacterial food-borne diseases (Granum and Lund, 1997). In the case of *B. anthracis*, the causative agent of anthrax, the virulence toxins and the poly-D-glutamate capsule are encoded by two plasmids named pXO1 and pXO2 respectively. By contrast, *B. thuringiensis* is an insect pathogen able to produce plasmid-encoded toxins in the form of parasporal crystal proteins. So far, there is no consensus as to whether these bacteria should be considered as separate species or specialized pathotypes of a single taxon (Vilas-Boas *et al.*, 2007).

Two distinct clinical types of food toxi-infection associated with *B. cereus* are generally distinguished: diarrhea and emesis. The emetic type is associated with a single heat-stable toxin, the cereulide (Agata *et al.*, 1995), which represents the most serious food safety risk linked to *B. cereus*. Indeed, severe cases have been reported after the ingestion of food contaminated with high amounts of cereulide (Mahler *et al.*, 1997; Dierick *et al.*, 2005; Posfay-Barbe *et al.*, 2008). It has also been demonstrated that the emetic toxin gene cluster, containing two nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes,

resides on a 270 kb plasmid (Hoton *et al.*, 2005) displaying similarity to pXO1 from *B. anthracis* (Ehling-Schulz *et al.*, 2006; Rasko *et al.*, 2007).

Several studies have shown that the cereulide-producing strains form a homogeneous group (Agata *et al.*, 1996; Ehling-Schulz *et al.*, 2005a) and Priest and colleagues (2004) have assigned all these strains to a single sequence type, ST26. Recently, however, differences in ribopatterns and in the *adk* gene have been noticed (Apetroaie *et al.*, 2005), and new sequence types have been reported (Vassileva *et al.*, 2007), indicating more variations than originally thought. In this context, a significant number of *B. cereus s.l.* strains were screened to assess the prevalence and genotypic diversity of potential cereulide-producing isolates. The strains originated from random and non-random samplings and were isolated from environmental and food matrices, or from food toxi-infection cases.

RESULTS

Cereulide-producing strains are rare in the environment and include atypical strains identified as *B. weihenstephanensis*. In order to investigate the distribution and diversity of potential emetic *B. cereus* strains, a large collection of 2000 *B. cereus* s.l. strains was screened by PCR using two distinct primer pairs (Em1F/R and CesF1/R2) targeting conserved sequence motifs of the *cesB* NRPS gene (Ehling-Schulz *et al.*, 2004; 2005b). This collection (Table 1) consisted in more than 1500 *B. cereus*, 204 *B. thuringiensis*, 256 *B. mycoides*/*B. pseudomycoides* and six *B. weihenstephanensis*. The origins of the strains studied were diverse, including isolates from soil, water, arthropods, mammals, foodstuffs and clinical samples. The total number of positive strains for the cereulide PCR reached 73/2000 (3.6%), but if one excludes the food or clinical samples isolated non-randomly, their number was 28/1863, which represented 1.5% of the strains tested. The positive samples randomly found in food (8/585 or 1.4%) were isolated from pasta, honey, raw milk, rice but also from parsley, red blackcurrant or wheat flour. Interestingly, none of the 204 *B. thuringiensis* and 256 *B. mycoides* / *B. pseudomycoides* strains were found positive.

Intriguingly, three strains appeared negative for the second primer pair CesF1/R2. Therefore, a subset of 28 representative strains containing the three atypical strains (BtB2-4, CER057 and CER074) was selected for further analyses. Two other atypical emetic strains (MC67 and MC118) previously identified as *B. weihenstephanensis* (Thorsen *et al.*, 2006) were also added to our subset. Interestingly, these two soil-borne strains were also negative for the CesF1/R2 PCR

(Table 2). The toxin production of these 30 strains was tested using the boar sperm bioassay (Andersson *et al.*, 2004), which gave positive reactions for all, including the five 'atypical' strains. The cereulide production was also quantified by liquid chromatography mass spectrometry analysis (Andersson *et al.*, 2004). The amounts varied between 40 and 1800 ng mg⁻¹ cells (wet weight) in the different strains tested, with the F4810/72 reference strain producing 350 ng mg⁻¹.

In agreement with previous work (Carlin *et al.*, 2006), all the cereulide-producing strains were able to grow at high temperature (48°C), with the notable exception of BtB2-4, CER057 and CER074. Moreover, unlike the other strains, the three isolates were able to grow at temperature as low as 8°C, a feature they shared with strains MC67 and MC118. In addition, PCR amplification of the cold shock protein gene *cspA*, which allows the specific detection of psychrotrophic *B. weihenstephanensis* strains (Francis *et al.*, 1998), tested positive for the three strains (data not shown). Altogether, these observations lead us to identify strains BtB2-4, CER057 and CER074 as cereulide-producing *B. weihenstephanensis*.

Table 1. Origin and distribution of the *B. cereus* group strains screened for the presence of cereulide genetic determinants.

Species (Number)	Origin	Number of strains tested	Number of putative cereulide-producing strains
<i>B. cereus</i> (1,534)	Soil - Environment	543	1
	Arthropods (Insects & Isopods)	58	0
	Mammals	109	18
	Commercial wastewater powders	57	0
	Undetermined	54	1
	Food (random)	582	8
	Food (non random)	95	30
	Clinical (non random)	36	15
<i>B. thuringiensis</i> (204)	Soil - Environment	106	0
	Arthropods (Insects & Isopods)	48	0
	Food (random)	3	0
	Undetermined	47	0
<i>B. mycoides</i> - <i>B.</i> <i>pseudomycoides</i> (256)	Soil - Environment	242	0
	Arthropods (Insects & Isopods)	9	0
	Undetermined	5	0
<i>B. weihenstephanensis</i> (6) ^a	Food (non random)	6	0
TOTAL	Random	1,863	28 (1.5 %)
	Non random	137	45 (33 %)
	GRAND TOTAL	2,000	73 (3.65 %)

^a Note that three cereulide-producing *B. cereus* s.l. isolates turned out to be *B. weihenstephanensis* (Table 2). Among the cereulide-positive isolates, a selection of 28 was established for which the detailed origin is given in Table 2. Information on the other 1972 strains can be obtained upon request. Two previously identified cereulide-producing *B. weihenstephanensis* (MC67 and MC118, Thorsen *et al.*, 2006) were also included.

Table 2. Detailed characterization of the subset of 30 representative emetic strains of *B. cereus* and *B. weihenstephanensis*.

# ^a	Strains	Origin	CesF1/CesR2 PCR ^b	Boar sperm bioassay ^c	LC-MS (ng/mg cells wet wt) ^d	Growth at 48° C	Growth at 8° C	pXO1-like <i>repX</i> ^e	pXO2-like <i>repA</i> ^e	Hybridizing emetic plasmid / (estimated size in kb)
I.1	5958b	Pasta salad	+	+	1800	+	-	+	-	270
I.2	5964a	Pasta	+	+	ND	+	-	+	-	270
I.3	5965c	Pasta salad	+	+	ND	+	-	+	-	270
I.4	5969c	Rinsing water	+	+	ND	+	-	+	-	270
I.5	5971a	Chocolate milk	+	+	ND	+	-	+	-	270
I.6	5972b	Semi-skimmed milk	+	+	ND	+	-	+	-	270
I.7	5975c	Vomit	+	+	ND	+	-	+	-	270
I.8	F4810/72	Emetic reference strain	+	+	350	+	-	+	-	270
I.9	AND1284	Pasta	+	+	100	+	-	+	-	240
I.10	AND1407	Blackcurrant	+	+	ND	+	-	+	-	240
I.11	FP211	Water	+	+	ND	+	-	+	-	270
I.12	IS021	Mammal	+	+	ND	+	-	+	+	290
I.13	IS075	Mammal	+	+	ND	+	-	+	+	270
I.14	IS053	Mammal	+	+	ND	+	-	+	+	270
I.15	IS195	Mammal	+	+	40	+	-	+	+	290
I.16	IS122	Mammal	+	+	ND	+	-	+	+	290
I.17	ISP1930	Rice	+	+	500	+	-	+	-	270
I.18	1185	Pasta	+	+	ND	+	-	+	-	270
I.19	1385	Feaces	+	+	ND	+	-	+	-	270
I.20	2023	“Choux à la crème”	+	+	ND	+	-	+	-	270
I.21	2093	Nasi Goreng	+	+	ND	+	-	+	-	270
I.22	2094	Chop Choy	+	+	ND	+	-	+	-	270
I.23	AFRH5	Food	+	+	ND	+	-	+	-	270
I.24	AFRH6	Food	+	+	ND	+	-	+	-	270
I.25	CER072	Honey	+	+	60	+	-	+	-	ND
II.1	MC67	Soil	-	+	ND	-	+	-	-	320
II.2	MC118	Soil	-	+	600	-	+	-	-	300
II.3	BtB2-4	Forest soil	-	+	400	-	+	-	-	None/C
II.4	CER057	Parsley	-	+	360	-	+	-	-	None/C
II.5	CER074	Raw milk	-	+	ND	-	+	-	-	None/C

^aLatin numbering refer to clusters I and II (see Fig. 1 and text for details); ^bPrimers CesF1/R2 designed from the sequence of the cereulide synthetase (*cesB*) gene cluster; ^c Sperm toxicity was observed as inhibition of sperm motility; ^d Strains were grown on TSA at room temperature for 4 days before extracting the cereulide; ^ePCR amplification of genes involved in the pXO1 and pXO2 plasmid replication (*repX* and *repA*, respectively). ^fPlasmid profiles were hybridized using the Em1F/R PCR product as probe. + and - indicate a positive or negative reaction to the test performed; ND, not determined.

Cereulide genetic determinants display various genomic locations. The extrachromosomal pool diversity of the cereulide-producing strains was assessed by analysing their plasmid content. Most strains harboured several large plasmids with sizes ranging from 50 to 350 kb. Although several strains displayed similar profiles, the plasmid size and number appeared variable, suggesting some heterogeneity of the cereulide extragenomic determinants (data not shown). The presence of pXO1-like and/or pXO2-like plasmids was then screened for by PCR, using the replication genes *repX* and *repA* as targets (Table 2). All the strains but five turned out to be positive for the pXO1-like plasmid, confirming that the cereulide genetic determinants are located on a large element resembling pXO1. Interestingly, the *repX*-negative strains were those identified as *B. weihenstephanensis*. Concerning *repA*, the pXO2 replication genes, it was only detected in the strains isolated from small mammals in Poland.

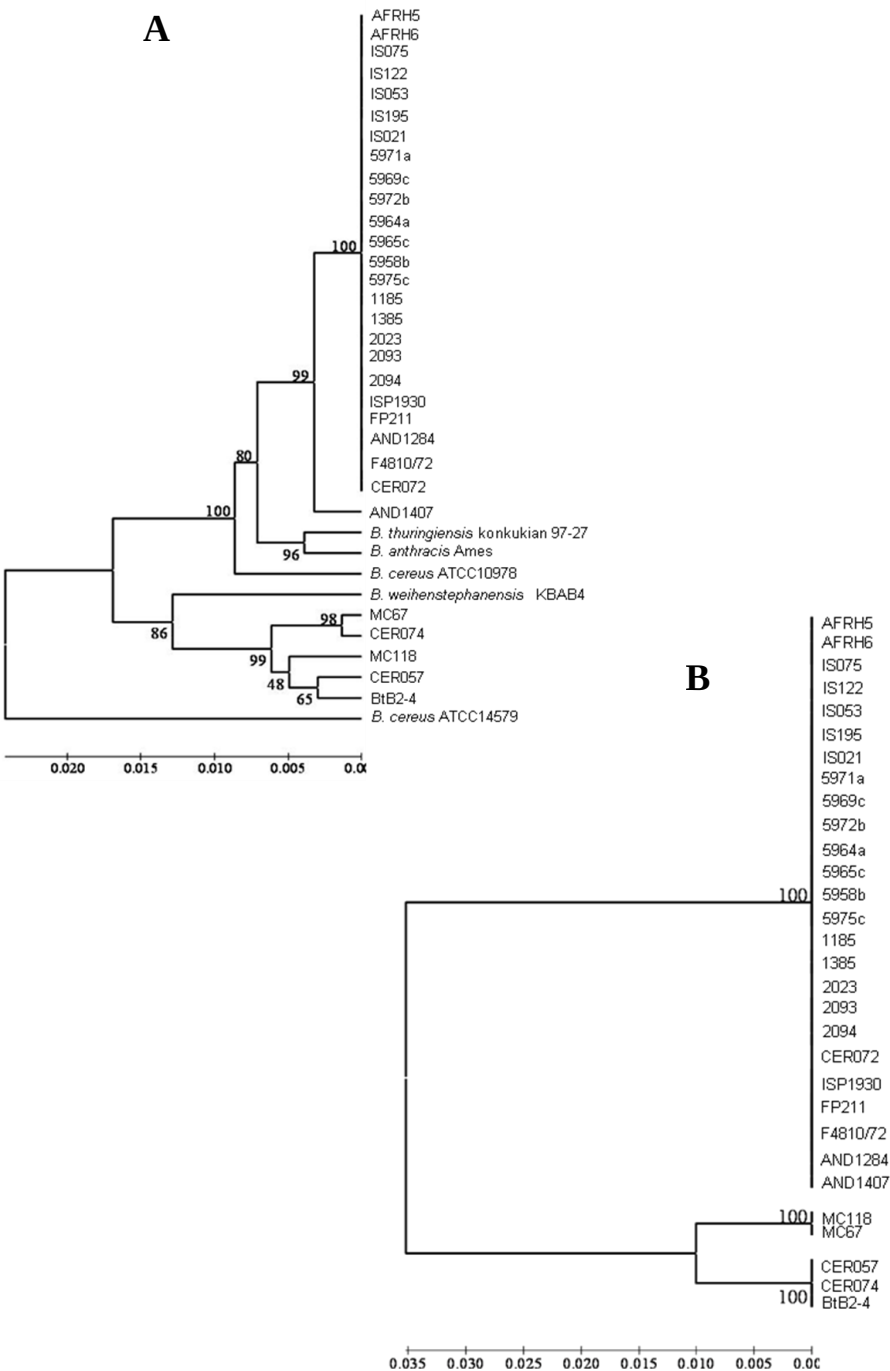
The location of the cereulide genetic determinants was further investigated by Southern hybridization. For the majority of the strains, the 'cereulide'-probe matched large plasmids of about 270 kb. A closer examination revealed however that the size of the hybridizing plasmids varied from ~240 to 320 kb (Table 2). For instance, strains AND1284 and AND1407 harboured a smaller plasmid of 240 kb while the hybridizing bands detected in the mammal strains IS021, IS195 and IS122 were slightly larger (~290 kb). Much more surprising were the MC67 and MC118 strains where hybridization was observed on large plasmids (estimated sizes of 300 and 320 kb) unrelated to pXO1 or pXO2, at least to their replication genes (Table 2). This new element(s) was referred to as pXO3.

Another striking observation was the peculiar pattern of strains CER057, CER074 and BtB2-4 for which the hybridization signal was limited to the DNA in the wells, which strongly suggested a chromosomal location (or on a very large plasmid) for their cereulide genetic determinants.

Multilocus sequence typing analysis revealed two main clusters among cereulide producing isolates.

In order to get more insights into the genomic diversity of the 30 cereulide-producing strains, a multilocus sequence typing (MLST) scheme based on chromosomal genes was performed (Table S1). The MLST dendrogram, obtained from the comparison of the five concatenated chromosomal gene sequences, identified two main clusters in the 30-strain subset (Fig. 1A). The first monomorphic cluster contained 25/30 strains, with only one strain (AND1407) displaying some differences. Based on comparison with other *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* and *B. weihenstephanensis* reference strains, this cluster matched Clade I defined by Priest and colleagues (2004), Cluster III of Helgason and colleagues (2004) and Cluster C according to Sorokin and colleagues (2006). The five remaining isolates formed a second cluster in which all the strains could be discriminated from each other. Quite interestingly, this cluster II grouped with strain KBAB4 of *B. weihenstephanensis*, an isolate belonging to cluster W of Sorokin and colleagues (2006), and presumably to Clade III defined by Priest and colleagues (2004). This extends the spectrum of pathogenic strains recently reported by Hoffmaster and colleagues (2008), which showed that the clinical isolates are phylogenetically restricted the 'Cereus' lineages of Clade I.

In parallel, the *cesB* gene amplified with primers Em1F/R and the *repX* gene of pXO1-like plasmids were also sequenced and compared. The dendrogram obtained from the *cesB* sequences confirmed the presence of two distinct clusters, with the five *B. weihenstephanensis* strains composing cluster II (Fig. 1B). Concerning the *repX* MLST, only strains of cluster I could be analysed because those of cluster II were negative for *repX*-PCR (Table 2). As shown in Fig. 1C, three plasmid groups could be differentiated based on their replicons. The majority of the plasmid replicons, including pCER270, from the emetic reference strain *B. cereus* F4810/72, shared higher similarity with those of pBc10987 (from *B. cereus* ATCC10987) or pPER272 (isolated from a strain responsible for periodontal disease) (Rasko *et al.*, 2007) than to the replicons of pBCXO1 (Hoffmaster *et al.*, 2004) and pXO1 associated to anthrax(-like) pathogenesis. The plasmids belonging to this first replicon group displayed the same estimated size of 270 kb (Table 2), except for strain AND1284. In the second (AND1407) and third replicon groups (comprising all the mammal strains) however, more variations in plasmid sizes were observed, ranging from 240 to 290 kb, which indicated extrachromosomal plasticity inside these two subgroups.



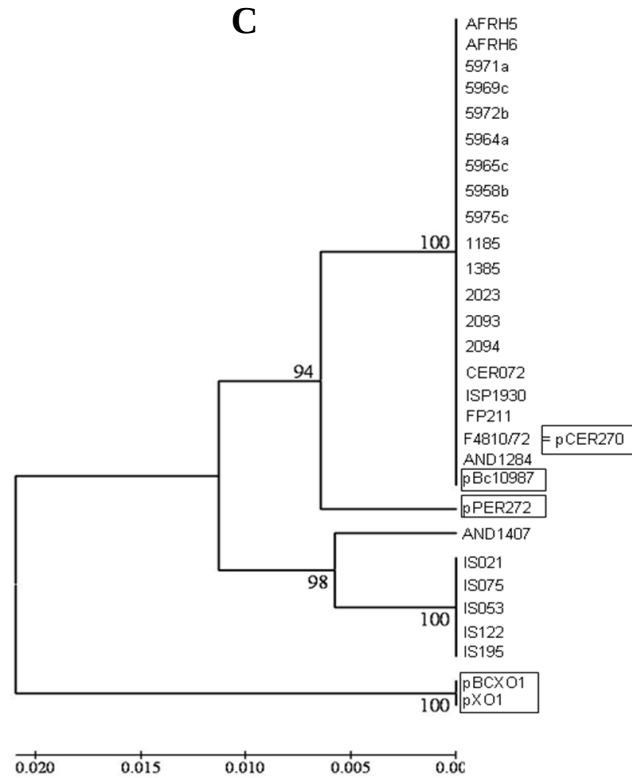


Fig. 1. MLST dendrograms of chromosomal and extrachromosomal genes from *B. cereus* group. The names of the strains are mentioned on the right side of the figure and the bootstrap values are indicated on the branches. The dendrograms were generated with the UPGMA method using the Tajima-Nei genetic distance model and the default parameter set by the DS Gene package 1.5. **A.** Dendrogram obtained with DNA comparison of the concatenated sequences of five chromosomal genes *adk* (Apetroaie *et al.*, 2005), *glpF*, *gmk*, *ilvD* and *tpi* (Priest *et al.*, 2004). **B.** Dendrogram obtained from the DNA sequence comparison of the *cesB* gene located in the cereulide synthetase operon and amplified with the primer pair Em1F/R. **C.** Dendrogram obtained from the DNA sequence comparison of the replication gene *repX* from pXO1-like plasmids. Reference plasmids are displayed in rectangles.

CONCLUDING REMARKS

The present study performed on 2000 *B. cereus s.l.* strains of diverse origins not only confirmed previous studies showing that cereulide-producing isolates are rare in the environment (Ehling-Schulz *et al.*, 2005a; Altayar and Sutherland, 2006) but also emphasized the absence of putative emetic strains among more than 450 well-identified *B. thuringiensis*, *B. mycoides* and *B. pseudomycoides*.

The most striking genomic observation was certainly the identification of new locations for the cereulide-related operon. Contrary to cluster I where all the 'cereulide' plasmids share a pXO1-like replicon, isolates from cluster II have their cereulide genetic determinants located either on plasmid(s) unrelated to the pXO1-replicon, or on the chromosome (or very large plasmid). These results strongly suggest that the cereulide-related operon is associated with some mobile genetic element(s), and/or that it has undergone several genomic transfers.

Although none of the 'emetic' *B. weihenstephanensis* isolates originated from food intoxication cases, their mere identification should send strong warning signal in terms of food safety concerns. It can indeed be anticipated that these or related psychrotolerant strains could proliferate and produce the potentially lethal cereulide toxin under inappropriate temperature conditions, typically at the level of food consumers. Along the same vein, the negative *cesB* PCR amplification observed in the detection of cereulide-producing *B. weihenstephanensis* should be taken into account seriously because these primers have been recommended for the detection of emetic *B. cereus* strains (Fricker *et al.*, 2007). This also reemphasizes the

potential limitation of PCR approaches and confirms the necessity to use alternative assays. Finally, it should also be kept in mind that the cereulide production is a complex phenomenon and not is only strain-dependent, but also varies according to the medium and growth temperature used (Apetroaie- Constantin *et al.*, 2008).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank A. Wilcks (Danish Institute for Food and Veterinary Research, Soeborg), M.-P. Schrouff (Agrolab, Belgium), A. Cherif (University of Tunis), B.M. Hansen (National Environmental Research Institute, Roskilde), R. Van Houdt, N. Leys and M. Mergeay (SCK, Belgium) and V. Duprez for kindly providing some strains used in this study. We would also like to express our gratitude to A. Windey (Pig breeding farm, Pécrot, Belgium) who provided the boar spermatozoa. Finally, we are also grateful to R. Mikkola and D. Hoornstra who performed the LC-MS analysis. This work was supported by research grants from Photobiomics (# AF 118637) to E.J. and M.S.-S., from FRIA to F.H. and N.F., from the National Fund for Scientific Research (FNRS) to J.M., and by the Université catholique de Louvain (UCL).

REFERENCES

Agata, N., Ohba, M., Mori, M., and Isobe, M. (1995) A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* **129**: 17-20.

- Agata, N., Ohba, M., and Mori, M. (1996)** Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. *Curr Microbiol* **33**: 67–69.
- Altayar, M., and Sutherland, A.D. (2006)** *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. *J Appl Microbiol* **100**: 7–14.
- Andersson, M.A., Jääskeläinen, E.L., Shaheen, R., Pirhonen, T., Wijnands, L.M., and Salkinoja-Salonen, M.S. (2004)** Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. *Int J Food Microbiol* **94**: 175–183.
- Andrup, L., Barfod, K.K., Jensen, G.B., and Smidt, L. (2008)** Detection of large plasmids from the *Bacillus cereus* group. *Plasmid* **59**: 139–143.
- Apetroaie, C., Andersson, M.A., Sproer, C., Tsitko, I., Shaheen, R., Jääskeläinen, E.L., et al. (2005)** Cereulideproducing strains of *Bacillus cereus* show diversity. *Arch Microbiol* **184**: 141–151.
- Apetroaie-Constantin, C., Shaheen, R., Andrup, L., Smidt, L., Rita, H., and Salkinoja-Salonen, M. (2008)** Environment driven cereulide production by emetic strains of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol* **127**: 60–67.
- Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., Salkinoja-Salonen, M.S., et al. (2006)** Emetic toxinproducing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *Int J Food Microbiol* **109**: 132–138.
- Daffonchio, D., Cherif, A., and Borin, S. (2000)** Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships

in the '*Bacillus cereus* group'. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5460–5468.

Dierick, K., Van Coillie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., et al. (2005) Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J Clin Microbiol* **43**: 4277–4279.

Ehling-Schulz, M., Fricker, M., and Scherer, S. (2004) Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiol Lett* **232**: 189–195.

Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretière, M.H., Lindback, T., Andersson, M., Schulz, A., et al. (2005a) Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology* **151**: 183–197.

Ehling-Schulz, M., Vukov, N., Schulz, A., Shaheen, R., Andersson, M., Martlbauer, E., and Scherer, S. (2005b) Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 105–113.

Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Grallert, H., Rieck, P., Wagner, M., and Scherer, S. (2006) Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiol* **6**: 20.

Francis, K.P., Mayr, R., von Stetten, F., Stewart, G.S., and Scherer, S. (1998) Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3525–3529.

- Fricker, M., Messelhauser, U., Busch, U., Scherer, S., and Ehling-Schulz, M. (2007) Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Appl Environ Microbiol* **73**: 1892–1898.
- Granum, P.E., and Lund, T. (1997) *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett* **157**: 223–228.
- Helgason, E., Caugant, D.A., Olsen, I., and 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**: 1615–1622.
- Helgason, E., Økstad, O.A., Caugant, D.A., Johansen, H.A., Fouet, A., Mock, M., et al. (2000b) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2627–2630.
- Helgason, E., Tourasse, N.J., Meisal, R., Caugant, D.A., and Kolstø, A.B. (2004) Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol* **70**: 191–201.
- Hoffmaster, A.R., Ravel, J., Rasko, D.A., Chapman, G.D., Chute, M.D., Marston, C.K., et al. (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.
- Hoffmaster, A.R., Novak, R.T., Marston, C.K., Gee, J.E., Helsel, L., Pruckler, J.M., and Wilkins, P.P. (2008) Genetic diversity of clinical isolates of *Bacillus cereus* using Multilocus Sequence Typing. *BMC Microbiol* **8**: 191.
- Hoton, F.M., Andrup, L., Swiecicka, I., and Mahillon, J. (2005) The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiology* **151**: 2121–2124.

- Mahler, H., Pasi, A., Kramer, J.M., Schulte, P., Scoging, A.C., Bar, W., and Krahenbuhl, S. (1997)** Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *N Engl J Med* **336**: 1142–1148.
- Posfay-Barbe, K.M., Schrenzel, J., Frey, J., Studer, R., Korff, C., Belli, D.C., et al. (2008)** Food poisoning as a cause of acute liver failure. *Pediatr Infect Dis J* **27**: 846–847.
- Priest, F.G., Barker, M., Baillie, L.W., Holmes, E.C., and Maiden, M.C. (2004)** Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol* **186**: 7959–7970.
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Økstad, O.A., Fouts, D.E., Jiang, L., Cer, R.Z., et al. (2007)** Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *J Bacteriol* **189**: 52–64.
- Sorokin, A., Candelon, B., Guilloux, K., Galleron, N., Wackerow-Kouzova, N., Ehrlich, S.D., et al. (2006)** Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1569–1578.
- Teplova, V.V., Mikkola, R., Tonshin, A.A., Saris, N.-E., and Salkinoja-Salonen, M. (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**: 39–46.

- Thorsen, L., Hansen, B.M., Nielsen, K.F., Hendriksen, N.B., Phipps, R.K., and Budde, B.B. (2006)** Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5118–5121.
- Vassileva, M., Torii, K., Oshimoto, M., Okamoto, A., Agata, N., Yamada, K., et al. (2007)** A new phylogenetic cluster of cereulide-producing *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol* **45**: 1274–1277.
- Vilas-Boas, G.T., Peruca, A.P., and Arantes, O.M. (2007)** Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol* **53**: 673–687.

3. 2 Diversité phénotypique des souches de *B. cereus* émétiques

Les souches émétiques de *B. cereus* appartiennent à deux clusters phylogénétiquement distincts. Le cluster I inclut des bactéries mésophiles, capables de se développer à 48 °C tandis que le cluster II englobe des souches psychrotolérantes, capables de se développer à 8 °C. Bien que la prévalence de ces souches dans l'environnement soit faible, leur impact en matière de santé publique est croissant. Dans cette étude, une trentaine de souches émétiques d'origines diverses, incluant des *B. cereus* et *B. weihenstephanensis*, ont été collectées pour une étude détaillée de leur caractères phénotypiques. L'objectif était de mieux connaître les *B. cereus* émétiques, afin de contribuer à un développement futur de méthodes pratiques permettant de les détecter facilement et de réduire efficacement les intoxications alimentaires liées à ces souches. Pour ce faire, deux types de galeries API ont été utilisés pour tester les capacités métaboliques des souches émétiques. Les milieux au sang de mouton et MYP, préconisés par la norme ISO 7932 relative aux *B. cereus*, pour l'isolement et le dénombrement de *B. cereus*, ont permis de tester les activités lécithinases et hémolytiques des souches.

Les résultats obtenus mettent en évidence des différences surprenantes de comportement entre les souches, dans l'utilisation des substrats. Ils montrent aussi que certaines souches ne présentent pas les caractéristiques requises pour être considérées comme des *B. cereus*. En effet, elles sont négatives pour les tests

d'hémolyse et de lécithinase, exigés par la norme ISO. Ce qui est troublant car les analyses de routine basées sur cette norme pourraient conduire à des erreurs d'identification des souches émétiques et, par conséquent, à une sous-estimation des intoxications alimentaires causées par ces dernières.

Ce manuscrit sera soumis à « Food Microbiology »

Phenotypic diversity of emetic *Bacillus cereus sensu lato* strains

Elise N'Guessan, Valentine Dincq, Florence Hoton and Jacques Mahillon*

Running title: Emetic *B. cereus s.l.* phenotypes

Keywords: *Bacillus cereus sensu lato*, emetic strains, cereulide, phenotype, cluster

Laboratory of Food and Environmental Microbiology, Université catholique de Louvain, Croix du Sud 2/12, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

*Corresponding author: Email: jacques.mahillon@uclouvain.be

SUMMARY

Different samples including the content of mammal intestine were investigated for emetic strains isolation. Twenty-three emetic strains were identified among 56 *B. cereus* strains isolated (eight emetic strains from a same pheasant and fifteen from the same boar). The high prevalence of emetic strains in these mammals intestine is very striking and interesting. One assumption is that emetic strains from the pheasant intestinal or from the boar intestinal are clonal. Two of the 23 emetic strains isolated (one from the pheasant, another from the boar) and one other isolated in the MISSEX project were added to a representative collection of 30 cereulide-producing isolates of *B. cereus* and *B. weihenstephanensis* from a previous study, in order to investigate the phenotypical diversity of cereulide-producing strains. The results confirmed the existence of two distinct clusters (cluster I and II) within the cereulide-producing strains. Moreover, discrimination within the cluster II was noted. Among the most striking observations, the identification of an atypical emetic strain cluster I, which was negative for lecithinase and haemolysis activity, was noted. Sequence analysis of the *plcR* gene and alignment with other copies of functional *plcR* showed a mutation, which could be responsible for this atypical phenotype. Since key diagnostic features of *B. cereus* strains are based on their ability to provoke haemolysis and to hydrolyze lecithin, important misidentifications in emetic strains detection can occur during the routine isolation of *B. cereus*.

INTRODUCTION

Bacillus cereus is a Gram-positive, aero-anaerobic, spore-forming microorganism. It has been recognized as an opportunistic pathogen causing various types of infections. Two distinct gastroenteric diseases have been attributed to the food poisoning by *B. cereus*: diarrhoea and emesis. The diarrhoeal syndrome is thought to be due to one or a combination of three chromosomally encoded toxins: the Haemolysin BL (Hbl), the Non-haemolytic enterotoxin (Nhe) and/or the Cytotoxin K (CytK) in the intestine, while emesis is caused by a single heat-stable toxin, the cereulide (Agata *et al.*, 1995; Ehling-Schulz *et al.*, 2004; Rajkovic *et al.*, 2008). Emetic food poisoning is mostly associated with farinaceous foods (Kramer and Gilbert, 1989). Cereulide, the emetic toxin, acts as a pore-forming ionophore, provokes the inhibition of hepatic mitochondrial fatty-acid oxidation and can cause liver failure (Mahler *et al.*, 1997; Mikkola *et al.*, 1999; Ehling-Schulz *et al.*, 2005a; Schoeni and Wong, 2005). Indeed, severe cases, including lethal ones, have been reported after the ingestion of food contaminated with high amounts of cereulide (Mahler *et al.*, 1997; Dierick *et al.*, 2005; Posfay-Barbe *et al.*, 2008; Shiota *et al.*, 2010).

Primary phenotypic and genotypic studies have shown that the emetic strains form a homogenous cluster of mesophilic bacteria, while diarrhoeal strains were heterogeneous and consisted of both mesophilic and psychrotolerant isolates (Ehling-Schulz *et al.*, 2005b; Carlin *et al.*, 2006). Differences in ribopatterns and *adk* gene have then been noticed among some emetic strains (Apetroaie *et al.*, 2005; Altayar and Sutherland, 2006; Vassileva *et al.*, 2007), indicating more variation than previously thought. Similarly, psychrotolerant *Bacillus*

weihenstephanensis were also shown to be cereulide producers (Thorsen *et al.*, 2006). Recently, the detailed genotypic diversity of cereulide-producing strains was investigated by Hoton and coll. (2009) who concluded that these strains belong to two distinct clusters (I and II), with members of cluster II identified as psychrotolerant *B. weihenstephanensis* able to grow at low temperature ($< 7^{\circ}\text{C}$).

B. cereus diagnosis is based on their ability to provoke haemolysis and to hydrolyze lecithin, and their inability to ferment mannitol (Mossel *et al.*, 1967). Media recommended by the ISO 7932: 2004 (ISO, 2004) for isolation of *B. cereus* from foods are based on the latter two characteristics. However, some *B. cereus* strains produce only little or no lecithinase activity. Moreover, the emetic strains display phenotypical specificities such as their weak haemolysis on blood agar and their inability to degrade starch and salicin (Shinagawa, 1990; Agata *et al.*, 1996; Pirttijarvi *et al.*, 1999; Ehling-Schulz *et al.*, 2005a; Carlin *et al.*, 2006). Apetroaie *et al.* (2005) also reported that some cereulide-producing strains isolated from gut were positive for tyrosine decomposition but negative for lecithinase and haemolytic activity. This novel phenotypical profile of cereulide-producing *B. cereus* is not likely to be recognized as *B. cereus* using conventional biochemical tests, and can lead to important misidentifications in emetic strains detection and hence, underestimation of food-borne illness caused by these strains.

In this article, a representative collection of 33 cereulide-producing isolates of *B. cereus* and *B. weihenstephanensis* (Hoton *et al.*, 2009) was used to assess in detail the extent of their phenotypical diversity. A thorough knowledge of their diversity is indeed needed for the future

development of detection methods designed to reducing emetic intoxication.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. The investigation of several new samples allowed the isolation of 23 new emetic strains from human, intestinal tract from game animals (pheasant, wild boar, geese and pigeons) and food (white cheese, rice, pasta and assida, a Tunisian pancake) samples. These strains were isolated as previously described (Valero *et al.*, 2002; Hoton *et al.*, 2009). They were then tested for emetic toxin production using the boar sperm motility inhibition bioassay developed by Andersson and coll. (1998). Three of them, notably isolated from human, pheasant and wild boar, were used in this work. Besides, a set of thirty cereulide-producing strains, including strains isolated from food, emetic-type food poisoning, regular food hygiene inspections and the environment (soil, mammals and arthropods) were also used (Hoton *et al.*, 2009).

API20E and API50CH biochemical tests. The API20E and API50CH biochemical tests were used according to the bioMérieux instructions. Cells were grown overnight on LB medium and suspended in 0.85% NaCl solution for API20E and in API50CHB/E media for API50CH. Bacterial suspensions were inoculated in microtubes and incubated at 37 °C. The results were read visually after 24 h and 48 h.

Mobility, lecithinase and haemolysis activities. The *Bacillus* strains were grown overnight on LB agar. Each strain was then diluted in 40 ml of saline water (0,85%) before spotting (3 µl) on different media: Columbia-based blood agar (containing 5% sheep blood), erythrocyte agar (Oxoid) and Mannitol-egg-Yolk-Polymixin (MYP) plates (BioRad). The plates were incubated at 15 °C or 30 °C. Haemolysis and lecithinase activities were read after 24 h and 48 h. Bacterial motility was tested according to the ISO 7932 standard (1993): a loopful of bacteria was inoculated centrally in glucose agar tubes and incubated at 30 °C for 24 h. A yellow colour from the central inoculation indicated a positive reaction.

PlcR gene amplification and sequencing. Total DNA was isolated using the boiling method as follows: bacterial cells from one colony were suspended in 200 µl of Tris EDTA buffer, heated at 100°C for 10 min and then cooled on ice for 5 min. After centrifugation (13,000 rpm), the supernatant was used as DNA template for PCR amplification. The *plcR* genes of emetic strains CER039 and Kinrooi 5969c were amplified using the primer pairs PLCR1 (5'-TGCA(A/C)GCAGA(A/G)AAATTAGGA-3') and PLCR2 (5'-TTATTCTTSATTTTWTTTA-3') or PlcRF (5'-AAAAAGGAAGAATATCATC -3') and PlcRR (5'-ATGCATCTTCAATCTCTG-3'). All PCR were performed in the following conditions: denaturation at 95°C for 3 min; then 30 cycles of 92 °C for 30 sec; 49 °C for 30 sec and 72 °C for 1 min; then one cycle at 72°C for 7 min.

The PCR products were sequenced using the Genetic Analyser ABI3100 (Applied Biosystem, Foster City, USA) with Dye Terminator

Sequencing Kit V1.1 de Applied. Analysis and comparison of DNA and protein sequences were performed with the wEMBOSS package. For the visualization of multiple alignments, the program “Jalview” was used.

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). The low melting point agarose (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) imbedded DNA was prepared from 6 h cultures according to Gaviria Rivera and Priest (2003), and digested with 30 U of *NotI* (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) for 3 h. PFGE were performed with the CHEF-DR II System (BioRad Laboratories, Hercules, USA) as described by Swiecicka and Mahillon (2006). The ethidium bromide-stained gels were photographed under U.V. light using the GelDoc 2000 System (BioRad) and analysed with the Quantity One PC version 4.1.1 program (BioRad). Each DNA profile was compared with every other by the Dice similarity coefficient. A similarity dendrogram was generated using the UPGMA algorithm, performed with the NTSys PC version 2.02 g program (Exeter Software Setanket, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

New emetic *B. cereus* isolates from animal and human origin. In the scope of isolating new potential *B. cereus* cereulide-producing strains from unusual niches, presumptive *B. cereus* strains isolated from 18 human, animal and food samples were investigated by PCR for the presence of *ces*-related genes. Among the 57 strains tested, 24 putative emetic strains were identified by PCR: one strain from a human hand, eight from the same pheasant intestinal sample, and 15

from the same wild boar intestinal sample. Interestingly, two out of the thirteen game tested carried emetic strains. Contrary to the findings of Altayar and Sutherland (2006) who found that emetic strains are rare in animal faeces, these results confirmed previous observations by Hoton *et al.* (2009) that the digestive tract of small mammals (shrews and field voles) can be a reservoir of cereulide-producing strains. It is also interesting to note that when an animal was positive for putative emetic *B. cereus*, all the isolated colonies from the same intestine turned out positive. Further analysis (see below) showed that these strains were clonal. The three new strains, named F1 (pheasant), S1 (wild boar) and A12 (human) were also shown to be positive for the boar sperm assay (Andersson *et al.*, 1998), suggesting they were producing the cereulide toxin (data not shown). These strains were retained for further detailed phenotypical analysis, together with a subset of emetic *B. cereus* and *B. weihenstephanensis* strains recently isolated (Hoton *et al.*, 2009).

Strains from clusters I and II display distinct phenotypical traits.

More than 70 phenotypic features were analysed on a subset of 33 representative cereulide-producing strains of *B. cereus* s.l. Table 1 summarizes the main features for which striking differences were observed.

It is generally believe that emetic toxin-producing isolates consist of a group of mesophilic strains that display phenotypical specificities, including a weak haemolysis on blood agar, and the inability to degrade starch and salicin (Shinagawa, 1990; Agata *et al.*, 1996; Pirttijarvi *et al.*, 1999; Ehling-Schulz *et al.*, 2005a; Carlin *et al.*, 2006). Recently however, two distinct clusters (I and II) were

identified, with members of the second group identified as psychrotolerant *B. weihenstephanensis* (Hoton *et al.*, 2009). In the second cluster, two distinct groups could also be identified as subclusters IIa and IIb. As shown in Table 1, five phenotypic tests could discriminate between clusters I and II: starch, glycogen and salicin were positive for cluster II, whereas citrate and D-ribose turned to be positive for cluster I only. Interestingly, the amygdaline (positive) and nitrate (negative) assays gave discriminatory responses to cluster IIa, which includes the MC67 and MC118 strains. On a more peculiar side, only one strain (Kinrooi 5971a) was positive for the use of D-raffinose.

The inability to degrade starch by emetic strains cluster I could be linked to a regulatory protein. Indeed, in 1997, Nguyen *et al.* identified a regulatory protein named Reg1, which exhibits similarity with prokaryotic transcriptional regulators of the LacI/GalR family. Reg1 acts as a repressor of α -amylase (one of the enzymes catalyzing the starch fermentation) gene in *Streptomyces lividans*, leading to an inhibition of this enzyme production.

Table 1: Striking phenotypical features of the 33 cereulide-producing strains subset

Clusters	Strains	Starch	Glycogen	Salicin	Amygdalin	Nitrates*	Citrate*	D-Ribose	D-raffinose	Lecithinase	Haemolysis
I	5958b	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	5964a	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	5965c	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	5969c	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	5971a	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
I	5972b	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	5975c	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	F4810/72	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	AND1284	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	AND1407	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	FP211	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	IS021	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	IS075	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	IS053	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	IS195	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	IS122	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	CER039	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
I	1185	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	1385	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	2023	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	2093	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	2094	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	AFR H5	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	AFR H6	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	CER072	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	F1	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	S1	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
I	A12	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
IIa	MC67	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
IIa	MC118	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
IIb	BtB2-4	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
IIb	CER057	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
IIb	CER074	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+

^a I and II refer to the strain clusters (see text for details); *Tests performed using the bioMérieux API20E system
The reactions to tests were positive (+) or negative (-).

Since glycogen and starch are both similar glucose polymers, it is not surprising to observe the same strain activity on both substrates.

Salicin and amygdaline utilisation is under the control of enzymes such as β -glucosidase-like enzymes, which catalyze the hydrolysis of the β -glucosidic bonds. Bioinformatic analyses of published *B. cereus* genomes indicated the existence of three types of β -glucosidases: β GLU-1, β GLU-2, β GLU-3. Sequences of β GLU-1 and 3 are closely related but considerably differ from β GLU-2, which is the most frequent within the *B. cereus* (F. Hoton, G. Van der Auwera and F. Louesse, unpublished results). PCR performed on the *B. cereus* strains (data not shown) showed that certain strains possess simultaneously two distinct β -glucosidases. Therefore, the differences in phenotypic activity observed among the strains of the two distinct clusters (I & II) and within the cluster II could be explained by the diversity in β -glucosidase profiles.

The incapacity of the strains cluster II to ferment citrate differentiates them from the cluster I and the non-emetic strains which are able to metabolize this substrate (Brown *et al.*, 1958). The non-utilization of this substrate by the cluster II could be linked to the CitO, a transcriptional regulator involved in the expression of the *cit* operons (Blancato *et al.*, 2008). Indeed, the construction of a mutant *Enterococcus faecalis* strain with an interrupted *citO* gene, caused a total loss of the ability to degrade citrate. In addition, the reintroduction of a functional copy of *citO* to the *citO*-deficient strain restored the response to citrate and the citrate positive phenotype. These variations observed between cereulide-producing strains for the use of citrate is an interesting new information. Along the same

vein, the D-ribose fermentation is another source of differentiation between the two clusters.

B. cereus strains are in general unable to metabolize D-raffinose (Brown *et al.*, 1958). However, the emetic strain Kinrooi 5971a was the only one able to hydrolyze this substrate.

Other phenotypical tests were also carried out in this work, notably, the study of the emetic strains motility as well as their resistance to antibiotics. For the motility test, an agar media with glucose was used according to the ISO 7932 standard (1993). All the strains tested were mobile at 30 °C except the two strains of cluster IIa. This apparent immobility could be due to the incubation temperature, since these strains are psychrotolerant and are harder to grow at high temperature. The resistance to antibiotics was investigated, using antibiogram tabs (Néo-Sensitabs). Results (data not shown) corroborate with those of literature (Luna *et al.*, 2007). They suggested that emetic strains displayed the same behavior with respect to the antibiotics tested than *B. cereus* non-emetic strains, i.e. resistant to penicillin and generally sensitive to other antibiotics.

The diversity within the emetic strains from clusters I and II was also assessed by comparing their lecithinase and haemolysis activities (Fig. 1 and 2, and Table 1) on MYP agar, 5% sheep blood Columbia and sheep erythrocyte agar. As indicated in Table 1, all the cereulide producing strains tested were positive for lecithinase activity, with the notable exception of CER039 from the cluster I, MC67 and MC118 from the cluster II. Also, all the emetic strains tested positive for haemolysis activity on erythrocyte agar except for strain CER039. The negative egg-yolk reaction exhibited by these three emetic strains (CER039, MC67 and MC118) as well as the negative haemolysis

activity of the strain CER039 are important traits, since these strains are emetic and able to produce cereulide, dangerous and even fatal for human (Mahler *et al.*, 1997; Dierick *et al.*, 2005; Posfay-Barbe *et al.*, 2008; Shiota *et al.*, 2010). Indeed, key diagnostic features of *B. cereus* strains are based on their ability to provoke haemolysis and to hydrolyze lecithin (Ehling-Schulz *et al.*, 2004). In routine detection of *B. cereus*, these pathogenic strains are not even considered as *B. cereus*. That can lead to important misidentifications in emetic strains detection and hence, underestimation of food-borne illness caused by these strains.

In 2005, Apetroaie *et al.* isolated atypical cereulide-producing strains from human gut. These strains lacked lecithinase and haemolytic activity. According to these authors, this surprising phenotype could be due to the mutations in the pleiotropic regulator (PlcR) that controls the transcription of haemolysins and of phospholipase in *B. cereus* as well as in *B. thuringiensis* (Slamti *et al.*, 2004). To try to explain the atypical phenotype of the strain CER039, its *plcR* gene was sequenced.

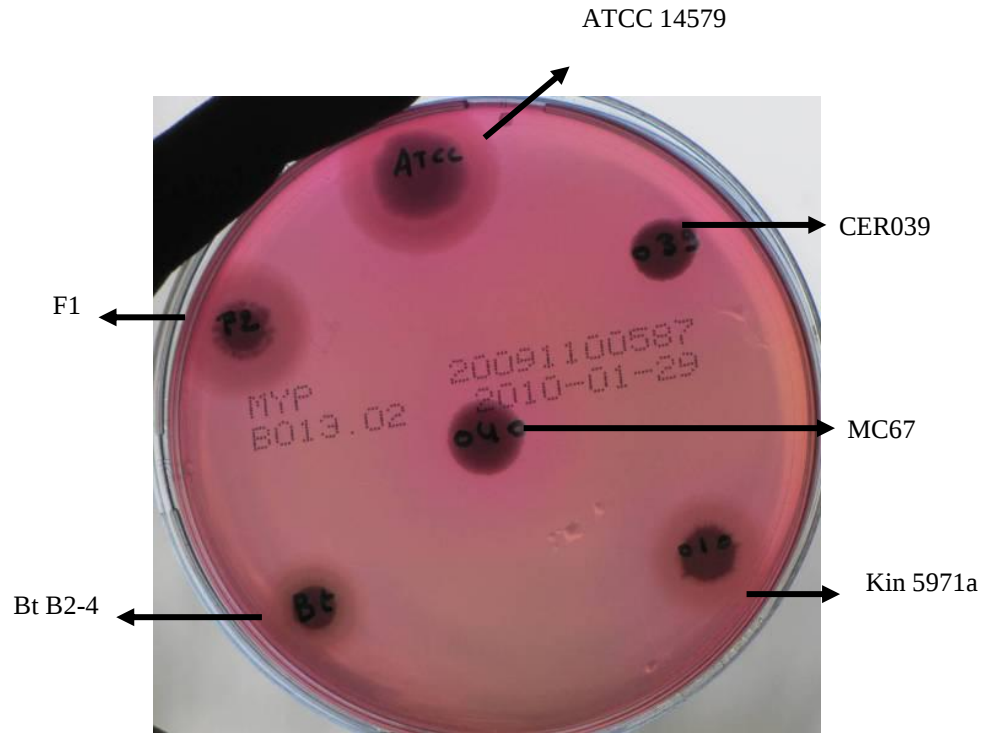


Fig. 1: Lecithinase activity on MYP media. As detailed in the insert table, one non-emetic strain ATCC14579, three emetic strains from cluster I and two emetic strains from cluster II were spotted onto *B. cereus* selective Mannitol-egg Yolk-Polymixin (MYP) and incubated for 24 h at 30 °C. The lecithinase activity is visible as a white precipitate around the colonies. Isolates ATCC14579, F1, BtB2-4, *kin* 5971a, show the lecithinase reaction reported for *B. cereus* on MYP, while the isolates CER039 and MC 67 show an atypical phenotype.

Number	Strain	Cluster
CER039	CER039	I
kinrooi	5971a	I
F1	Pheasant 1	I
MC	MC67	II
Bt	BtB2-4	II
ATCC	ATCC14579	-

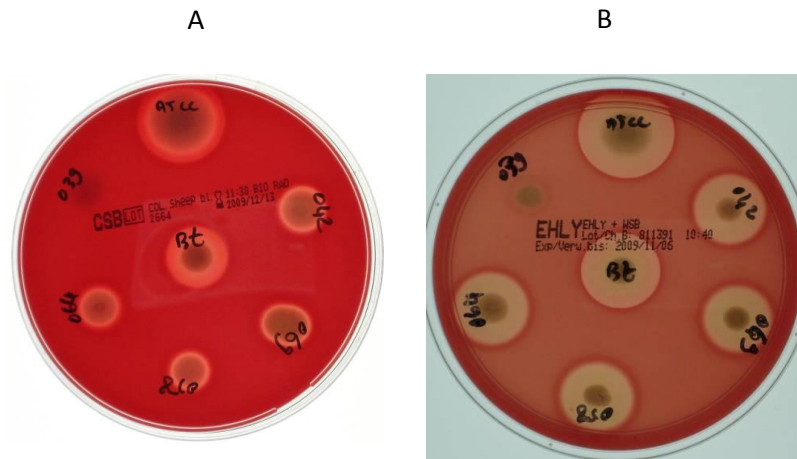


Fig. 2: Haemolysis activity. **A:** 5% sheep blood Columbia agar. **B:** erythrocyte agar. As detailed in the insert table, one non-emetic strain ATCC14579, five emetic strains from cluster I and one emetic strain from cluster II were spotted onto erythrocyte agar plate and incubated at 30 °C for 24 h. Clear zone around colonies indicates the presence of haemolysis.

Number	Strain	Cluster
039	CER039	I
042	ISP 1185	I
069	AFR H6	I
058	2023A (A)	I
064	2093A	I
Bt	BtB2-4	II
ATCC	ATCC14579	-

Point mutation in the CER039 PlcR gene. In order to get more insights into its atypical negative haemolysis and lecithinase phenotypes of strain CER039, its *plcR* gene was entirely sequenced. The *plcR* gene of the emetic strain *Kinrooi* 5969c, which is closely related to CER039 (see the pulsotype analysis below), was also sequenced. The corresponding proteins were aligned to PlcR protein sequences available in the database. As shown in Fig. 3, alignment of these strains revealed the presence of substitutions that probably reflect the divergence in the course of their evolution, since it has been suggested that these strains (*B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*) are derived from a common ancestral. The most interesting observation that was gathered from the same alignment is the point mutation that occurred in the *plcR* of the emetic toxin-producing strain CER039 (Fig. 3). Indeed, in several strains of the *B. cereus* group aligned, glycine seems highly conserved, except in strain CER039. In this emetic strain, guanine takes the place of a cytosine, resulting in an arginine (R) instead of a glycine (G) in the PlcR protein. This mutation could cause the PlcR dysfunction, inducing probably the atypical phenotype (lack of lecithinase and haemolysis activities) observed in CER039. The three emetic strains aligned (*Kinrooi* 5969c, CER039, *B. cereus* H3081.97) presented high percentage (99%) identity, that confirm the above observation (*PlcR* of CER039 is mutated).

These observations should lead us to increase our vigilance when using or developing new selective media or food standards in routine detection of *B. cereus*.

Number	Strain		
		Bc 5	<i>B. cereus</i> B4264
		ATCC	<i>B. cereus</i> ATCC14579
Bc 1	<i>B. cereus</i> emetic H3081.97	Bt	<i>B. thuringiensis</i> AJ58346
Bc 2	<i>B. cereus</i> m1293,	Bw	<i>B. weihenstephanensis</i> DQ
Bc 3	<i>B. cereus</i> AY247	Ba	<i>B. anthracis</i> str Kruger
Bc 4	<i>B. cereus</i> AY776	Bm	<i>B. mycoides</i> AY7761411

Fig. 3: Multiple sequence alignment of protein sequences of PlcR genes. The PlcR gene of the *B. cereus* emetic strain CER039 was sequenced in order to explain its atypical phenotype (Lack of lecithinase and haemolytic activity). The emetic strain kinrooi 5969c which is close to the CER039 according to the pulsotype analysis was also sequenced. The protein sequences obtained were aligned to PlcR protein sequences available from database in order to compare them and highlight their differences. The most significant differences related to the atypical emetic strains CER039 is enclosed in the box.

Bc 1 : *B. cereus* H3081.97, Bc 2 : *B. cereus* m1293, Bc 3 : *B. cereus* AY2479711, Bc 4 : *B. cereus* AY7761401, Bc 5 : *B. cereus* B4264, *B. cereus* ATCC14579, Bt : *B. thuringiensis* AJ58346, Bw : *B. weihenstephanensis* DQ, Ba : *B. anthracis* str Kruger, Bm : *B. mycoides* AY7761411.

PFGE shows high diversity among cereulide-producing strains.

From a previous study (Ehling-Schulz *et al.*, 2005b), it looked as if most strains of cluster I were clonal. Total genomic DNA fragments, cleaved by *NotI*, were therefore analysed through PFGE. Fig. 4 shows the fingerprinting patterns obtained with representative strains of clusters I and II. Among the 23 strains of cluster I, nine distinct pulsotypes could be differentiated, three of which represented by a single isolate (5969c, AND1284, CER039). The isolate 2023 is from the same pulsotype than TIAC303, TIAC321 et TIAC322, other emetic strains which are not in this study (Fig. 4, lanes B, C, E and F).

The five strains isolated from small mammals (IS021, IS053, IS075, IS122, and IS195) did not exhibit any difference in PFGE profiles (Fig. 4, lane G), thereby confirming the MLST results (Hoton *et al.*, 2009). This is quite interesting since these strains were independently isolated from different mammal species (pigmy shrew, common shrew, root vole and bank vole). Strains AFRH5 and AFRH6 isolated from maize flour in Ivory Coast also displayed the same PFGE profile (Fig. 4, lane A) although they were isolated from distinct flour packs, at different times.

Seven strains, isolated from different matrices after the 2003 Kinrooi outbreak in Belgium (Dierick *et al.*, 2005), gave rise to three pulsotypes (Fig. 4, lanes B, H and I). Interestingly, the third fingerprint also included the Belgian isolates 2093 and 2094, which were isolated from distinct Asian food-related incidents in 2006. Clonal (or extremely similar) strains were thus isolated from three distinct food contamination events that occurred in Belgium between 2003 and 2006. The PFGE type of the emetic reference strain F4810/72 was also observed in the case of FP211, isolated from water, as well as for strains 1185 and 1385, isolated from pasta and from the faeces of persons suffering from food toxi-infections, respectively (Fig. 4, lane D).

Finally, cluster II *B. weihenstephanensis* strains CER057 isolated from parsley, BtB2-4 from soil and CER074 from raw milk, showed identical PFGE profiles (Fig. 4, lane K), but had distinct fingerprint than MC67 and MC118 originating from Danish soil (Fig. 4, lane J).

Another contribution of this study was the possibility to discriminate among most members of clusters I and II. This was achieved by the PFGE approach, which could identify at least 18 distinct types from the subset of 30 strains analysed. This is particularly well illustrated in the case of the Kinrooi food intoxication (Dierick *et al.*, 2005) where PFGE could differentiate three distinct pulsotypes among the seven strains isolated.

Summarizing, we showed that the emetic strains display true diversity. Although they are identical in many physiological and genetic properties, different categories were found when a polyphasic approach was used.

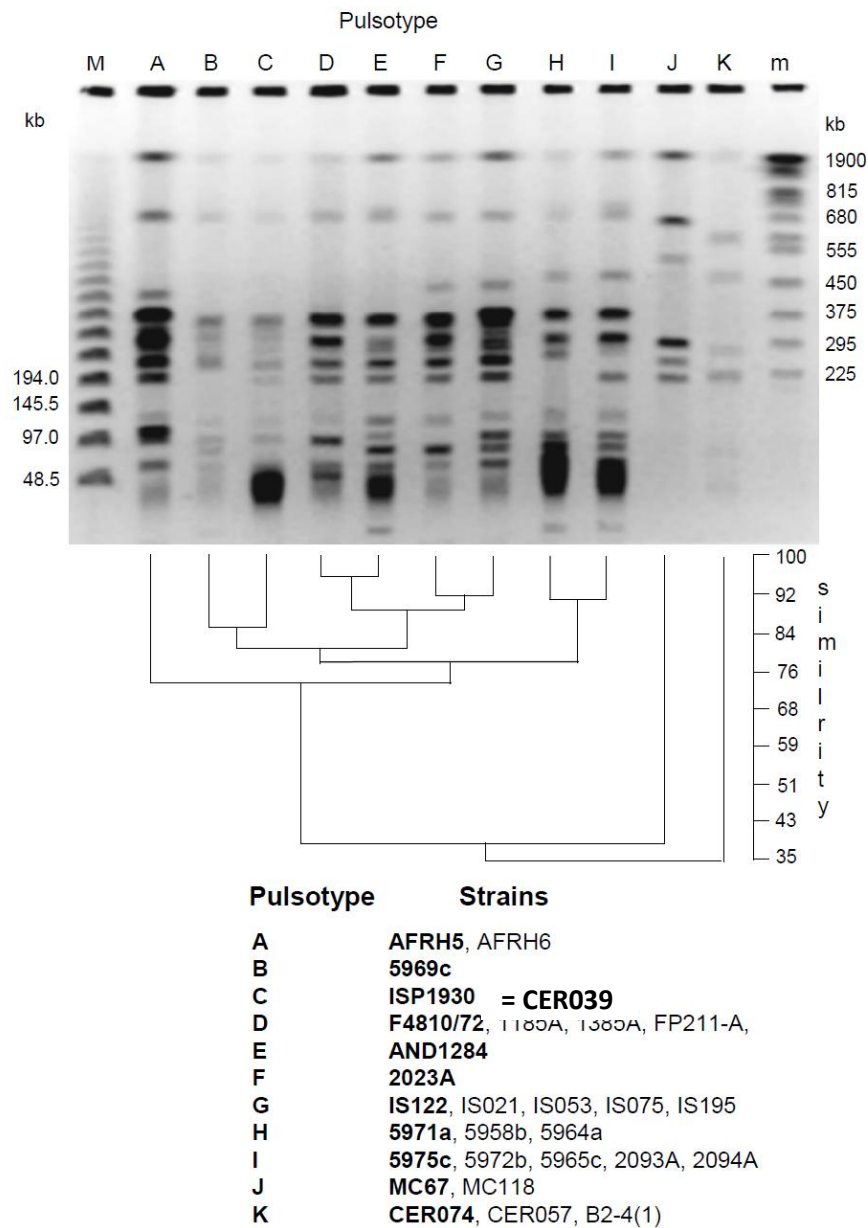


Fig. 4 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns of *NotI*-digested genomic DNA of representative *B. cereus* cereulide-producing strains. m: Yeast chromosome PFGE marker; M: Lambda 48.5 kb size marker. The values on the left and right are molecular weight markers in kilobases. Lanes: A-K, Strain pulsotypes that are represented on the gel are depicted in bold.

REFERENCES

- Agata, N., Ohta, M., Mori, M., Isobe, M., 1995 A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. 129, 17-20.
- Agata, N., Ohta, M., and Mori, M., 1996. Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. Curr. Microbiol. 33, 67-69.
- Altayar, M., and Sutherland, A. D. 2006. *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. J. Appl. Microbiol. 100, 7-14.
- Andersson, M.A., Mikkola, R., Helin J., Andersson, M.C. and Salkinoja-Salonen, M., 1998. A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1338-1343.
- Agaisse, H., Gominet, M., Okstad, O., A., Kolsto, A., Lereclus, D., 1999. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. Molecular Microbiol. 32, 1043-1053
- Apetroaie, C., Andersson, M. A., Sproer, C., Tsitko, I., Shaheen, R., Jääskeläinen, E. L., *et al.* 2005. Cereulide-producing strains of *Bacillus cereus* show diversity. Arch. Microbiol. 184, 141-151.
- Apetroaie C, Shaheen R, Andrup L, Smidt L, Rita H, Salkinoja-Salonen, M. 2008. Environment driven cereulide production by emetic strains of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol* **127**: 60-67.
- Bandell, M.; Lhotte, M.E.; Marty-Teyssset, C.; Veyrat, A.; Prévost, H.; Dartois, V.; *et al.*, 1998. Mechanism of the Citrate Transporters

- in Carbohydrate and Citrate Cometabolism in *Lactococcus* and *Leuconostoc* Species. *Appl Environ Microbiol.* 64,1594-600.
- Blancato VS, Repizo GD, Suarez CA, Magni C.** 2008. Transcriptional Regulation of the Citrate Gene Cluster of *Enterococcus faecalis* Involves the GntR Family Transcriptional Activator CitO. *J Bacteriol*, **190**: 7419-7430.
- Bott, M.,** 1997. Anaerobic citrate metabolism and its regulation in enterobacteria. *Arch Microbiol* 167, 78-88.
- Belcourt LA, and Labuza TP.** 2007. Effect of raffinose on sucrose recrystallization and textural changes in soft cookies. *J. Food Science.* **72**: 65-71.
- Brown ER, Moody MD, Treece EL, Smith CW.** 1958. Differential diagnosis of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *J. Bacteriol.* **75**: 499-509.
- Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., 1 Salkinoja-Salonen, M. S., et al.** 2006. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 132-138.
- Claus, D. and Berkeley, R.C.W.** 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872, In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Ed. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Golt, J.G., Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1128-1135.
- Dierick, K., Coillie, E.V., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., Hoedemaekers, G., Fourie, L., Heyndrickx, M., Mahillon, J.,** 2005. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus* associated food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4277-4279.

- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Scherer, S.,** 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol. Nutr. Food Res.* 48, 479-487.
- Ehling-Schulz M., Vukov N., Schulz A., Shaheen R., Andersson M., Märtlbauer E., Scherer S.,** 2005 (a). Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 71, 105-113.
- Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretière, M.H., Lindback, T., Andersson, M., Schulz, A., Fricker, M., Christiansson, A., Granum, P.E., Martlbauer, E., Nguyen-The, C., Salkinoja-Salonen, M., Scherer, S.,** 2005 (b). Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiol.* 151, 183-197.
- Gaviria Rivera, A.M., and Priest, F.G.** (2003) Pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA reveals a clonal population structure to *Bacillus thuringiensis* that relates in general to crystal protein gene content. *FEMS Microbiol Lett* 223, 61-66.
- ISO 7932: 1993,** Microbiology. General directive for enumeration of *Bacillus cereus*. Colony-count technique at 30°C.
- 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.
- Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., et al.,** 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nat.* 423, 87-91.

- Hoton, F. M., Fornelos, N., N'Guessan, E., Hu, X., Swiecicka, I., Dierick, K., et al.,** 2009. Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* cereulide-producing strains. *Env. Microbiol. Rep.* 1, 177-183.
- Labia, O., Bréhima, D., Tove, C., Jorn, D.M., Mogens, J.,** 2007. Degradation of polysaccharides and non-digestible oligosaccharides by *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* isolated from Soumbala, a fermented African locust bean (*Parkia biglobosa*) food Condiment. *Food Res Technol.* 224, 689-694.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K.P., PruO, B.M., Kaplan, T., WieOner-Gunkel, et al.,** 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 1373-1382.
- Luna V, King D, Gullledge J, Cannons A, Amuso P, Cattani1 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. Chemoth.* 60: 555-567.
- Ko K., Kim, J., Kim, J.M., Kim, W., Chung, S.I., Kim, I.J., Kook, Y.H.,** 2004. Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* Gene. *Infect Immun.* 72, 5253-61.
- Kramer, J.M., Gilbert, J.M.,** 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Doyle, M.P. (Ed), *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, pp. 21-70.

- Mahler, H., Pasi, A., Kramer, J.M., Schulte, P., Scoging, A.C., Bar, W., Krahenbuhl, S.,** 1997. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. N. Engl. J. Med. 336, 1142-1148.
- Mikkola R, Saris NE, Grigoriev PA, Andersson MA, Salkinoja-Salonen MS.,** 1999. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *Bacillus cereus*. Eur J Biochem. 263, 112-117.
- Mossel, D.A., Koopman, M.J., Jongerius, E.,** 1967. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. Appl. Env. Microbiol. 15, 650-653.
- Nguyen J, Francou F, Virolle MJ, Michel Guerineau M.** 1997. Amylase and Chitinase Genes in *Streptomyces lividans* Are Regulated by *reg1*, a Pleiotropic Regulatory Gene. J Bacteriol: 179: 6383-6390.
- Posfay-Barbe, K.M., Schrenzel, J., Frey, J., Studer, R., Korff, C., Belli, D.C. et al.** 2008. Food poisoning as a cause of acute liver failure. Pediatr. Infect. Dis. J. 27, 846-847.
- Pirttijarvi, T. S., Andersson, M. A., Scoging, A. C., and Salkinoja-Salonen, M. S.** 1999. Evaluation of methods for recognising strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. Syst. Appl. Microbiol. 22, 133-144.
- Priest, F.G.** (1977) Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*, Bacteriological Reviews, 41, 711-753.
- Raddadi, N., Belaouis, A., Tamagnini, I., Hansen, B.M., Hendriksen, N.B., et al.,** 2009. Characterization of polyvalent

and safe *Bacillus thuringiensis* strains with potential use for biocontrol. J. Basic Microbiol. 49, 293-303.

Rajkovic A., Uyttendaele M., Vermeulen A., Andjelkovic M., Fitz-James I., in't Veld P., Denon Q., Verhe R., Debevere J., 2008. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. Lett. Appl. Microbiol. 42, 103-105.

Samrot, A., and Vijay, A., 2009. A-Amylase Activity Of Wild And Mutant. Internet J. Microbiol. 6, 2.

Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., and Tsakalidou, E., 2001. Citrate Metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. Appl Environ Microbiol. 5482-5487.

Shinagawa, K. (1990) Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Int. J. Food Microbiol. 10, 125-141.

Shiota, M., Saitou, K., Mizumoto, H., Matsusaka, M., Agata, N., Nakayama, M., et al., 2010. Rapid Detoxification of Cereulide in *Bacillus cereus* Food Poisoning. J. Am. Aca. Ped. 125, 4.

Schoeni, J.L., Wong, A.C., 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. J. Food Prot. 68, 636-648.

Slamti, L., Perchat, S., Gominet, M., Vilas-Boas, G., et al., 2004. Distinct mutations in PlcR explain why some strains of the *Bacillus cereus* group are nonhemolytic. J. Bacteriol. 186, 3531-3538.

Slamti, L. and Lereclus, D., 2005. Specificity and Polymorphism of the PlcR-PapR Quorum-Sensing System in the *Bacillus cereus* Group. J. Bacteriol. 187, 1182-1187.

Swiecicka, I., and Mahillon, J. 2006. Diversity of commensal *Bacillus cereus sensu lato* isolated from the common sow bug (*Porcellio scaber*, Isopoda). FEMS Microbiol Ecol 56, 132-140

- Tajima K., Nakajima K., Yamashita H., Shiba T., Munekata M., Takai M.,** 2001. Cloning and sequencing of the beta-glucosidase gene from *Acetobacter xylinum* ATCC 23769, DNA Res. 8, 263-269.
- Taylor J.P., Wilson B., Mills M.S., Burns R.G.,** 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques, Soil Biology and Biochemi. 34, 387-401.
- Thorsen, L., Bjørn Budde, B., Koch, G.A., Klingberg, D.T.,** 2009a. Effect of modified atmosphere and temperature abuse on the growth from spores and cereulide production of *Bacillus weihenstephanensis* in a cooked chilled meat sausage. Int. J. Food Microbiol. 130, 172-178.
- Thorsen, L., Budde, B., Henrichsen, L., Martinussen, T., Jakobsen, M.,** 2009b. Cereulide formation by *Bacillus weihenstephanensis* and mesophilic emetic *Bacillus cereus* at temperature abuse depends on pre-incubation conditions. Int. J. Food Microbiol. 134, 133-139.
- Thorsen, L., Hansen, B. M., Nielsen, K. F., Hendriksen, N. B., Phipps, R. K., and Budde, B. B.,** 2006. Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide producing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 72, 5118-5121.
- Valero, M., Hernandez-Herrero, L.A., Fernandez, P.S. and 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

- Vassileva, M., Torii, K., Oshimoto, M., Okamoto, A., Agata, N., Yamada, K., et al.** 2007. Anew phylogenetic cluster of cereulide-producing *Bacillus cereus* strains. J. Clin. Microbiol. 45, 1274-1277.
- Vilas-Bôas, G.T., Peruca, A.P.S., Arantes, O.M.N.,** 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. Can. J. Microbiol. 53, 673-687.
- Vihinen, M., and Mäntsälä, P.** 1989. Microbial amylolytic enzymes. Crit Rev Biochem Mol. Biol. 24, 329-418.
- Warner, J.B. and Lolkema, J.S.** 2002. Growth of *Bacillus subtilis* on citrate and isocitrate is supported by the Mg²⁺-citrate transporter CitM. *Microbiol.* 148, 3405-3412
- Yabutani, M., Agata, N., Ohta, M.** 2009. A new rapid and sensitive detection method for cereulide-producing *Bacillus cereus* using a cycleave real-time PCR. Lett. Appl. Microbiol. 48, 698-704.

3.3 Comportement d'une souche émétique de *B. cereus* dans le riz

Dans la plupart des intoxications alimentaires émétiques, les analyses microbiologiques effectuées révèlent un nombre important de *B. cereus* émétiques. La question dans ce chapitre, est de savoir si un éventuel comportement concurrentiel des souches émétiques leur confère un certain avantage vis-à-vis des non émétiques. Par ailleurs, la plupart des études impliquant les souches émétiques sont réalisées sur les milieux de laboratoire, qui ne reflètent pas la réalité des intoxications émétiques. Le riz étant l'un des aliments les plus associés au syndrome émétique, il a par conséquent été choisi comme matrice alimentaire, pour investiguer le comportement des souches émétiques vis-à-vis des autres *B. cereus* non émétiques. A cet effet, un mutant spontané de la souche émétique *kinrooi* 5975c a été isolé sur du milieu Luria-Bertani solide contenant de la rifampicine, afin de faciliter son identification parmi les autres *B. cereus*. Ce mutant Rif^R a été mise en culture dans du Luria-Bertani liquide, puis utilisé comme inoculum dans le riz cuit. Deux types de riz blanc cuit ont été utilisés. L'un cuit à l'eau, que nous avons considéré comme exempt de cellules végétatives « riz cuit », avant l'inoculation par la souche émétique, l'autre cuit à l'eau puis incubé à température ambiante (19 °C - 23 °C) pendant un à trois jours, avant l'inoculation. Nous avons appelé ce dernier, « riz naturellement contaminé ». Le comportement de la souche émétique a ensuite été observé après 24 heures d'incubation, afin de permettre une éventuelle production du céréulide.

Dans le riz cuit, la souche émétique s'est bien développée, en présence d'autres *B. cereus* résidentes non émétiques, quelque soit le taux initial d'inoculum. Cependant elle n'a pas inhibé leur croissance. Dans le riz naturellement contaminé, avec un taux d'inoculum initial d'environ 6 log CFU g⁻¹, la souche émétique s'est également bien multipliée. Cependant, lorsque le taux d'inoculum a été réduit à 3 log CFU g⁻¹, deux cas se sont présentés : à une concentration en *B. cereus* résidente non émétique inférieur à 5 log CFU g⁻¹ dans le riz, la souche émétique s'est bien développée, sans inhiber le développement des autres *B. cereus*. Au delà de cette concentration en *B. cereus* résidente non émétique cependant, la souche émétique s'est développée très modestement.

La production du céréulide a été détectée et quantifiée par la chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse.

Notre étude imite naturellement les intoxications alimentaires causées par les souches émétiques. Elle relate ainsi les récentes intoxications émétiques causées par du riz ayant été incubé 24 h à température ambiante avant sa consommation (Ichikawa *et al.*, 2010; Shiota *et al.*, 2010).

Ce manuscrit a été soumis au journal «*Food Research International*»

Behavior of an emetic *Bacillus cereus* strain in rice food

Elise N'Guessan¹, Laurence Delbrassinne², Jacques Mahillon¹

¹Laboratory of Food and Environmental Microbiology, Université catholique de Louvain, Croix du Sud 2/12, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

²Scientific Institute of Public Health, Food Section, 14 rue Juliette Wytsman, B-1050 Brussels Belgium

Keywords: *B. cereus* emetic strains; bacterial behaviour; food matrices; LC-MS

Tel.: +32 10 47 33 70

Fax: +32 10 47 34 40

Email address: jacques.mahillon@uclouvain.be

SUMMARY

The behavior of a *Bacillus cereus* emetic strain was investigated using rice as food matrix. For the experimental setup, a spontaneous rifampicin-resistant mutant of the *B. cereus* emetic strain *k5975c* was isolated and used to facilitate its recovery and discrimination from other resident *B. cereus* isolates. The emetic strain was grown in Luria-Bertani (LB) broth overnight at 30 °C, inoculated in cooked rice (as such or naturally contaminated) and incubated for 24 h at 23 °C and 30 °C. With an inoculum level of ca. 6 log CFU g⁻¹, the emetic strain showed unhampered growth in rice contaminated by other *B. cereus* at both incubation temperatures, although it did not inhibit the growth of *B. cereus* contaminants. When the inoculum level of the emetic strain was reduced to ca. 3 log CFU g⁻¹, its development was unaffected when the background of resident *B. cereus* was below 5 log CFU g⁻¹. However, above this level of resident *B. cereus* strains, the emetic strain developed modestly at both 23 °C and 30 °C. Cooked rice and naturally contaminated rice were analyzed by the liquid chromatography-ion trap mass spectrometry and by the boar sperm assay in order to test a possible cereulide production and its toxicity, respectively. The presence of the emetic toxin activity was detected when the final concentration of the emetic strain reached ca. 5.6 log CFU g⁻¹ and above this level.

INTRODUCTION

Bacillus cereus sensu stricto is a ubiquitous spore-forming Gram-positive microorganism. The capacity of this bacterium to grow in foodstuffs can cause serious problems to the food industry, not only as spoilage, but also as the source of contaminations and/or intoxications. *B. cereus* is an important cause of foodborne disease worldwide (Clavel *et al.*, 2007; Granum, 2007), although it is probably under-reported in official lists of foodborne diseases. This enteropathogenic bacterium is responsible of two types of foodborne illness in humans: diarrhea and emesis (Kramer & Gilbert, 1989). The diarrheal syndromes are thought to be associated with three chromosomally encoded toxins: the Hemolysin BL (Hbl), the Nonhemolytic enterotoxin (Nhe) and/or the Cytotoxin K (CytK). Hbl and Nhe are threecomponent toxins composed of proteins L2, L1 and B, and NheA, NheB, and NheC, respectively. The emetic syndrome is caused by the cereulide, a pH and heat stable cyclic peptide toxin (Agata *et al.*, 1995). Because of its resistance towards acid conditions, proteases and heat, cereulide is not destroyed by gastric acid, proteolytic enzymes of the intestinal tract or food reheating (Agata *et al.*, 1994; Shinagawa *et al.*, 1996). The emetic syndrome is usually mild but rare fatal cases have been reported (Mahler *et al.* 1997; Dierick *et al.*, 2005; Shiota *et al.*, 2010).

Several studies have demonstrated that the cereulide-producing strains are restricted to what appears to be a relatively clonal (monomorphic) group of *B. cereus* isolates (Agata *et al.*, 1996; Ehling-Schulz *et al.*, 2005; Carlin *et al.*, 2006). Nonetheless, recent studies have suggested that there may be more diversity within this group of

pathogens than previously thought (Apetroaie *et al.*, 2005) and isolates belonging to the psychrotolerant species *Bacillus weihenstephanensis* have recently been shown to produce cereulide (Thorsen *et al.*, 2006). Moreover, Hoton *et al.*, (2009) have reported that emetic strains belong to two distinct clusters (I and II), with members of cluster II identified as psychrotolerant *B. weihenstephanensis* able to grow at low temperature (< 7 °C). It has also been demonstrated that the emetic toxin biosynthetic gene cluster, containing non-ribosomal peptide synthetase genes, is encoded on a 270 kb plasmid (Hoton *et al.*, 2005; Ehling-Schulz *et al.*, 2006; Rasko *et al.*, 2007).

The toxicity of cereulide has been tested extensively upon a variety of cell types, including HEP-2 (Hughes *et al.*, 1988), CHO (Chinese Hamster Ovary) (Beattie & Williams, 1999), rat liver (Mahler *et al.*, 1997; Kawamura-Sato *et al.*, 2005), and boar spermatozoa (Andersson *et al.*, 1998, 2004; Rajkovic *et al.*, 2006). However, these studies were performed using enriched laboratory media and did not mimic naturally occurring emetic poisoning. Moreover, the number of *B. cereus* cells required to produce sufficient emetic toxin amounts to trigger disease is difficult to determine. In most emetic food poisonings, the microbiology tests conducted on the incriminated food revealed a significant number of emetic bacteria. Levels of 10^3 - 10^9 CFU g⁻¹ food have been found and, in most cases, at least 10^5 CFU g⁻¹ food (Pirhonen *et al.*, 2005).

Among the food matrices associated with *B. cereus* emetic poisoning, rice is certainly one of the most important source of contamination (Altayar & Sutherland, 2006; Wijnands *et al.*, 2006; Fricker *et al.*, 2007; Ankolekar *et al.*, 2009). Not only is rice easily

contaminated with soil-borne spores of *B. cereus* (Sarrias *et al.*, 2002), but the way rice is prepared for human consumption can promote its survival, outgrowth and toxin production during vegetative growth (Finlay *et al.*, 2002). Similarly, of all the foods tested by Agata *et al.* (2002), rice was reported as the food containing the highest cereulide concentration when artificially inoculated with emetic strain. In this work, because of its frequent involvement in emetic food poisoning, cooked rice was used to evaluate the behavior of an emetic strain with respect to other *B. cereus* contaminants.

MATERIALS AND METHOD

Preparation of bacterial inoculum. The cereulide-producing strain *Kinrooi 5975c* was isolated from the Belgian lethal food-poisoning outbreak case in 2003 (Dierick *et al.*, 2005). A spontaneous rifampicin mutant (*k5975cR*) was used in the experimental setup to allow an easier recovery and discrimination from the resident *B. cereus* microflora. The strain was grown in Luria-Bertani broth (LB, Oxoid) overnight at 30 °C. From appropriate dilution in peptone buffer water, PBW (3 g l⁻¹ Peptone, 1.5 g l⁻¹ NaCl, 1.5 g l⁻¹ Na₂HPO₄, KH₂PO₄), 1 ml of culture was taken and used as inoculum for rice, providing inoculation levels of ca. 10³ or ca.10⁶ CFU g⁻¹ depending on the experiment (Fig. 1).

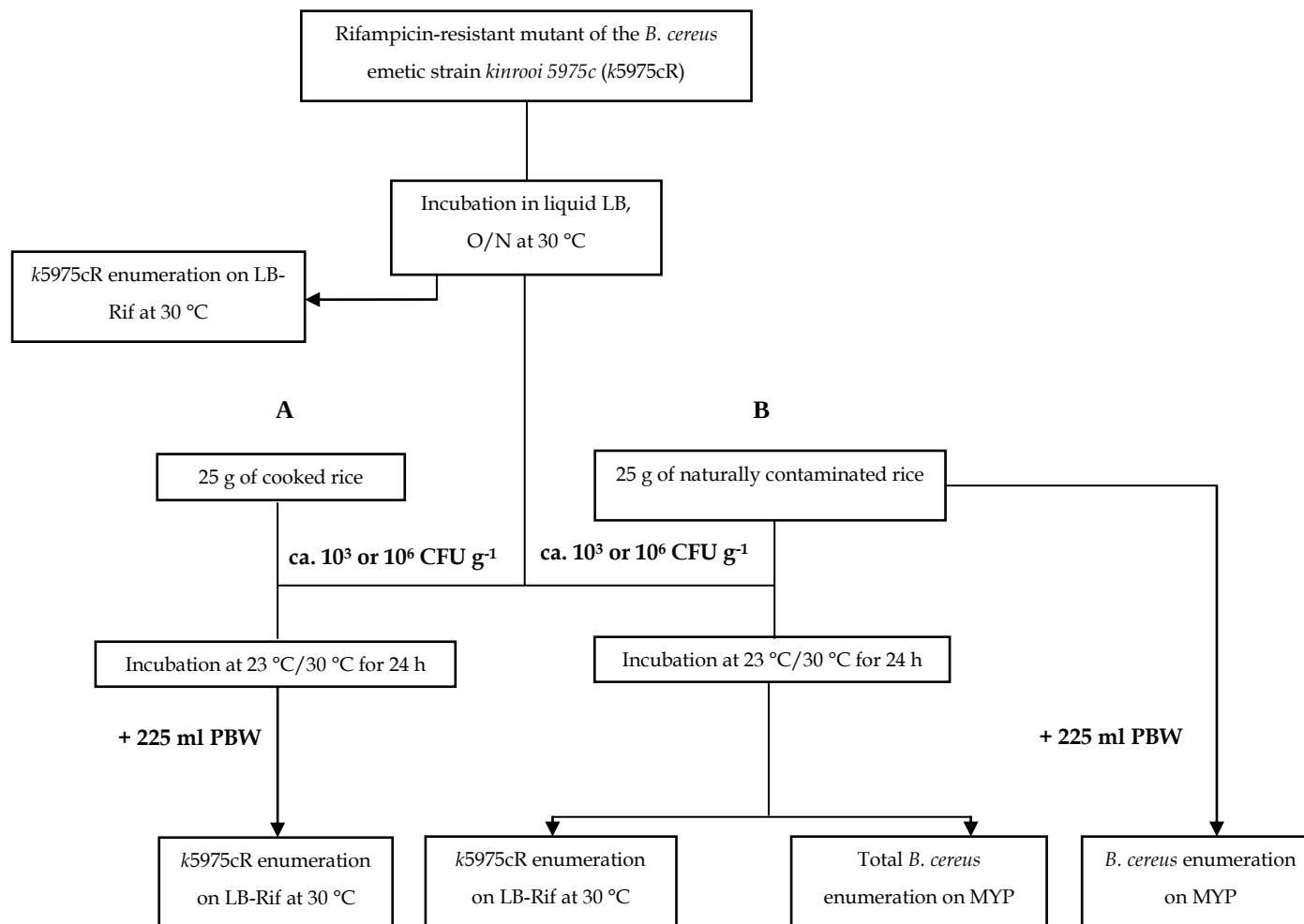
Cooked rice and naturally contaminated rice. White rice was purchased from a supermarket at Louvain-la-Neuve (Belgium). 200 g of dry rice was added to 400 ml boiling tap water. The rice was boiled for 15 min in order to eliminate the vegetative bacterial background and then transferred into different bowls. One set of bowls was kept at low temperature (< 4 °C) to avoid germination of the *B. cereus* spores in rice and/or contamination by other bacteria. This boiled rice was used in the study as “cooked rice”. The other set of bowls was incubated at room temperature for 24-72 h and used as “naturally contaminated” rice.

Bacterial inoculation and enumeration of cooked and naturally contaminated rice. 25 g of cooked rice, or naturally contaminated rice, were weighed in stomacher bags 400 (Led Techno) and mixed with 1 ml of *k5975cR* culture to reach final concentration levels of ca.

10^3 or 10^6 CFU g^{-1} , followed by incubation at 23 °C and 30 °C for 24 h. A negative control consisting in not inoculated rice sample was also added. Enumeration of the *k5975cR* emetic strain from the overnight culture was carried out in parallel (Fig. 1) in order to determine its actual concentration.

After 24 h of incubation, 25 g of each rice samples (cooked or naturally contaminated) were added to 225 ml of sterile PBW in sterile stomacher bags. The samples were then dispersed by stomaching for 1 min at 230 rpm in a stomacher 400. A tenfold serial dilution was made, and from the appropriate dilution, 100 μ l was spread plated onto *B. cereus* selective Mannitol-egg Yolk-Polymixin (MYP, BioRad) agar plates and on LB agar plates containing Rifampicin (LB-Rif). Following the incubation for 24 h at 30 °C, CFU displaying a pink color with irregular edge surrounded by white area on the MYP medium were considered as positive (*B. cereus sensu lato*) and enumerated as described by Valero and coll. (2002).

Fig. 1: Experimental set-up to follow the growth behavior of the rifampicin resistant *B. cereus* emetic strain *k5975cR* in cooked rice and in naturally contaminated rice. **(A):** Cooked rice was inoculated with 1 ml of *k5975cR* overnight culture to reach either ca. 10^3 or 10^6 CFU g^{-1} in rice and incubated at 23 °C and 30 °C for 24 h. After incubation, cooked rice was mixed with 225 ml BPW followed by enumeration of *k5975cR* on LB-Rif plates. **(B):** 25 g of cooked rice left at room temperature during 48 - 72 h for natural contamination (reaching between 10^2 to 10^8 CFU ml^{-1} , see Table 2) were also inoculated with 1 ml of *k5975cR* culture to reach either 10^3 or 10^6 CFU g^{-1} in rice and incubated at 23 °C and 30 °C for 24 h. After incubation, rice was mixed with 225 ml PBW followed by enumerations of *k5975cR* on LB-Rif agar and total *B. cereus* on MYP. The original contamination of rice by resident *B. cereus* was also assessed on MYP after dilution in PBW.



Cereulide production in cooked rice and naturally contaminated rice by k5975cR. The emetic toxin was detected using the boar sperm motility inhibition bioassay and the liquid chromatography-ion trap mass spectrometry (LC-MS).

Boar sperm motility inhibition bioassay. Boar sperm was supplied by the “Windey pig-breeding farm” (Pécrot, Belgium). The semen was stored at room temperature and used for the boar sperm bioassay (Andersson *et al.*, 1998; 2004; Rajkovic *et al.*, 2006) within the day of collection. Three grams of rice sample (cooked or naturally contaminated) were mixed with 6 ml of DMSO, in a 10 ml conical flask, placed in boiling water for 15 min and cooled. Ten µl of extract was applied into tubes containing boar semen. After 10 min of exposure at 37 °C, the spermatozoid motility was estimated using phase-contrast microscope with a heating stage at 37 °C. Five microscopic fields with about 50 sperm cells in each were observed. The test was considered as positive when at least 90 % exhibited lost of motility.

Liquid Chromatography-Mass Spectrometry analysis. The extraction method described in Delbrassinne *et al.* (submitted for publication) was used. Briefly, 3 g of the inoculated rice with k5975cR (either cooked or contaminated rice) was extracted with 6 ml of methanol and boiled for 15 min, followed by evaporation under N₂ atmosphere. After redissolution of the residue in 3 ml of methanol and centrifugation, the supernatant was stored at -20 °C prior to analysis. Cereulide content of each extract was analyzed on a LCQ Deca-XP Plus ion trap mass analyzer using a modified LC-MS method inspired by Häggblom *et al.* (2002). A Symmetry C₈ column was used

for chromatographic separation using an isocratic method (mobile phase of 95 % acetonitrile, 4.9 % water, 0.1 % trifluoroacetic acid). Valinomycin (Fluka, Germany) was used as external standard. For quantification of cereulide, the m/z values for adduct ions 1,170.5 (NH_4^+ adduct) and 1,191.5 (K^+ adduct) were monitored.

RESULTS AND DISCUSSION

Experimental set-up. Cooked rice devoid of vegetative resident flora and cooked rice left at room temperature during 48-72 h for natural contamination (hereafter named naturally contaminated rice) were used as food matrices to investigate the behavior of a genuine emetic strain of *B. cereus*, *Kinrooi 5975c*, in rice food. In order to discriminate this strain from the other resident isolates of *B. cereus*, a spontaneous rifampicin-resistant mutant, *k5975cR*, was used. As indicated in Fig. 1, rice was inoculated with different levels of *k5975cR* (ca. 6.2 or ca. 3.2 log CFU g^{-1}), followed by enumeration on LB-Rif agar, 24 h after incubation at different temperatures (23 °C or 30 °C). Several independent tests were performed for each inoculum level. Since the naturally contaminated rice was left at room temperature in an open environment during 48- 72 h before inoculation with the emetic strain, the total population of *B. cereus* isolates was also enumerated on MYP before and after incubation with the emetic strain.

Growth behavior of the *B. cereus* emetic strain *k5975cR* in cooked rice. When inoculum levels of 5.6 to 6.5 log CFU per gram of rice were used, *k5975cR* was able to reach counts of more than 9 log

CFU g⁻¹ within 24 h after inoculation, at both incubation temperatures of 23 °C and 30 °C, with cell numbers slightly higher at 30 °C than at 23 °C (Table 1, experiments 1 to 8). When the inoculum concentration was reduced by ca. 3 log (Table 1, experiments 9 to 16), the final counts after 24 h were almost similar at 30 °C, but displayed an average 10-fold reduction at 23 °C. No significant growth of *k5975cR* was observed after 24 h at 15 °C, independently of the inoculation level (data not shown). The toxicity of the rice was then assessed using the boar sperm bioassay. All the samples tested turned out positive (loss of spermatozoa motility within 10 min of exposure), indicating the presence of cereulide after 24 h incubation in cooked rice, independently of the incubation temperature (23 or 30 °C) (data not shown).

These observations corroborate those of Finlay and collaborators (2002), which indicated that the storage of cooked rice at 20 °C or above leads to a rapid growth rate during the first 24 h. Similar high counts of *B. cereus* in rice have been reported elsewhere (Ueda & Kuwabara, 1993; Agata *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2003). According to other studies (McElroy *et al.*, 2000; Penna *et al.*, 2002; Cronin & Wilkinson, 2008), the proliferation of *B. cereus* could start at 10 °C five days after incubation, while at 30 °C, the proliferation of *B. cereus* began only two hours after incubation.

Table 1: Rifampicin-resistant *B. cereus* emetic strain *k5975cR* behavior in cooked rice.

Tests ^a	Inoculum level of <i>k5975cR</i> in rice ^b	<i>k5975cR</i> count in rice, 24 h after inoculation ^c	
		23 °C	30 °C
1	5.6	9.0	9.3
2	5.9	9.1	9.6
3	6.1	9.4	9.7
4	6.1	9.4	9.8
5	6.3	9.4	9.6
6	6.3	9.3	9.6
7	6.4	9.1	9.8
8	6.5	9.2	9.8
9	3.0	8.6	9.5
10	3.1	8.5	9.2
11	3.2	8.8	9.3
12	3.2	8.1	9.4
13	3.3	8.4	9.1
14	3.3	8.2	9.2
15	3.4	8.6	9.4
16	3.4	8.0	9.6

^aNumbers refer to independent tests carried out; ^b *k5975cR* level used as inoculum in rice, sorted in increasing order. ^c *k5975cR* counts in rice after 24 h of incubation at 23 °C or 30 °C (see Fig. 1A and text for details). The bacterial concentrations are expressed as log CFU g⁻¹ of rice.

Growth behavior of the *B. cereus* emetic strain *k5975cR* in contaminated rice. Despite the presence of background flora in naturally contaminated rice, including vegetative *B. cereus*, *k5975cR* showed an unhampered growth 24 h after inoculation at 30 °C, when its inoculum level was ca. 6.2 log CFU g⁻¹ (Table 2, exp. 1 to 8). Moreover, when the inoculums concentration of the emetic strain was higher than the background of resident *B. cereus*, most of the final *B. cereus* counts consisted of *k5975cR*. Only when the inoculation level of *k5975cR* was lower than the resident *B. cereus* (7.5 log CFU g⁻¹) was the final proportion of *k5975cR* slightly lower (Table 2, exp. 6 to 8).

The same contaminated rice samples were incubated in parallel at 23 °C. In these conditions, the final total *B. cereus* counts were slightly lower than at 30 °C, and the proportion of the emetic strain was slightly more variable than at 30 °C. As a corollary, these observations also indicated that the *k5975cR* emetic strain did not significantly inhibit the growth of the *B. cereus* background flora, even at inoculation concentration as high as 6.5 log CFU g⁻¹. With lower inoculum levels (ca. 3.2 log CFU g⁻¹) of the emetic strain, the most important development of *k5975cR* at 30 °C was observed only when the *B. cereus* background flora was below or equal to approximately 5 log CFU g⁻¹ (Table 2, exp. 9 to 12). At higher background levels (≥ 6.4 log CFU g⁻¹), the emetic strain developed modestly reaching only concentrations of 4.4 to 5.8 log CFU g⁻¹ (Table 2, exp. 13 to 16), while the total *B. cereus* flora remained important (above 8.6 log CFU g⁻¹). Similar observations were made for the samples incubated at 23 °C, with final concentrations lower than at 30 °C.

Cereulide production in rice. In order to more accurately assess the cereulide produced in the different growth conditions, the toxin was detected and estimated using the boar sperm motility inhibition (data not shown) bioassay and LC-MS. A good correlation between cereulide production (quantified by LC-MS) and cereulide activity (detected by the sperm bioassay) was noticed. As shown in Table 3, the highest concentration of cereulide in the cooked rice was observed at 23 °C (more than 4,600 ng equivalent of valinomycin g⁻¹) when the primary inoculum was reached 6 log CFU g⁻¹. For lower inoculum, the amount of cereulide per gram was greater at 30 °C than at 23 °C (less than 150 ng). Pre-contamination of the rice (containing more than 7 log of resident *B. cereus*) did not drastically influence the final cereulide concentration in the case of an inoculum of 6 log of the *k5975cR* emetic strain. The resident microflora however interfere with both the growth and cereulide production of *k5975cR* when lower inocula of the emetic strain (ca. 3 log CFU g⁻¹) were used. In this case, no (23 °C) or detectable but not quantifiable amounts (30 °C) of cereulide could be recorded (Table 3).

Table 2: Rifampicin-resistant *B. cereus* emetic strain *k5975cR* behavior in naturally contaminated rice

Tests ^a	<i>B. cereus</i> background flora in rice ^b	Inoculum level of <i>k5975cR</i> in rice ^c	<i>k5975cR</i> count in rice 24 h after inoculation ^d		Total <i>B. cereus</i> in rice 24 h after inoculation ^e	
			23 °C	30 °C	23 °C	30 °C
1	2.0	6.1	8.8	9.5	9.2	9.6
2	2.3	5.6	8.9	9.5	9.0	9.6
3	4.2	6.5	9.4	9.7	9.7	9.8
4	5.4	6.3	8.8	9.5	9.1	9.5
5	5.5	6.4	9.5	9.8	9.6	9.8
6	7.5	6.5	8.6	8.8	8.7	9.1
7	7.5	5.9	7.5	8.3	8.8	9.0
8	8.2	6.1	8.4	8.9	8.5	9.2
9	4.1	3.2	8.2	9.0	8.1	9.3
10	4.5	3.1	7.7	8.5	8.5	9.8
11	4.6	3.4	8.6	9.3	8.7	9.3
12	5.0	3.3	8.5	9.0	8.3	9.3
13	6.4	3.0	4.2	5.0	8.5	8.6
14	8.2	3.2	4.8	5.8	8.8	9.2
15	8.3	3.4	4.5	4.4	7.2	8.7
16	8.5	3.3	4.1	5.4	8.9	9.2

Numbers refer to independent tests carried out; ^b *B. cereus* background flora in rice, sorted by increasing order; ^c *k5975cR* level used as inoculum in rice; ^d *k5975cR* counts in rice after 24 h of incubation at 23 °C or 30 °C. ^e Total *B. cereus* counts in rice 24 h after inoculation at 23 °C or 30 °C (see Fig. 1B and text for details). The bacterial concentrations are expressed as log CFU g⁻¹ of rice.

Table 3. Cereulide quantification by LC-MS

	Inoculum level of <i>k5975cR</i> log CFU g ⁻¹ of rice	Cereulide (ng of valinomycin equivalent/g of rice) and <i>k5975cR</i> counts (log CFU g ⁻¹ of rice) 24 h after inoculation			
		23 °C		30 °C	
Cooked rice	3.0	146 ^a	8.7 ^b	569 ^a	9.2 ^b
	6.0	4685	9.4	1153	9.6
Contaminated rice	3.0	< 1	4.5	ca.1-5	5.6
	6.0	4279	8.4	2035	8.5

Cereulide LC-MS analysis was performed on cooked and naturally contaminated rice, inoculated with either ca. 3 or 6 log CFU g⁻¹ of the rifampicin-resistant cereulide-producing strain *k5975cR*. *B. cereus* background flora in naturally contaminated rice before *k5975cR* inoculation was estimated as 7.4 log CFU g⁻¹. The tests were performed at two different temperatures (23 °C and 30 °C). ^a Cereulide concentration, ^b *k5975cR* counts.

Behavior of an emetic strain in rice. Taken together, all these observations indicated that the *k5975cR* emetic strain can grow from 10^3 to more than 10^8 CFU g⁻¹ and produced emetic toxin within 24 h, both in cooked and naturally contaminated rice, unless the resident *B. cereus* flora had already reached levels above 5 log CFU g⁻¹. The amounts of cereulide produced reached toxin levels previously shown to induce emesis (0.01-1.6 µg cereulide g⁻¹ food) in humans (Agata *et al.*, 2002; Virtanen *et al.*, 2008). Interestingly, there is no strict correlation between the amount of cereulide produced and the number of *B. cereus* CFU. This indicates that cautions should be taken in assessing the toxicity of a food product by enumerating its *B. cereus* content, as recently reported by Delbrassinne *et al.* (submitted for publication).

Recently, Shaheen and coll. (2009) found that *B. cereus* emetic strains isolated from food implicated in emetic poisoning inhibited the growth of non emetic *B. cereus* isolated from the same food. According to Pirhonen *et al.*, (2005), this capability to compete with non emetic strains may explain why emetic strains invade the food matrices in the case of food poisoning. However, in this study the *k5975cR* emetic strain did not clearly inhibit the growth of the *B. cereus* background flora.

Our study mimicked naturally occurring emetic food poisonings. It relates to the recent severe forms of rice food poisoning caused by emetic *B. cereus*, involving hospitalization or even death (Ichikawa *et al.*, 2010; Shiota *et al.*, 2010). Although the cereulide production was not quantified in the foodstuffs, the toxin was determined as the causative agent of the illness caused by rice foods prepared the day before, and left at room temperature.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our gratitude to the Ivory Coast state for a research grant to E.N. This research was partly supported by the Federal Public Service, Belgian Science Policy. We also thank the personnel of the Food and Environmental Microbiology Laboratory for many discussions and helpful comments.

REFERENCES

- 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.
- Agata, N., Ohta, M., Mori, M., Isobe, M., 1995** A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. 129, 17-20.
- 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, 67-69.
- Agata, N., Ohta, M., Yokoyama, K., 2002.** Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. Int. J. Food Microbiol. 73, 23-27.
- Altayar, M., Sutherland, A.D., 2006.** *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. J. Appl. Microbiol. 100, 7-14.
- 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.

Andersson, M.A., Jääskeläinen, E.L., Shaheen, R., Pirhonen, T., Wijnands, L.M., Salkinoja-Salonen, M.S., 2004. Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. Int. J. Food Microbiol. 94, 175-183.

Ankolekar, C., Rahmati, T., Labbé, R.G., 2009. Detection of toxinogenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. Int. J. Food Microbiol. 128, 460-466.

Apetroaie, C., Andersson, M.A., Sproer, C., Tsitko, I., Shaheen, R., Jääskeläinen, E.L., Wijnands, L.M., Heikkilä, R., Salkinoja-Salonen, M.S., 2005. Cereulide-producing strains of *Bacillus cereus* show diversity. Arch. Microbiol. 184, 141-151.

Beattie, S.H., Williams, A.G., 1999. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. Lett. Appl. Microbiol. 28, 221-225.

Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., 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.

Clavel, T., Carlin, F., Dargaignaratz, C., Lairon, D., Nguen-The, C., Schmitt, P., 2007. Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. J. Appl. Microbiol. 97, 214-219.

- Cronin, U.P., Wilkinson, M.W.**, 2008. The growth, physiology and toxigenic potential of *Bacillus cereus* in cooked rice during storage temperature abuse. Food Control. *In press*.
- Dierick, K., Coillie, E.V., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., Hoedemaekers, G., Fourie, L., Heyndrickx, M., Mahillon, J.**, 2005. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus* associated food poisoning. J. Clin. Microbiol. 43, 4277-4279.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Grallert, H., Rieck, P., Wagner, M., Scherer, S.**, 2006. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. BMC Microbiol. 6, 20.
- Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretière, M.H., Lindback, T., Andersson, M., Schulz, A., Fricker, M., Christiansson, A., Granum, P.E., Martlbauer, E., Nguyen-The, C., Salkinoja-Salonen, M., Scherer, S.**, 2005. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. Microbiol. 151, 183-197.
- Fang, T.J., Wei, Q.K., Lio, C.W., Hung, M.J., Wang, T.H.**, 2003. Microbiological quality of 18 degrees C ready-to-eat food products sold in Taiwan. Int. J. Food Microbiol. 80, 241-250.
- Finlay, W.J.J., Logan, N.A., Sutherland, A.D.**, 2002. *Bacillus cereus* emetic toxin production in cooked rice. J. Food Microbiol. 19, 431-439.
- Fricker, M., Messelhaüßer, U., Busch, U., Scherer, S., Ehling-Schulz, M.** 2007. Diagnostic Real-Time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. Appl. Environ. Microbiol. 73, 1892-1898.

- Granum, P.E., 2007. *Bacillus cereus*. In: Doyle, M.P., Beuchat L.R.** (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers*. ASM Press, Washington, DC, pp. 445-455.
- Häggblom, 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2479-2483.
- Hoton, F.M., Andrup, L., Swiecicka, I., Mahillon, J., 2005.** The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiol.* 151, 2121-2124.
- Hoton, F.M., Fornelos, N., N'Guessan, E., Hu, X., Swiecicka, I., Dierick, K., Jääskeläinen, E., Salkinoja-Salonen, M., Mahillon, J. 2009.** Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* cereulide-producing strains. *Environ. Microbiol. Reports*, 1, 177-183.
- Hughes, S., Bartholomew, B., Hardy, J.C., Kramer, J.M., 1988.** Potential application of a HEp-2 cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. *FEMS Microbiol. Lett.* 52, 7-12.
- Ichikawa K, Gakumazawa M, Inaba A, Shiga K, Takeshita S, Mori M, Kikuchi N. 2010.** Acute encephalopathy of *Bacillus cereus* mimicking Reye syndrome. *Brain Dev.*
- Kawamura-Sato, K., Hiramata, Y., Agata, N., Ito, H., Torii, K., Takeno, A., Hasegawa, T., Shimomura, Y., Ohta, M., 2005.** Quantitative analysis of cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, by using rat liver mitochondria. *Microbiol. Immunol.* 49, 25-30.

- Kramer, J.M., Gilbert, J.M.,** 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Doyle, M.P. (Ed), Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, New York, pp. 21-70.
- Mahler, H., Pasi, A., Kramer, J.M., Schulte, P., Scoging, A.C., Bar, W., Krahenbuhl, S.,** 1997. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. N. Engl. J. Med. 336, 1142-1148.
- McElroy, D.M., Jaykus, L.A., Foegeding, P.M.,** 2000. Validation and analysis of modeled predictions of growth of *Bacillus cereus* spores in boiled rice. J. Food Prot. 63, 268-272.
- Penna, T.C.V., Moraes, D.A., Fajardo, D.N.,** 2002. The effect of nisin on growth kinetics from activated *Bacillus cereus* spores in cooked rice and in milk. J. Food Prot. 65, 419-422.
- Pirhonen, T.I., Andersson, M.A., Jääskeläinen, E.L., Salkinoja-Salonen, M.S., Honkanen-Buzalski, T., Johansson, T.M.L.,** 2005. Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food-poisoning case. Food Microbiol. 22, 87-91.
- Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Ombregt, S.A., Jääskeläinen, E., Salkinoja-Salonen, M., Debevere, J.,** 2006. Influence of type of food on the kinetics and overall production of *Bacillus cereus* emetic toxin. J. Food Prot. 69, 847-852.
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Økstad, O.A., Fouts, D.E., Jiang, L., Cer, R.Z., Kolstø, A.-B., Gill, S.R., Ravel, J.,** 2007. Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. J. Bacteriol. 189, 52-64.

- Sarrias, J.A., Valero, M., Salmeron, M.C.,** 2002. Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice. Food Microbiol. 19, 589-595.
- Shaheen, R.,** (2009) *Bacillus cereus* spores and cereulide in food-borne illness. Ph.D. Thesis. University of Helsinki, 63 pp.
- Shinagawa, K., Ueno, Y., Hu, D., Ueda, S., Sugii, S.,** 1996. Mouse lethal activity of a HEp-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. J. Vet. Med. Sci. 58, 1027-1029.
- Shiota, M., Saitou, K., Mizumoto, H., Matsusaka, M., Agata, N., Nakayama, M., et al.,** 2010. Rapid Detoxification of Cereulide in *Bacillus cereus* Food Poisoning. J. Am. Aca. Ped. 125, 4.
- Thorsen, L., Hansen, B.M., Nielsen, K.F., Hendriksen, N.B., Phipps, R.K., Budde, B.B.,** 2006. Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 72, 5118-5121.
- Ueda, S., Kuwabara, Y.,** 1993. An ecological study of *Bacillus cereus* in rice crop processing. J. Antibact. Antifung. Agents 21, 499-502.
- 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.
- Virtanen, S.M., Roivainen, M., Andersson, M.A., Ylipaasto, P., Hoornstra, D., Mikkola, R., Salkinoja-Salonen, M.S.,** 2008. In vitro toxicity of cereulide on porcine pancreatic Langerhans islets. Toxicon, 51, 1029-37.

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, 2587-2594.

Chapitre 4 : Discussion générale

Les travaux présentés dans cette thèse ont été initiés pour isoler, identifier et caractériser les souches émétiques de *B. cereus* à partir des denrées alimentaires. Ces pathogènes sont à l'origine de fréquentes intoxications alimentaires humaines, parfois mortelles dont deux cas signalés en Belgique récemment. Ils concernaient une fillette de 7 ans et un jeune homme d'une vingtaine d'années, tous deux décédés après avoir consommé des plats de pâtes contenant un nombre important de *B. cereus* émétiques. Le but de l'étude est de progresser dans la connaissance de ces souches, afin de les isoler facilement.

4. 1 Souches émétiques et sécurité alimentaires

Le chapitre 3.1 de la thèse a porté sur les caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches émétiques de *B. cereus*. Notre contribution consistait à isoler, identifier et caractériser des souches émétiques de *B. cereus*, à partir des denrées alimentaires vendues sur le marché. Certains aliments farineux (par exemple, le riz, les pâtes, la farine de maïs) qui sont les plus susceptibles d'abriter des *B. cereus* émétiques, ainsi que d'autres types d'aliments (comme le persil, les végétaux, le lait) ont été investigués. Cette étude a montré que *B. cereus* peut être isolé à partir de plusieurs types d'aliments vendus sur le marché en Belgique. Quatre cent neuf souches de *B. cereus* ont été isolées à partir de 393 échantillons d'aliments analysés. Dans la plupart de ces échantillons, le nombre de *B. cereus* isolé est inférieur à 10^3 CFU/g, soit un taux satisfaisant selon les spécifications

de l'AFSCA (Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire).

Sur les six souches émétiques identifiées parmi ces *B. cereus*, trois proviennent du miel, du lait cru et du persil. La collection du laboratoire, qui contenait déjà 33 souches émétiques au moment du déroulement de ces travaux a été enrichie avec les souches émétiques trouvées dans ces produits alimentaires.

Comme le montrent les résultats, il n'y a pas de lien exclusif entre les aliments investigués et la présence de souches émétiques. Par exemple le riz et les pâtes sont des aliments typiquement liés aux intoxications émétiques et sont régulièrement investigués pour la recherche des *B. cereus* émétiques ainsi que leur toxine (Altayar and Sutherland, 2006 ; Fricker *et al.*, 2007). Cependant le nombre de souches émétiques isolées à partir de ces types d'aliments n'était pas particulièrement plus élevé que celui des souches isolées à partir des autres aliments.

Les spores de *B. cereus* sont fréquemment présentes dans le lait cru. La contamination se fait principalement via les mamelles des vaches, elles mêmes contaminées par le sol et les fèces (Christiansson *et al.*, 1999). Ces spores thermorésistantes peuvent survivre aux opérations de pasteurisation ou de déshydratation dans l'industrie alimentaire et se retrouver dans les produits finis qui en dérivent (par exemple dans les aliments pour enfant). En 2006, Shaheen *et al.* ont identifié 11 souches émétiques sur 100 *B. cereus* isolées à partir de produits alimentaires à base de lait pour enfant. De même, 24 souches émétiques sur 508 *B. cereus* ont été isolées à partir d'échantillons de crème fraîche par Messelhäusser *et al.* (2010).

D'après ces auteurs, le lait pasteurisé serait une origine possible des souches émétiques.

En 2006, Svensson *et al.* avaient également identifié 44 souches émétiques sur 3911 *B. cereus* provenant du lait. Ces résultats suggèrent que la chaîne de production du lait est une source possible des souches émétiques contaminant les aliments à base de lait pour enfant (Shaheen *et al.* 2009b).

Le miel, le lait cru et le persil ne sont généralement pas suspectés comme des aliments régulièrement liés au syndrome émétique. Cependant, ils peuvent introduire des cellules végétatives et /ou des spores dans les produits finaux, de la chaîne alimentaire et provoquer une intoxication alimentaire.

Deux des souches émétiques isolées ont été identifiées comme des *B. weihenstephanensis* capables de croître et de produire la toxine émétique à 8 °C. Ceci corrobore l'étude de Thorsen *et al.* (2006), qui ont également isolé deux souches émétiques de *B. weihenstephanensis*, productrices de céréulide. La découverte de ces souches émétiques psychrotolérantes, productrices de céréulide impose une grande vigilance. En effet, les aliments de confort incluant les préparations réfrigérées précuites et les repas prêts à l'emploi sont de plus en plus produits et consommés. De plus, une occurrence élevée de *B. cereus*, notamment de spores psychrotolérantes de *B. cereus* et *B. weihenstephanensis* a été mise en évidence dans ces types de produits (Wijnands *et al.*, 2006).

Selon Rajkovic *et al.* (2007), le céréulide peut être produit dans certains aliments atypiques non farineux tels que le fromage et le lard. Cette toxine n'étant pas inactivée par les traitements thermiques des aliments, sa production à des températures de réfrigération est

par conséquent critique pour la sécurité alimentaire, même si les quantités produites à 8 °C ne peuvent pas provoquer une intoxication émétique (Rajkovic *et al.*, 2008 ; Thorsen *et al.*, 2006; 2009a). Actuellement, la température inférieure ou égale à 4 °C, avec une durée de conservation limitée est requise pour contrôler le développement de *B. cereus*.

4. 2 Diversité phénotypique des souches émétiques

Différentes études phénotypiques et génotypiques avaient initialement montré qu'il n'y a qu'une très faible variabilité au sein des *B. cereus* émétiques en comparaison avec la forte variabilité au sein du groupe *B. cereus* (Agata *et al.*, 1996 ; Ehling-Schulz *et al.*, 2005b). Cependant une certaine diversité a récemment été mise en évidence parmi les souches émétiques (Thorsen *et al.*, 2006; Hoton *et al.*, 2009). Quelques souches émétiques possédant des différences dans le gène d'une adénylate kinase (*adk*) et dans leur ribotype ont été découvertes dernièrement. Ces souches se différencient également des autres souches émétiques par leur aptitude à décomposer la tyrosine et leur incapacité à hydrolyser les lécithines (Apetroaie *et al.*, 2005; Vassileva *et al.*, 2007). De plus, en 2006, Thorsen *et al.* ont isolé deux souches émétiques psychrotolérantes identifiées comme étant des *B. weihenstephanensis*. Cependant, l'une des découvertes marquantes de la diversité a été l'identification de deux groupes distincts au sein des souches émétiques, avec les membres du groupe II, identifiés comme des *B. weihenstephanensis* psychrotolérants,

capables de croître et produire le céréulide à basses températures (Hoton *et al.*, 2009). Ces deux groupes peuvent être distingués par plusieurs traits génotypiques et phénotypiques. Les différences phénotypiques concernent notamment la température de croissance (48 °C pour le groupe I et <7 °C pour le groupe II) et la capacité à dégrader ou utiliser certains substrats comme l'amidon, le glycogène, la salicine, l'amygdaline, le nitrate, le citrate et le D-ribose. Ces différences de capacité métabolique entre les différents groupes pourraient s'expliquer par les différences observées dans leur matériel génétique.

La dégradation de la salicine semble être sous le contrôle d'enzyme de type β -glucosidase. La diversité des profils en β -glucosidases, révélée par des recherches préliminaires dans notre laboratoire pourrait expliquer la diversité phénotypique qui existe entre les deux groupes, concernant la métabolisation de la salicine.

Il est important de noter que l'hydrolyse de l'amidon et la dégradation de la salicine sont des traits phénotypiques qui ne permettent plus de discriminer les souches émétiques des non-émétiques et probablement les émétiques entre elles. Selon une récente étude, trois souches émétiques sur quarante testées, sont capables de produire la toxine hémolytique HBL, métaboliser l'amidon ainsi que la salicine. De plus, lorsqu'elles sont mises en culture à 6 °C pendant 21 jours, elles ne présentent aucun signe de croissance (Jung-Beom *et al.*, 2010). Cela indique qu'elles ne sont pas psychrotolérantes et n'appartiennent probablement pas au groupe II. Pourtant jusqu'ici, seules les souches émétiques psychrotolérantes du groupe II présentaient ces traits phénotypiques (Thorsen *et al.*, 2006; Hoton *et al.*, 2009). Les caractéristiques phénotypiques de ces trois

souches émétiques sont similaires aux *B. cereus* non-émétiques ainsi qu'aux autres membres du groupe *B. cereus*. Comme mentionné ci-dessus, les souches émétiques appartiennent à deux groupes (I et II). Les membres du groupe I ont les déterminants génétiques du céréulide localisés sur le plasmide pXO1-like, tandis que pour les souches du groupe II, ces déterminants génétiques sont soit portés par un plasmide nommé pXO3, n'ayant aucun rapport avec le pXO1-like, soit localisés sur le chromosome. Potentiellement, le plasmide pXO1-like pourrait bouger et être échangé entre différents *Bacillus* tels que *B. cereus*, *B. weihenstephanensis*, *B. pseudomycoides*, *B. mycoides*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis* (Hoton *et al.*, 2005; Van der Auwera *et al.* 2007). Au vu de ces résultats, Jung-Beom *et al.* (2010) ont suggéré que le plasmide pXO1-like a pu être échangé entre différentes souches du groupe *B. cereus*. Il est cependant important de noter qu'à ce jour, aucune activité de conjugaison ou de mobilisation de ce plasmide n'a été mise en évidence.

La diversité au sein des souches émétiques a également été mise en évidence par la différence dans leur capacité à dégrader la lécithine et à provoquer une activité hémolytique. Le test de l'hydrolyse de la lécithine est basé sur la présence de phospholipase C chez les organismes testés, capable de dégrader la lécithine, phospholipide membranaire extrait du jaune d'œuf. La réaction positive des différentes souches testées semble confirmer que *B. cereus* a une activité lécithinase prononcée (Vilas-Bôas 2007). Cependant, certaines souches émétiques sont négatives pour l'activité lécithinase et l'une nommée CER039 est aussi négative pour l'activité hémolytique. Ce phénotype atypique a également été observé chez deux souches émétiques isolées par Apetroaie *et al.* (2005). Cette

particularité peut être problématique, car les activités lécithinase et hémolytique sont les principaux critères utilisés pour le dénombrement de *B. cereus* (norme ISO 7932: 2004). Le fait que certaines souches émétiques soient négatives pour cette activité signifie qu'en cas d'analyse, ces souches pathogènes ne seraient pas considérées comme des souches de *B. cereus*.

Afin de mieux comprendre le comportement atypique de la souche CER039, son gène *PlcR* a été séquencé. Nos travaux ont montré que cette absence d'activité lécithinase et hémolytique est probablement due à une mutation du gène *PlcR*, ce qui le rendrait inactif. En effet, ce gène code pour le régulateur pleiotropique qui contrôle la transcription de plusieurs protéines extracellulaires incluant les phospholipases, les protéases et les hémolysines. Le séquençage du gène *PlcR* a montré qu'un acide aminé petit et apolaire (glycine) a muté en un acide aminé volumineux et polaire (arginine). La substitution de l'un par l'autre s'accompagne probablement d'un changement de conformation et d'activité de la protéine PlcR. En 2004, Slamti *et al.* après avoir analysé 400 souches de *B. cereus* ont mis en évidence 8 souches à la fois négatives aux activités lécithinase et hémolytique. Leurs investigations ont montré qu'une mutation spontanée au niveau du gène *PlcR* était à l'origine du comportement atypique chez 1 % (4 sur 400) des souches testées.

4. 3 Comportement d'une souche émétique de *B. cereus* dans le riz

Lors d'une intoxication alimentaire, le dénombrement des *B. cereus* à partir du plat de pâtes (contenant de la viande émincée) incriminé, a mis en évidence la présence d'une majorité de souches émétiques (68 % des 122 colonies de *B. cereus* testées) comparé aux non-émétiques (Pirhonen *et al.*, 2005). Nous avons par conséquent investigué la possibilité d'une éventuelle compétitivité des *B. cereus* émétiques face aux non-émétiques, susceptible de conférer un avantage de développement aux premières citées. Le riz a été utilisé comme matrice alimentaire dans cette étude. Les résultats ont montré que les souches émétiques se développent et produisent la toxine émétique en présence des *B. cereus* non émétiques contaminant du riz, sans inhiber leur croissance. Cependant, le niveau de développement est fonction du taux d'inoculum initial des souches émétiques ainsi que du degré de contamination des *B. cereus* contaminants du riz, au moment de l'inoculation.

Ces résultats corroborent ceux d'Altayar and Sutherland (2006) qui ont testé une activité inhibitrice de la toxine émétique sur plusieurs microorganismes tel que les levures et les bactéries dans un milieu de culture à base de lait écrémé. Selon ces auteurs, la souche émétique s'est bien développée et a produit sa toxine sans inhiber le développement des autres microorganismes.

Cependant, nos travaux sont en contradiction avec ceux de Shaheen *et al.* (submitted, cité dans Shaheen, 2009a), qui ont montré que les souches émétiques pouvaient entraver le développement des autres *B. cereus* sur un milieu de culture de laboratoire. Le

phénomène de compétitivité serait répandu chez les souches émétiques de *B. cereus* impliquées dans des intoxications alimentaires. Selon ces auteurs, le céréulide n'est pas à l'origine de cette inhibition car les tests ont montré que la substance responsable est thermosensible. Bien que n'ayant pas été identifiée, cette dernière pourrait être une bactériocine.

La capacité des souches émétiques à entraver le développement des *B. cereus* non émétiques pourrait expliquer leur habilité à se développer plus avantageusement dans les aliments impliqués dans les intoxications émétiques (Pirhonen *et al.*, 2005).

L'inhibition d'autres *B. cereus* par les souches émétiques reste donc incertaine à ce jour. Cependant, il faut noter que les intoxications émétiques décrites dans la littérature sont très souvent associées aux aliments réchauffés, tels que le riz et les pâtes (M. Naranjo and colleagues, in preparation; Shiota *et al.*, 2010). Selon Carlin *et al.* (2006), les spores des souches émétiques sont en général plus résistantes que celles des non-émétiques. Le réchauffement de l'aliment tue non seulement les cellules végétatives et favorise la germination des spores, mais pourrait aussi provoquer une sélection des spores émétiques. Ce phénomène de sélection pourrait en partie expliquer pourquoi les souches émétiques se retrouvent en nombre élevé et colonise les aliments impliqués dans les intoxications émétiques.

Le comportement compétitif de *B. cereus*, *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, vis-à-vis d'autres bactéries a été rapporté par plusieurs études (Kim *et al.*, 2003 ; Laloo *et al.*, 2010). *B. cereus* produit des bactériocines telles que le Zwittermicin et la Cerein 7A, ayant une action antagoniste envers d'autres bactéries (Kevany *et al.*, 2009;

Oscáriz and Pisabarro 2000). Aussi, le genre *Bacillus* est très utilisé comme agent de contrôle biologique grâce à son comportement compétitif vis-à-vis des autres pathogènes et à sa capacité à former des spores résistantes. Selon Lalloo *et al.* (2010), la compétitivité de *B. cereus* est liée à son taux de croissance élevé et à sa capacité à utiliser certaines ressources telles que le glucose et le fer. En 2005, Rajkovic *et al.* avaient également rapporté que la compétitivité de *B. cereus* vis-à-vis d'autres *Bacillus* était liée à son taux de croissance élevé. Ils ont montré que la souche de *B. cereus* TZ415 a provoqué l'inhibition d'une *B. circulans*, mise en co-culture à 10 °C, contrairement à la souche de *B. cereus* 1.91 qui n'a eu aucun effet inhibiteur sur la même *B. circulans*, placée dans les mêmes conditions expérimentales. L'investigation des caractéristiques de croissance a montré que le taux de croissance de *B. cereus* TZ415 était plus élevé, atteignant un nombre d'environ 10^7 CFU ml⁻¹ en 72 h, comparé à celui de *B. cereus* 1.91, qui a atteint ce même nombre en 128 h. Selon ces auteurs, la souche de *B. cereus* TZ415 est plus compétitive que *B. cereus* 1.91.

B. cereus fait parti des pathogènes alimentaires capable de former des biofilms. Selon une récente étude portant sur les substances naturelles (nystatine, amphotericine, gramicidine, surfactine) produites par divers microorganismes et capables de stimuler la formation de biofilm chez *B. subtilis*, les ionophores du potassium tels que la toxine émétique de *B. cereus* et la valinomycine pourraient avoir une implication dans la formation de biofilm (López *et al.*, 2009). Les récents travaux de Ekman *et al.* (2009, résultats non publiés) ainsi qu'une étude réalisée dans notre laboratoire confirment cette hypothèse en mettant en évidence l'implication de la toxine émétique dans la formation de biofilm. Selon ces études, l'ajout de

cette toxine dans des cultures de *B. cereus* augmenterait la formation de biofilm, notamment chez les souches émétiques. Par ailleurs, il a été montré que les bactéries contenues dans un biofilm présentent des caractéristiques très différentes de leurs homologues planctoniques (bactéries libres en suspension), parmi lesquelles la production d'exopolymères, la mise en place d'un système de communication chimique ("quorum sensing"), une augmentation significative de leur résistance aux agents antimicrobiens (désinfectants ou antibiotiques) et aux stress environnementaux (Campanac *et al.*, 2002). Dans ces conditions, on s'interroge si la production de la toxine émétique confère un avantage aux souches émétiques dans la compétition vis-à-vis des autres *B. cereus*, en favorisant la formation de biofilm?

La capacité des souches émétiques à former des biofilms a été investiguée dans divers travaux de recherches. Auger *et al.* (2009), après avoir testé l'habilité des bactéries du groupe *B. cereus* à former des biofilms, ont montré que les souches émétiques de *B. cereus* ne forment pas de biofilms après 72 h d'incubation dans des microplaques en polychlorure de 96 puits, alors que 37,5% à 47% de *B. thuringiensis* et *B. cereus* non émétiques en forment. D'après ces auteurs, la capacité à former des biofilms serait fortement liée à l'origine de la bactérie du groupe *B. cereus*. Les souches impliquées dans la colonisation de l'intestin de l'hôte seraient plus habilitées à former des biofilms, ce qui n'est pas le cas des souches émétiques. Shaheen *et al.* (2009b) ont également rapporté que les spores de *B. cereus* émétiques ne produisent pas de biofilms dans le lait entier, contrairement aux non émétiques. L'implication de biofilms dans la compétitivité des souches émétiques reste par conséquent non clarifiée à ce jour.

Chapitre 5 : Conclusions et perspectives

Le travail présenté dans cette thèse a été mené à un moment où la diversité phénotypique des souches émétiques ainsi que leur comportement dans un produit alimentaire n'étaient pas suffisamment investiguées.

Au cours de ce travail, une recherche de souches émétiques dans les aliments a été effectuée. A cet effet, plusieurs denrées alimentaires vendues sur le marché en Belgique et en Côte d'Ivoire ont été investiguées, en vue d'isoler des souches de *B. cereus*. Un screening par PCR des *B. cereus* isolées a été réalisé dans le but d'identifier des souches émétiques. Le test du sperme de verrat a par la suite permis de mettre en évidence la toxicité des souches préalablement détectées par PCR. Six souches émétiques productrices de céréulide ont été isolées, trois à partir d'aliments prélevés en Belgique et trois autres de la Côte d'Ivoire. De nouvelles investigations d'isolement de souches émétiques, dans des pays d'Afrique autres que la Côte d'Ivoire permettraient non seulement de confirmer ou d'infirmer ces données mais surtout d'enrichir la collection du laboratoire en terme de diversité géographique des souches émétiques.

Les souches émétiques isolées ont contribué à une étude de distribution réalisée sur une collection de 73 souches émétiques provenant de diverses origines. Cette étude a confirmé la rareté de ces souches dans l'environnement. Elle a aussi montré que les souches émétiques appartiennent à deux groupes distincts (I et II). Le groupe I regroupant les *B. cereus* émétiques mésophiles et le groupe II, les *B. weihenstephanensis* émétiques, capables de se développer à basse température (< 7 °C). Bien que l'implication de ces souches

psychrotolérantes dans une intoxication émétique n'ait pas encore été démontrée, leur recherche systématique à partir des REPFED's (Refrigerated Processed Foods of Extended Durability) serait pertinente, compte tenu de la demande grandissante de ce type de denrées. Cela permettrait de préciser l'occurrence des souches psychrotolérantes émétiques dans ces aliments et peut-être, mesurer par la même occasion les risques potentiels que pourrait entraîner la récente émergence de ces dernières.

Cette large étude de distribution a également permis de mettre en évidence, l'existence de pulsotypes (des sous-groupes) au sein des souches émétiques. Ces pulsotypes montrent que des souches émétiques isolées de manière indépendante, à des endroits géographiquement différents et parfois avec plusieurs années d'intervalles présentent une forte similarité génétique. Il serait donc intéressant de vérifier si ces souches émétiques sont des clones répandus dans l'environnement, ou simplement des souches génétiquement très proches. Cela permettra probablement de répondre à la grande question : « d'où viennent ces souches émétiques ? » Des analyses MLST sur des gènes variables pourraient être réalisées afin d'éclaircir ce point.

Une autre investigation au cours de cette thèse, a porté sur l'étude de la diversité phénotypique des souches émétiques. Plusieurs différences phénotypiques liées à la métabolisation de certains substrats, ont été mises en évidence entre les deux groupes et au sein du groupe II. Cette étude a également montré que l'usage de milieu de culture basé sur l'hydrolyse de la lécithine ou sur une activité hémolytique, peut conduire à des erreurs d'identifications des souches de *B. cereus*. Elle peut être ainsi l'une des raisons de la sous-

estimation des toxi-infections liées à *B. cereus*, notamment des intoxications émétiques. En effet, nous avons mis en évidence une souche du groupe I et deux souches du groupe II, négatives à l'activité lécithinase, dans les conditions de tests préconisées par la norme. La souche du groupe I est en plus négative au test d'hémolyse réalisé sur le milieu sheep blood agar. Le séquençage du gène *PlcR* de cette souche a permis de mettre en évidence une mutation dans la séquence nucléotidique de ce dernier. Afin de tester l'hypothèse selon laquelle cette mutation est responsable de la perte d'activités lécithinase et hémolytique, une complémentation de la souche atypique pourrait être effectuée en introduisant un plasmide avec les gènes actifs du *PlcR* et du *PapR* dans le génome de cette dernière. Les souches transformées pourraient être testées sur le milieu MYP et sur le milieu au sang de mouton afin de vérifier si elles développent les phénotypes cités ci-dessus.

Il serait également préférable de ne pas tenir compte du halo de précipité blanc autour de la colonie lors de l'isolement des *B. cereus* sur le milieu MYP. Ce précipité indique l'hydrolyse de la lécithine par la lécithinase. La non prise en compte de ce dernier (précipité) permettrait de ne pas passer à côté des souches de *B. cereus* ayant une activité lécithinase négative.

Au cours de cette étude, nous avons analysé le comportement de la souche émétique *K5975c* vis-à-vis d'autres *B. cereus* dans le riz. Les résultats ont montré qu'elle se développe bien et produit sa toxine en 24 h, sans entraver la croissance des dernières citées. L'inhibition des *B. cereus* non-émétiques par la souche émétique testée reste incertaine. En effet, les résultats obtenus dans ce travail montrent que la souche émétique n'a pas d'effet inhibiteur sur les autres *B. cereus*, alors qu'un

récent travail indique le contraire (voir le point 4.3 de la discussion). A l'avenir, pour mieux investiguer l'inhibition d'autres bactéries par cette souche émétique, une extraction par HPLC des métabolites produits par cette dernière, autres que le céréulide, pourrait être réalisée afin de les tester individuellement sur d'autres *B. cereus* non-émétiques. Aussi, la mise en co-culture dans une matrice alimentaire d'une souche émétique de *B. cereus* et d'une non-émétique permettra de mieux suivre leur compétitivité en analysant leur croissance.

Les souches émétiques étant responsables d'une intoxication alimentaire grave et parfois mortelle, leur connaissance approfondie est nécessaire pour gérer les risques liés à leur croissance. Ce travail a permis une avancée considérable dans la connaissance de ces souches. Il a mis en exergue leur diversité, ainsi que les limites de la méthode normalisée de dénombrement des *B. cereus*. Il a permis de mieux cerner le comportement d'une souche émétique vis-à-vis d'autres *B. cereus* non-émétiques dans une matrice alimentaire.

Chapitre 6 : Références

- Afchain AL, Carlin F, Nguyen-The C, Albert I. 2008. Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurized and chilled foods. *Int J Food Microbiol*, **128**: 165-173.
- Agaisse H, Gominet M, Okstad OA, Kolsto AB, Lereclus D. 1999. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol*, **32**: 1043-1053.
- Agata N, Mori M, Ohta M, Suwan S, Ohtani I, Isobe M, 1994. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**: 31-34.
- Agata N, Ohta M, Mori M, Isobe M. 1995. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett*, **129**: 17-20.
- Agata N, Ohba M, Mori M. 1996. Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. *Curr Microbiol*, **33**: 67-69.
- Agata N, Ohta M, Mori M, Shibayama K. 1999. Growth conditions of an emetic toxin production by *Bacillus cereus* in a defined medium with amino acids. *Microbiol Immunol*, **43**: 15-18.
- Agata N, Ohta M, Yokoyama K, 2002. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *Int. J. Food Microbiol*, **73**: 23-27.

- Altayar M and Sutherland AD.** 2006. *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. *J. Appl. Microbiol*, **100**: 7-14.
- Ankolekar C, Labbe´ RG.** 2010. Physical characteristics of spores of food-associated isolates of the *bacillus cereus* group.. *Appl. Environ. Microbiol*, **76**: 982-984.
- Andersson MA, Jääskeläinen EL, Shaheen R, Pirhonen T, Wijnands LM, Salkinoja-Salonen M.S.** 2004. Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. *Int. J. Food Microbiol*, **94**: 175-183.
- Andersson A, Granum PE, Rönner U.** 1998. The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *Int. J. Food Microbiol*, **39**: 93-99.
- Andreeva, ZI, Nesterenko VF, Fomkina MG, Ternovsky VI, Suzina NE, Bakulina AY, Solonin AS, Sineva EV.** 2007. The properties of *Bacillus cereus* hemolysin II pores depend on environmental conditions. *Biochimica, Biophysica Acta*, **1768**: 253-263.
- Apetroaie, C., Andersson, M. A., Sproer, C., Tsitko, I., Shaheen, R., Jääskeläinen, E. L., et al.** 2005. Cereulide-producing strains of *Bacillus cereus* show diversity. *Arch. Microbiol*, **184**: 141-151.
- Apetroaie-Constantin, C., Shaheen, R., Andrup, L., Smidt, L., Rita, H., and Salkinoja-Salonen, M.** (2008) Environment driven cereulide production by emetic strains of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol* **127**: 60-67.
- Ash C, Farrow JAE, Dorsh M, Stackebrandt E, Collins MD.** 1991. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and

related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA, *Int. J. Syst Bacteriol*, **41**: 343-346.

Auger S, Ramarao N, Faille C, Fouet A, Aymerich S, Gohar, M. 2009. Biofilm Formation and Cell Surface Properties among Pathogenic and Nonpathogenic Strains of the *Bacillus cereus* Group. *Appl Environ Microbiol*, **75**: 6616-6618.

Bartoszewicz M, Hansen BM, Swiecicka I. 2008. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiol*, **25**: 588-96.

Beecher DJ, Schoeni JL, Wong ACL. 1995. Enterotoxigenic activity of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*, *Infect Immun*, **63**: 4423-4428.

Bourguet D, Guillemaud T, Chevillon C, Raymond M. 2004. Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution*, **58**:128-35.

Bravo A, Gill SS, Soberon M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, **49**: 423-435.

Briley RT, Teel JH, Fowler JP. 2001. Nontypical *Bacillus cereus* outbreak in a child care center. *J Environ Health*, **63**: 9-11, 21.

Brillard J, Lereclus D. 2004. Comparison of cytotoxin *cytK* promoters from *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 and from a *Bacillus cereus* food-poisoning strain *Microbiol*, **150**: 2699-2705.

Cadot C, Tran SL, Vignaud ML, De Buyser ML, Kolstø AB, Brisabois A, Nguyen-Thé C, Didier Lereclus D, Guinebretière MH, 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.

- Campanac C, Pineau L, Payard A, Baziard-Mouysset G, Roques C.** 2002. Interactions between Biocide Cationic Agents and Bacterial Biofilms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **46**: 1469-1474.
- Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., 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.
- Carlin F, Brillard J, Broussole V, Clavel T, Duport C, Jobin M, Guinebretière MH, Auger S, Sorokine A, Nguyen-Thé C.** 2009. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Res Inter*, **43**: 1885-1894.
- Carlson CR, Caugant DA, Kolsto AB.** 1994. Genotypic Diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains. *Appl Environ Microbiol*, **60**: 1719-1725.
- Choma C, Granum PE.** 2002. The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. *FEMS Microbiol Lett*, **217**: 115-119.
- Cherif A, Brusetti L, Borin S, Rizzi A, Boudabous A, Khyami-Horani H, Daffonchio D.** 2003. Genetic relationship in the *Bacillus cereus* group by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. *J Appl Microbiol*, **94**, 1108-1119.
- Christiansson A, Bertilsson J, Svensson B.** 1999. *Bacillus cereus* Spores in Raw Milk: Factors Affecting the Contamination of Milk During the Grazing Period. *J Dairy Sci*, **82**: 305-314.

- Declerck N, Bouillaut L, Chaix D, Rugani N, Slamti L, Hoh F, Lereclus D, Arold ST.** 2007. Structure of PlcR: insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Grampositive bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**: 18490-18495.
- Delbrassinne L, Andjelkovic M, Botteldoorn N, Mahillon J, and Van Loco J.** 2009. Isolation of the *Bacillus cereus* emetic toxin from different growth media and identification by LC-MS. *Proceedings of the Fourteenth Food Microbiology Conference. Liege, Belgium*.
- Dierick K, Coillie EV, Swiecicka I, Meyfroidt G, Devlieger H, Meulemans A, Hoedemaekers, G, Fourie L, Heyndrickx M, Mahillon J.** 2005. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus* associated food poisoning. *J Clin Microbiol*, **43**: 4277-4279.
- Diego H Sauka DH and Benintende GB.** 2008. *Bacillus thuringiensis*: general aspects. An approach to its use in the biological control of lepidopteran insects behaving as agricultural pests. *Rev Argent Microbiol*, **40**: 124-40.
- Di Franco C, Beccari E, Santini T, Pisaneschi G, Tecce1 G.** 2002. Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*. *BMC Microbiol*, **2**: 1-15.
- Dromigny,** 2008. *Bacillus cereus*. In: Larpent JP. M. (ed), Tec & Doc Lavoisier, Paris, PP. 105-107.
- EFSA.** 2005. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp* in food. *The EFSA J*, **175**: 1-48.
- El-banna AA.** 2009. Bacterial food intoxication: an overview. *Alex. J. Fd. Sci. Technol*, **6** : 3-43.

- 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**: 479-487.
- 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**: 189-195.
- Ehling-Schulz M, Vukov N, Schulz A, Shaheen R, Andersson M, Märklbauer E Scherer S.** 2005a. Identification and Partial Characterization of the Nonribosomal Peptide Synthetase Gene Responsible for Cereulide Production in Emetic *Bacillus cereus*. *Applied and Environ Microbiol*, **71**: 105-113.
- Ehling-Schulz M, Svensson B, Guinebretière MH, Lindbäck T, Andersson M, Schulz A, Fricker M, Christiansson A, Granum PE, Märklbauer E, Nguyen-The C, Salkinoja-Salonen M, Scherer S.** 2005b. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiol*, **151**: 183-197.
- Ekman J, Kruglov A, Andersson MA, Raulio M, Salkinoja-Salonen M.** 2009. *Bacillus cereus* food poisoning toxin cereulide induces biofilm formation in *Bacillus cereus*. Unpublished results.
- Fagerlund A, Lindbäck T, Storset AK, Granum PE, Hardy SP.** 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. *Microbiol*, **154**: 693-704.
- Fagerlund A, Brillard J, Fürst R, Guinebretière MH, Granum PE.** 2007. Toxin production in a rare and genetically remote

- cluster of strains of the *Bacillus cereus* group. *BMC Microbiol*, **7**: 43.
- Feitelson JS, Payne J, Kim L.** *Bacillus thuringiensis*, insects and beyond.1992. *Biotechnol*, **10**: 271-575.
- Finlay WJJ, Logan NA Sutherland AD.** 2000. *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. *Lett Appl Microbiol*, **31**: 385-389.
- Finlay WJJ, Logan NA, Sutherland AD.** 2002. *Bacillus cereus* emetic toxin production in cooked rice. *J. Food Microbiol*, **19**: 431-439.
- Fricke M, Messelhäuser U, Busch U, Scherer S, Ehling-Schulz M.** 2007. Diagnostic Real-Time PCR Assays for the Detection of Emetic *Bacillus cereus* Strains in Foods and Recent Food-Borne Outbreaks. *Appl Environ Microbiol*, **73**: 1892-1898.
- Gilbert RJ. and Parry JM.** 1977. Serotypes of *Bacillus cereus* from outbreaks of food poisoning and from routine foods. *J Hygiene*, **78**: 69-74.
- Gonzalez JM, JR, Brown BJ, Carlton BC.** 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **79**: 6951-6955.
- Gohar M, Faegri K, Perchat S, Ravnum S, Økstad O, Gominet M, Kolstø AB, Lereclus D.** 2008. The PlcR Virulence Regulon of *Bacillus cereus*, *PLoS ONE*, **3**: 2793.
- Gould F.** 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu. Rev. Entomol*, **43**: 701-726.

- Granum, P.E.** 2007. *Bacillus cereus*. In: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 3rd Ed. Edited by Doyle M. and Beuchat L., ASM Press, Washington D.C. 445-456.
- Granum E, Lund T.** 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins, a Mini Review, *FEMS Microbiol Lett*, **157**: 223-228.
- Griffiths MW, Schraft H.** 2002. *Bacillus cereus* food poisoning. In *Foodborne diseases* edited by Clicer D. O. and Riemann H. P. Academic press, California USA 261-270.
- Guetsky R, Shtienberg D, Elad Y, Dinoor A.** 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathol*, **91**: 621-627.
- Guinebretière MH, Thompson FL, Sorokin A, Normand P, Dawyndt P, Ehling-Schulz M, Svensson B, Sanchis V, Nguyen-The C, Heyndrickx M, De Vos P.** 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ Microbiol* **10**: 851-65.
- Guinebretiere MH, Fagerlund A, Granum E, Nguyen-The C.** 2006. Rapid discrimination of cytk-1 and cytk-2 genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system, *FEMS Microbiol Lett*, **259**: 74-80.
- Häggbloom MM, Apetroaie C, Andersson MA, Salkinoja-Salonen MS.** 2002. Quantitative Analysis of Cereulide, the Emetic Toxin of *Bacillus cereus*, produced under Various Conditions. *Applied and Environ Microbiol*, **68**: 2479-2483.
- Hardy SP, Lund T, Granum PE.** 2001. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia, *FEMS Microbiol Lett*, **197**: 47-71.

- Hauge S**, Food poisoning caused by aerobic spore forming bacilli, *J Appl Bacteriol*, **18**: 591- 595.
- Helgason E, Tourasse NJ, Meistal R, Caugnant DA, Kolstø AB.** 2004. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group, *Appl Environ Microbiol*, **70**: 191-201.
- Helgason E, Caugant D, Lecadet MM, Chen Y, Mahillon J, Lovgren A, Hegna I, Kvaloy K, Kolsto AB**, 1998. Genetic diversity of *Bacillus cereus* / *B. thuringiensis* isolates from natural sources. *Curr Microbiol*, **37**: 80-87.
- Helgason E, Okstad, OA, Caugant DA, Johansen H A, Fouet A, Mock M, Hegna I, Kolsto AB.** 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*--one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol*, **66**: 2627-2630.
- Hill KK, Ticknor LO, Okinaka RT, et al.** 2004. Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of **Bacillus anthracis**, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol*, **70**: 1068-1080.
- Höfte H and Whiteley HR.** 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, **53**: 242-255.
- Horwood PF, Burgess GW, Oakey HJ.** 2004. Evidence for non-ribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett*, **236**, 319-324.
- Hoton FM, Andrup L, Swiecicka I, Mahillon J.** 2005. The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiol*, **151**: 2121-2124.
- Hoton FM, Fornelos N, N'Guessan E, Hu X, Swiecicka I, Dierick K, et al.,** 2009. Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus*

weihenstephanensis cereulide-producing strains. *Env. Microbiol. Rep*, **1**: 177-183.

Ichikawa K, Gakumazawa M, Inaba A, Shiga K, Takeshita S, Mori M, Kikuchi N. 2009. Acute encephalopathy of *Bacillus cereus* mimicking Reye syndrome. *Brain Dev*, **32**: 688-90

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.

Isobe M, Ishikawa T, Suwan S, Agata N, Ohta M. 1995. Synthesis and activity of cereulide, a cyclic dodecadepsipeptide ionophore as emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Lett*, **5**: 2855-2858.

Jääskeläinen EL, Teplova V, Andersson MA, Andersson LC, Tammela P, Andersson MC, Pirhonen TI, Saris NEL, Vuorela P, SalkinojaSalonen MS. 2003. In vitro assay for human toxicity of cereulide, the emetic mitochondrial toxin produced by food poisoning *B. cereus*. *Toxicology in Vitro*, **17**: 737-744.

Jääskeläinen EL, Häggblom MM, Andersson MA, Salkinoja-Salonen MS. 2004. Atmospheric oxygen and other conditions affecting the production of cereulide by *Bacillus cereus* in food. *Int J Food Microbiol*, **96**: 75-83.

Jackson SG, Goodbrand RB, Ahmed R, Kasatiya S. 1995. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated from Gastroenteritis outbreak investigation. *Letters in Appl Microbiol*, **21**: 103-105.

Jensen GB, Hansen BM, Eilenberg J, Mahillon J. 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ Microbiol* **5**: 631-640.

- Jernigan JA, Stephens DS, Ashford DA, Omenaca C, Topiel MS, Galbraith M. et al.** 2001. Bioterrorism-related inhalational anthrax: the first 10 cases reported in the United States. *Emerg Infect Dis*, **7**: 933-944.
- Jung-Beom K, Jai-Moung K, So-Yeong K, Jong-Hyun K, Yong-Bae P, Na-Jung C, Deog-Hwan O.** 2010. Comparison of Enterotoxin Production and Phenotypic Characteristics between Emetic and Enterotoxic *Bacillus cereus*. *J Food Prot*, **73**: 1219-1224.
- Keim P, Kalif A, Schupp J, et al.** 1997. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *J Bacteriol*, **179**: 818-824.
- Kevany BM, Rasko DA, Thomas MG.** 2009. Characterization of the Complete Zwittermicin A Biosynthesis Gene Cluster from *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, **75**: 1144-1155.
- Kim BS, Lee CS, Yun CY, Yeo SM, Park WM, Kim HR.** 2001. Characterization and immunological analysis of ferritin from the hemolymph of *Galleria mellonella*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, **129**: 501-509.
- Kim HS, Park J, Choi SW, Choi KH, Lee GP, Ban SJ, Lee CH, Kim CS.** 2003. Isolation and Characterization of *Bacillus* Strains for Biological Control. *J Microbiol*, **41**: 196-201.
- Kramer JM, Gilbert JM.** 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Doyle, M.P. (Ed), Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, New York, pp. 21-70.
- Kronstad JW, Schnepf HE, Whiteley HR.** 1983. Diversity of Locations for *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Genes. *J Bacteriol*, **154**: 419-428.

- Krotén MA, Bartoszewicz M, Swiecicka I.** 2010. Cereulide and Valinomycin, Two Important Natural Dodecadeptideptides with Ionophoretic Activities. *Polish J Microbiol*, **59**: 3-10.
- Laloo R, Moonsamy G, Ramchuran S, Görgens J, Gardiner N.** 2010. Competitive exclusion as a mode of action of a novel *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *Lett Appl Microbiol*, **50**: 563-570.
- Lechner S, Mayr R, Francis KP, Pruss BM, Kaplan T, Wiessner-Gunkel E, Stewart GS, Scherer S.** 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol*, **48**: 1373-1382.
- Lereclus D, Agaisse H, Gominet M, Salameitou S, Sanchis V.** 1996. Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *J Bacteriol*, **178**, 2749-2756.
- Lereclus D, Agaisse H, Grandvalet C, Salameitou S, Gominet M.** 2000. Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int J Med Microbiol*, **290**: 295-299.
- Lindbäck T, Fagerlund A, Rødland MS, Granum PE.** 2004. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiol*, **150**: 3959-3967.
- Lopez D, Fischbach M.A, Chu F, Losick R, Kolter R.** 2009. Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *PNAS*, **106**: 280-285.
- Lücking G, Dommel MK, Scherer S, Fouet A, Ehling-Schulz M.** 2009. Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled

by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR. *Microbiol*, **155**: 922-931.

Lund T, De Buyser ML, Granum PE. 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis, *Molecular Microbiol*, **38**: 254-261.

Mahler H, Pasi A, Kramer JM, Schulte P, Scoging AC, Bar W, Krahenbuhl S. 1997. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *N. Engl J Med*, **336**: 1142-1148.

Makarasen A, Yoza K, Isobe M. 2009. Higher Structure of Cereulide, an Emetic Toxin from *Bacillus cereus*, and Special Comparison with Valinomycin, an Antibiotic from *Streptomyces fulvissimus*. *Chem*, **4**: 688-698.

Martin PAW, Travers RS. 1989. Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates. *Appl Environ Microbiol*, **55**: 2437-2442.

Melling J, Capel BJ, Turnbull PCB, Gilbert RJ. 1976. Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*. *J Clin Pathol* **29**: 938-940.

Messelhäusser U, Kämpf P, Fricker M, Ehling-Schulz M, Zucker R, Wagner B, Busch U, Höller C. 2010. Prevalence of Emetic *Bacillus cereus* in Different Ice Creams in Bavaria. *J Food Prot*, **73**: 395-399.

Mikesell P, Ivins BE, Ristoph JD, Dreier TM. 1983. Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* **39**: 371-376.

Michelet N, Mahillon J. 2003. *Bacillus cereus* opportuniste et pathogène. *Bulletin de la société française de microbiologie*, **18** : 113-122.

- Michelet N, Granum PE, Mahillon J.** 2006. *Bacillus cereus* enterotoxins, bi- and tri- component cytolytins, and other hemolysins. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. **46**: 779-790.
- Mock M. and Fouet A.** 2001. Anthrax. *Annu Rev Microbiol* **55**: 647-671.
- Mossel DAA, Koopman MJ, Jongerius E.** 1967. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods, *Appl Microbiol*, **15**: 650-653.
- Nakamura LK.** 1998. *Bacillus pseudomycolides* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 1031-1035.
- Ngamwongsatit P, Buasri W, Pianariyanon P, Pulsrikarn C, Michio Ohba M, Apinya Assavanig A, Watanalai Panbangred W.** 2008. Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *Int J Food Microbiol*, **121** : 352-356.
- Oscáriz J.C, Pisabarro A.G.** 2000. Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *J Appl Microbiol*, **89**: 361-369.
- Paananen A, Mikkola R, Sareneva T, Matikainen S, Andersson M, Julkunen I, Salkinoja-Salonen MS, Timonen T.** 2000. Inhibition of human NK cell function by valinomycin, a toxin from *Streptomyces griseus* in indoor air. *Infect Immun*, **68**:165-9.
- Paananen A, Mikkola R, Sareneva T, Matikainen S, Hess M, Andersson M, Julkunen I, Salkinoja-Salonen MS, Timonen T.** 2002. Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Clin Experiment Immun*, **129**: 420-428.

- Paananen A, Järvinen K, Sareneva T, Salkinoja-Salonen MS, Timonen T, Hölttä E.** 2005. Valinomycin-induced apoptosis of human NK cells is predominantly caspase independent. *Toxicol*, **212**: 37-45.
- Pacova Z, Svec P, Stenfors LP, Vyletelova M, Sedlacek I.** 2003. Isolation of the psychrotolerant species *Bacillus weihenstephanensis* from raw cow's milk. *Czech J Anim Sci*, **48**: 93-96.
- Pandey A, Palni LM, and Bisht D.** 2001. Dominant fungi in the rhizosphere of established tea bushes and their interaction with the dominant bacteria under *in situ* conditions. *Microbiol Res*, **156**: 377-382.
- Pandey A, Palni LMS, Coulomb N.** 1997. Antifungal activity of bacteria isolated from the rhizosphere of established tea bushes. *Microbiol Res*, **152**: 105-112.
- Parker MW, Feil SC.** 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progr Biophys Mol Biol*, **88**: 91-142.
- Pirhonen, T.I., Andersson, M.A., Jääskeläinen, E.L., Salkinoja-Salonen, M.S., Honkanen-Buzalski, T., Johansson, T.M.L.,** 2005. Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food-poisoning case. *Food Microbiol*, **22**, 87-91.
- Pirttijarvi TSM, Andersson MA, Scoging AC, Salkinoja-Salonen MS,** 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**: 133-144.

- Pitchayawasin S, Kuse M, Koga K, Isobe M, Agata N, Ohta M.** 2003. Complexation of cyclic dodecadepsipeptide, cereulide with ammonium salts. *Bioorganic Medicinal Chemistry Lett*, **13**: 3507-3512.
- Phyllis AW, Martin PAW and Travers AS.** 1989. Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates. *Appl Environ Microbiol*, **55**: 2437-2442.
- Posfay-Barbe KM, Schrenzel J, Frey J, Studer R, Korff C, Belli DC et al.** 2008. Food poisoning as a cause of acute liver failure. *Pediatr. Infect Dis, J* **27**: 846-847.
- Pruss BM, Dietrich R, Nibler B, Martlbauer E, Scherer S.** 1999. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol*, **65**: 5436-5442.
- Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Courtens, T., Debevere, J.,** 2005. Antimicrobial effect of nisin and carvacrol and competition between *Bacillus cereus* and *Bacillus circulans* in vacuum-packed potato puree. *Food Microbiol*, **22**: 189-197.
- Rajkovic A, Uyttendaele M, Courtens T, Heyndrickx M, Debevere J.** 2006a. Prevalence and characterisation of *Bacillus cereus* in vacuum packed potato puree *Int J Food Sci Technol*, **41** : 878-884.
- Rajkovic, A., M. Uyttendaele, W. Deley, A. Van Soom, T. Rijsselaere, J. Debevere.** 2006b. Dynamics of boar semen motility inhibition as a semi-quantitative measurement of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide). *J. Microbiol. Methods*. **65**: 525-534.

- Rajkovic A, Uyttendaele M, Debevere J. 2007.** Computer aided boar semen motility analysis for cereulide detection in different food matrices. *Int J Food Microbiol*, **114**: 92-99.
- Rajkovic A, Uyttendaele M, Vermeulen A, Andjelkovic M, Fitz-James I, in't Veld P, Denon Q, Verhe R, Debevere J. 2008.** Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Lett. Appl. Microbiol*, **42**: 103-105.
- Rasko DA, Rosovitz MJ, Økstad OA, Fouts DE, Jiang L, Cer RZ, Kolstø AB, Gill SR, Ravel J. 2007.** Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *J. Bacteriol*. **189**: 52-64.
- Read TD. 2003.** The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature*, **423**: 81-86.
- Reyes-Ramirez A, Ibarra JE. 2005.** Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR analysis. *Appl Environ Microbiol*, **71**: 1346-1355.
- Rocha-Estrada J, Angel E, Aceves-Diez, Guarneros G, Torre M. 2010.** The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, **87**: 913-923.
- Rosenquist H, Smidt L, Anderson RS, Jensen BG, Wilcks A. 2005.** Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FMS Microbiol. Lett*, **250**, 129-136.
- Salamitou S, Ramisse F, Brehelin M, Bourguet D, Gilois N, Gominet M, Hernandez E, Lereclus D. 2000.** The plcR regulon

is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiol*, **146**: 2825-2832.

Salkinoja-Salonen M, Scherer S. 2005b. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiol*, **151**: 183-197.

Sauka DH, Benintende GB. 2008. *Bacillus thuringiensis*: general aspects. An approach to its use in the biological control of lepidopteran insects behaving as agricultural pests. *Rev Argent Microbiol*, **40**:124-40.

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**: 775-806.

Schmidt K (ed). 2001. WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. Seventh report. FAO/WHO Collaborating centre for research and training in food hygiene and zoonoses, Berlin, Germany.

Shaheen R, Andersson M.A, Apetroaie C, Schulz A, Ehling-Schulz M, Ollilainen V-M, Salkinoja-Salonen M.S. 2006. Potential of selected infant food formulas for production of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Int J Food Microbiol*, **107**: 287-294.

Shaheen R, Andersson M.A, Pirhonen T, Jääskeläinen E.L, Svensson B, Nguyen-the C, Salkinoja-Salonen MS. 2009a. *Bacillus cereus* spores and cereulide in food-borne illness. Ph.D. Thesis. University of Helsinki, 63 pp.

Shaheen R, Svensson B, Andersson M.A, Christiansson A, Salkinoja-Salonen M.S. 2009b. Persistence strategies of *Bacillus*

cereus spores isolated from dairy silo tanks. Accepted for publication in *Food Microbiol*, **27**: 347-355.

- Shelton AM, Zhao JZ, Roush RT.** 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of *Bacillus thuringiensis* transgenic plants, *Annu Rev Entomol*, **47**: 845-881.
- Shinagawa K, Konuma H, Sekita H, Sugii S.** 1995. Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the Hep-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*. *Fems Microbiol Lett*, **130**: 87-90.
- Shiota, M., Saitou, K., Mizumoto, H., Matsusaka, M., Agata, N., Nakayama, M., et al.,** 2010. Rapid Detoxification of Cereulide in *Bacillus cereus* Food Poisoning. *J. Am. Aca. Ped*, 125, 951-955.
- Slamti L, Perchat S, Gominet M, Vilas-Boas G, et al.,** 2004. Distinct mutations in PlcR explain why some strains of the *Bacillus cereus* group are nonhemolytic. *J. Bacteriol.* 186, 3531-3538.
- Slamti L, Lereclus D.** 2005. Specificity and Polymorphism of the PlcR-PapR Quorum- Sensing System in the *Bacillus cereus* Group. *J Bacteriol*, **187**:1182-1187.
- Spencer RC.** *Bacillus anthracis*. 2003. *J Clin Pathol*, **56**:182-187.
- Sorokin A, Candelon B, Guilloux K, Galleron N, Wackerow-Kouzova N, Ehrlich S D, Bourguet D, Sanchis V.** 2006. Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 1569-1578.
- Stenfors Arnesen LP, Annette Fagerlund A., Granum PE.** 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev.* **32**: 579-606.

- Stenfors LP, Granum PE. 2001.** Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiol Lett*, **197**: 223-228.
- Sutherland AD, Murdoch R. 1994.** Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus species* in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus sp.* *Int J Food Microbiol*, **21**: 279-292.
- Svensson B, Monthan A, Shaheen R, Andersson MA, Salkinoja-Salonen M, Christiansson A. 2006.** Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. *Int J Food Microbiol*, **16**: 740-749.
- Swiecicka I, Van der Auwera GA, Mahillon J. 2006.** Hemolytic and nonhemolytic enterotoxin genes are broadly distributed among *Bacillus thuringiensis* isolated from wild mammals. *Microbial ecology*, **52**: 544-551.
- Teplova VV, Mikkola R, Tonshin AA, Saris NE, Salkinoja-Salonen MS. 2006.** The higher toxicity of cereulide relative to valinomycin is due to its higher affinity to Potassium at physiological plasma concentration. *Toxicol Appl Pharmacol*, **201**: 39-46.
- Thomas DJ, Morgan JA, Whipps JM, Saunders JR. 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.
- Ticknor LO, Kolsto A B, Hill K K, Keim P, Laker MT, Tonks M, Jackson, PJ. 2001.** Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and

Bacillus thuringiensis Soil Isolates. *Appl Environ Microbiol*, **67**: 4863-4873.

Thorsen L, Hansen BM, Nielsen KF, Hendriksen NB, Phipps RK, Budde BB. 2006. Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide producing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol*, **72**: 5118-5121.

Thorsen L, Budde B, Henrichsen L, Martinussen T, Jakobsen M. 2009a. Cereulide formation by *Bacillus weihenstephanensis* and mesophilic emetic *Bacillus cereus* at temperature abuse depends on pre-incubation conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **134**, 133-139.

Thorsen L, Budde BB, Koch AG, Klingberg TD. 2009b. Effect of modified atmosphere and temperature abuse on the growth from spores and cereulide production of *Bacillus weihenstephanensis* in a cooked chilled meat sausage. *Int J Food Microbiol*, **130** : 172-8.

Turnbull PCB, Kramer J, Jørgensen Gilbert, R.J. and Melling, J. 1979. Properties and production characteristics of vomiting, diarrhoeal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. *American J Clin Nutr*, **32**: 219-228.

Uchida BI, Sekizaki T, Hashimoto K, Terakado N. 1985. Association of the Encapsulation of *Bacillus anthracis* with a 60 Megadalton Plasmid. *J G Microbiol*, **131**: 363-367.

Ueda S and Kuwabara Y. 1993. An ecological study of *Bacillus cereus* in rice crop processing. *J Antibacl Antifung Agents*, **21**: 499-502.

Uehara H, Yoneda Y, Yamane K, Maruo B. 1974. Regulation of neutral protease productivity in *Bacillus subtilis*: transformation of high protease productivity. *J Bacteriol*, **119**: 82-91.

- Vander Auwera G A, Timmery S, Hoton F, Mahillon J.** 2007. Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. *Int. J. Food Microbiol*, **113**:164-172.
- Vassileva M, Torii K, Oshimoto M, Okamoto A, Agata N, Yamada K., et al.** 2007. A new phylogenetic cluster of cereulide-producing *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol*, **45**: 1274-1277.
- Vilain S, Luo Y, Hildreth MB, Brözel VS.** 2006. Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. *Appl Environ Microbiol*, **72**: 4970-4977.
- Vilas-Bôas LA, Vilas-Bôas GFLT, Saridakis HO, Lemos MVE, Lereclus D, Arantes OMN.** 2000. Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm. *FEMS Microbiol Ecol*, **31**: 255-259.
- Vilas-Boas GT, Peruca AP, Arantes OM.** 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol*, **53**: 673-687.
- Wahab T, Hjalmarsson S, Wollin R, Engstrand L.** 2005. Pyrosequencing *Bacillus anthracis*. *Emerg Infect Dis*, **11**: 1527-31.
- Wijnands LM, Dufrenne JB, Rombouts FM, IN'T Veld PH, van Leusden FM.** 2006. Prevalence of Potentially Pathogenic *Bacillus cereus* in Food Commodities in The Netherlands. *J Food Protec*, **69**: 2587-2594.
- Wilson MK, Abergel RJ, Raymond K N, Arceneaux JE, Byers B R.** 2006. Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Biochem Biophys Res Commun*, **348**: 320-325.
- Yabutani M, N. Agata N, Ohta M.** 2009. A new rapid and sensitive detection method for cereulide-producing *Bacillus cereus* using a cleave real-time PCR. *Lett Appl Microbiol*, **48**: 698 – 704.

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.