

Délivré par **Montpellier SupAgro**

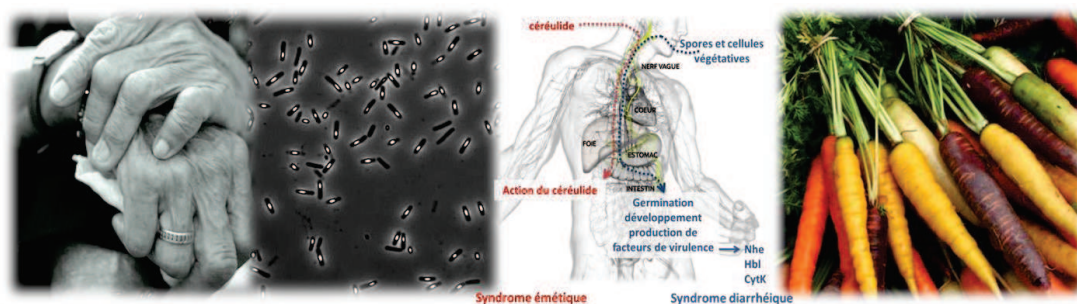
Préparée au sein de l'école doctorale
GAIA

Et de l'unité de recherche
Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA – UMR 408

Spécialité : **Microbiologie**

Présentée par **Alizée Guérin**

**Comportement de la bactérie pathogène
Bacillus cereus dans des aliments prêts à
l'emploi - Impact des conditions physico-
chimiques**



Soutenue le 08 Décembre 2016 devant le jury composé de :

M. Louis COROLLER (MC. Université de Bretagne Occidentale)	Rapporteur
M. Jean-Christophe AUGUSTIN (Prof. Ecole vétérinaire d'Alfort)	Rapporteur
M. Per Einar GRANUM (Prof. NMBU Oslo)	Examinateur
M. Bruno BLONDIN (Prof. Montpellier SupAgro)	Président
Mme. Catherine RENARD (DR. INRA UMR SQPOV)	Examinatrice
M. Christophe NGUYEN-THE (DR. INRA UMR SQPOV)	Directeur de thèse

Délivré par **Montpellier SupAgro**

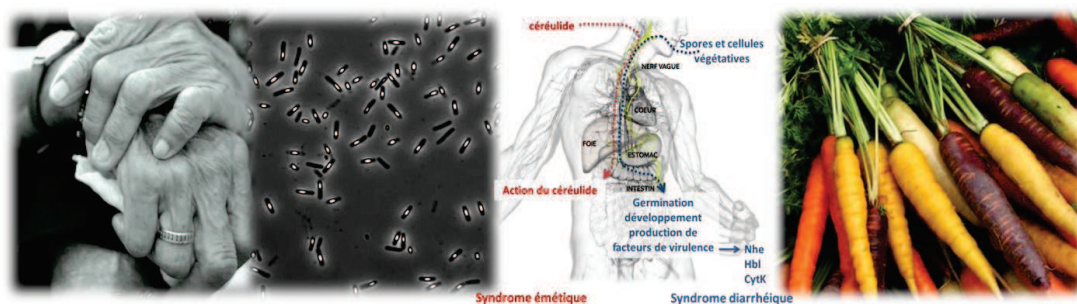
Préparée au sein de l'école doctorale
GAIA

Et de l'unité de recherche
Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA – UMR 408

Spécialité : **Microbiologie**

Présentée par **Alizée Guérin**

**Comportement de la bactérie pathogène
Bacillus cereus dans des aliments prêts à
l'emploi - Impact des conditions physico-
chimiques**



Soutenue le 08 Décembre 2016 devant le jury composé de :

M. Louis COROLLER (MC. Université de Bretagne Occidentale)	Rapporteur
M. Jean-Christophe AUGUSTIN (Prof. Ecole vétérinaire d'Alfort)	Rapporteur
M. Per Einar GRANUM (Prof. NMBU Oslo)	Examinateur
M. Bruno BLONDIN (Prof. Montpellier SupAgro)	Président
Mme. Catherine RENARD (DR. INRA UMR SQPOV)	Examinatrice
M. Christophe NGUYEN-THE (DR. INRA UMR SQPOV)	Directeur de thèse

Résumé

Titre :

Comportement de la bactérie pathogène *Bacillus cereus* dans des aliments prêts à l'emploi - Impact des conditions physico-chimiques

Résumé :

Les personnes âgées sont souvent victimes de dénutrition pouvant conduire à de multiples dégradations de la santé. La prévention de cet état de dénutrition est une des principales préoccupations des autorités de santé. C'est dans cet objectif que le projet OPTIFEL a conçu de nouveaux produits alimentaires optimisés, afin d'améliorer l'alimentation des personnes âgées, en tenant compte de leurs besoins et souhaits, tout en préservant leur sécurité sanitaire. *Bacillus cereus* est une bactérie pathogène sporulée capable de se développer dans des conditions variables comme le froid, l'absence d'oxygène, des bas pH ainsi que des matrices alimentaires diverses. Elle est l'une des principales causes de Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC) surtout en Institut Médico-Sociaux (IMS). Ce travail de thèse avait donc pour objectif de déterminer le comportement de *B. cereus* à différentes étapes de la vie d'un produit alimentaire. La conservation au froid peut permettre la multiplication de souches psychrotolérantes de *B. cereus* qui peuvent alors représenter un risque d'infection pour le consommateur. Les conditions anaérobies réduisent la capacité d'adaptation de *B. cereus* au froid et aux bas pH. La composition de l'aliment et sa préparation influence également le comportement de *B. cereus*, comme nous l'avons constaté avec un bouillon de carotte dans lequel la présence d'oxygène crée un effet létal pour la bactérie. Certaines souches psychrotolérantes de *B. cereus* sont capables de produire de la toxine émétique appelée céréulide. Nous avons montré que cette production peut se faire à partir de 8°C et atteindre des concentrations pouvant causer des intoxications à partir de 10°C. S'il est produit dans l'aliment, le céréulide ne serait pas détruit lors de la préparation de l'aliment. Par contre les cellules végétatives de *B. cereus* sont très thermosensibles et celles qui auraient pu se développer pourront être détruites par un réchauffage du produit avant sa consommation. Ce travail a permis de définir les paramètres importants pour limiter le risque d'infection alimentaire par *B. cereus*.

Mots clefs :

Bacillus cereus, froid, oxygène, pH, carotte, céréulide, thermo-résistance

Abstract

Title :

Behavior of the pathogenic bacterium *Bacillus cereus* in ready for use food - Impact of the physico-chemical conditions

Abstract :

Elderlies are often victims of undernutrition which can lead to multiple health damages. Prevention of this state of undernutrition is one of the main concerns of health authorities. With this objective, the OPTIFEL project designed new optimized foodstuffs, to improve foods for elderlies, by taking into account their needs and wishes, while preserving their safety. *Bacillus cereus* is a spore-forming bacterial pathogen able to grow in various conditions as low temperature, absence of oxygen, low pH and in different types of food. It is one of the main causes of foodborne outbreaks, particularly in socio-medical institutions. The aim of this work was to determine the behavior of *B. cereus* at different steps of the life of the food product. Cold storage can allow multiplication of psychrotolerant *B. cereus* strains that can represent a risk of infection for consumers. Anaerobic conditions reduce the adaptation capacity of *B. cereus* at low temperature and low pH. The composition and the preparation of the food product also influence the behavior of *B. cereus*, as we showed with carrot broth in which oxygen created a lethal effect for the bacterium. Certain psychrotolerant *B. cereus* strains are able to produce an emetic toxin named cereulide. We showed that this production starts at 8 °C and can reach at 10 °C concentrations sufficient to cause intoxications. If this toxin is produced in food, it would not be destroyed during the food preparation. In contrast, vegetative cells of *B. cereus* are very heat-sensitive and those who would have been able to develop could be destroyed by a reheating of the food product before its consumption. This work allowed the identification of important parameters to limit the risk of foodborne disease by *B. cereus*.

Keywords :

Bacillus cereus, cold, oxygen, pH, carrot, cereulide, heat-resistance

Remerciements

Je tiens à remercier Monsieur Louis Coroller et Monsieur Jean-Christophe Augustin, rapporteurs de ce travail ainsi que Monsieur Bruno Blondin d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie également, Monsieur Per Einar Granum pour avoir accepté d'être examinateur dans ce jury de thèse et de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour les analyses de LC-MSMS du céréulide produit par *Bacillus cereus*. Je tiens aussi à remercier Helene Thorsen Rønning pour ces mêmes analyses et pour nos nombreux échanges d'informations et ses remarques qui ont permis de guider ce travail au mieux. Merci également à Monsieur Jacques Mahillon pour avoir accepté de m'envoyer une des souches émétiques qui a servi pour notre étude.

Je tiens à adresser mes remerciements à Monique Zagorec d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et pour ces nombreux conseils. Pour les mêmes raisons, je remercie Jeanne-Marie Membre que j'ai pu croiser régulièrement dans de nombreux congrès à Paris, Athènes, Dublin et avec qui j'ai partagé d'excellentes discussions.

Je souhaite adresser des remerciements particuliers à Madame Catherine Renard, directrice de l'unité SQPOV et aussi du projet européen OPTIFEL dans lequel s'inscrit ma thèse, de m'avoir accordé sa confiance pour mener à bien ce travail. Merci aux membres de ce projet OPTIFEL pour les échanges fort intéressants que nous avons eu pendant les meetings.

Pendant ces trois années passées dans l'unité SQPOV j'ai eu la chance de rencontrer de nombreuses personnes et je tiens remercier tout le monde pour leur apport professionnel et/ou personnel. Je tiens particulièrement à remercier les personnes de l'équipe de microbiologie, enfin maintenant on dit l'équipe « SporAlim ». Je remercie tous les thésards, stagiaires, post doc... que j'ai pu rencontrer comme Aina, une super stagiaire avec toujours le sourire, Hélène avec qui j'ai passé beaucoup de temps en début de thèse, Cécile et Christelle qui seront bientôt maman et avec qui j'ai passé des supers moments, Marina la future thésarde bretonne et bien sur tous les autres aussi, Stéphanie C, Béné, Amina, Gérémy, Loic, Sabine, Caro, Tiffany, Wael, Anna-lena ... Vous avez tous apporter de la bonne humeur, surtout dans cet « open space », ainsi que des réponses à certaines questions scientifiques ou non.

Remerciements

Un grand merci à ma partenaire de laboratoire avec qui j'ai partagé beaucoup de temps, Claire. Je te remercie pour ta gentillesse, ton énergie débordante et ta joie de vivre. J'ai vraiment apprécié de travailler tout ce temps en ta compagnie et j'espère que d'autres auront la même chance que moi de travailler avec toi.

Un énorme merci à Stéphanie O et Mag qui ont toujours été là pour rigoler, pour me remotiver quand le moral était en berne, pour m'écouter quand j'avais besoin d'évacuer, mais également pour s'être occupé de Thésard (le chat) pendant mes déplacements. Un merci particulier à Stéphanie O qui est la première personne vers qui je me tournais en moment de doute ou de joie et qui a toujours répondu présente et merci pour tout, sincèrement.

Merci à Frédéric Carlin avec qui j'ai échangé à de nombreuses reprises quand il essayait, par exemple, de me faire comprendre les statistiques. Merci à Alain pour ses encouragements et pour son soutien. Je tiens à remercier également Marie-Hélène et Luc pour leurs conseils.

Je remercie Véronique Broussolle, qui a toujours été présente et disponible pour m'apporter de nombreux conseils mais également pour me rassurer quand j'étais dans le doute. Merci beaucoup pour ce soutien et la confiance que tu m'accordais pour ce travail, comme dirait Cécile ou Christelle tu es notre « Maman de thèse » et ce rôle te va super bien. Un grand merci aussi à Thierry Clavel qui a toujours été de bon conseil, à l'écoute et disponible quand je pouvais avoir une interrogation. Merci pour ton calme, ton sourire et ton soutien également.

Un grand merci à mon directeur de thèse Christophe Nguyen-the. Vous m'avez accordé votre confiance dans le travail, vous avez toujours su me guider sans m'imposer les choses non plus, vous étiez toujours à l'écoute et d'une incroyable disponibilité malgré votre emploi du temps bien chargé. Vous avez toujours pris du temps pour moi quand j'en sentais le besoin. Je vous remercie vraiment pour tout ce que vous avez pu m'apporter professionnellement mais également personnellement, comme la confiance en moi. Je n'aurais pas souhaité un autre directeur de thèse que vous.

Je tiens à remercier également les personnes de l'équipe Chimie et des Fruits, comme Christian pour ces explications sur la LC-MSMS, Mimi, Pascale, Béa, Éric, Domi, Marielle, Caro, Aurélie, Romain, Carine, Sylvie B, Line, Patrice, David ... Je tiens à remercier Sylvie M de m'avoir gentiment supporté et pour ces moments de franches rigolade tout en prenant

Remerciements

soin que la bonbonnière ne soit jamais à sec (et pour le petit bonhomme bleu !!). Merci aussi à Isabelle dont le sourire, la gentillesse et la joie de vivre sont très agréables à voir.

Une énorme pensée à tous mes amis qui m'ont soutenu et supporté pendant ces trois années. Sandrine qui a toujours été disponible pour un coup de téléphone à n'importe quelle heure et pour tous ces fous rires qui m'ont fait beaucoup de bien. Merci à toute l'équipe de badminton (Mika, Niculus, Ludivine, Sabri, Carrine, Savé, Lolo, David, Jacques, Sabine, Guigui...), pour ces supers moments, soirées et entraînements fort productifs du mercredi soir.

Maintenant je tiens à remercier ma famille qui m'a toujours soutenu et encouragé dans mes choix d'évolution, qui m'a toujours motivé à toujours aller plus loin pour ne rien regretter. Un grand merci à mes grands-parents qui ont été là à chaque instant, surtout au début de mes études à Rennes. Vous avez toujours cru en moi et merci pour ça. Merci également à mon frère et Emma qui m'ont encouragé à distance. Un grand merci à mon beau-père Gérard dont les conseils étaient riches et fort intéressants, merci pour ton soutien et pour ton écoute quand j'en avais besoin.

Un énorme merci à ma Maman sans qui je ne serais pas arrivée jusque-là aujourd'hui. Tu as toujours été là pour moi, tu as toujours tout fait pour que j'évolue et que je réussisse dans les meilleures conditions. Je te dois en grande partie tout mon parcours. Ces trois ans ont été riches en émotions très variées et tu as toujours été là pour les partager avec moi. Ton soutien m'a aidé à avancer chaque jour et à vouloir réussir pour essayer de te rendre, à ma manière, tout ce que tu as fait pour moi. J'espère que toi et Gérard aurez le courage de feuilleter quelques pages de ce manuscrit pour comprendre ce que j'ai pu faire pendant ces années même si nous en parlions de temps en temps.

Pour Finir, un immense merci à l'homme qui m'accompagne chaque jour depuis bientôt quatre ans, Matthieu. Tu m'as soutenu, motivé, encouragé, supporté malgré la distance et ces longues périodes où l'on était séparé. Tu as toujours accompagné mes pensées, ce qui m'a permis d'avoir un peu confiance en moi et en nous. Tu es la personne qui a subi le plus mes humeurs, ma fatigue, mes joies, mes baisses de moral... tous les jours et tu réussissais à me sortir la tête de ma thèse malgré tout. Merci d'avoir toujours été là pour moi.

A ma Maman

La Recherche de la Vérité est la plus noble des occupations, et sa publication, un devoir (Madame de Staël)

Le succès n'est pas final. L'échec n'est pas fatal. C'est le courage de continuer qui compte (Winston Churchill)

Table des matières

Table des figures et tableaux	1
Liste des abréviations.....	4
1. Chapitre 1 : Introduction	8
1.1. Contexte de l'étude	8
1.1.1. Les personnes âgées, une population qui grandit	8
1.1.1.1. Le vieillissement de la population	8
1.1.1.2. Les enjeux alimentaires pour un vieillissement en bonne santé	10
1.1.2. Présentation du projet OPTIFEL	13
1.1.2.1. Enjeux – caractéristique des produits.....	13
1.1.2.2. Risque bactérien possible dans ce type de produit.....	15
1.2. <i>Bacillus cereus</i>	18
1.2.1. Description globale et historique de <i>Bacillus cereus</i>	18
1.2.2. Taxonomie et Phylogénie du groupe <i>Bacillus cereus</i>	19
1.2.3. Caractéristique de <i>Bacillus cereus</i>	22
1.2.3.1. <i>Bacillus cereus</i> dans les aliments.....	22
1.2.3.2. Pouvoir pathogène de <i>Bacillus cereus</i>	24
1.3. Thermo-résistance de <i>Bacillus cereus</i>	28
1.4. Croissance de <i>Bacillus cereus</i> en fonction des conditions environnementales	31
1.4.1. Capacité de croissance de <i>Bacillus cereus</i> au froid.....	31
1.4.2. Capacité de croissance de <i>Bacillus cereus</i> à différents pH	32
1.4.3. Capacité de croissance de <i>Bacillus cereus</i> en anaérobiose	33
1.4.4. Capacité de croissance de <i>Bacillus cereus</i> lors de stress croisés	35
2. Chapitre 2 : Contexte et Objectifs	38
3. Chapitre 3 : Matériels et méthodes	44
3.1. Souches de <i>Bacillus cereus</i>	44
3.2. Milieux de croissance	45
3.2.1. BHI	45
3.2.2. TSB.....	45
3.2.3. PCA	45
3.2.4. TSA	46
3.2.5. LB agar	46

Table des matières

3.2.6.	Bouillon de carotte	46
3.2.7.	Ajout de phosphatidylcholine dans le milieu	47
3.3.	Stock de souches bactériennes à -80 °C	47
3.4.	Préparation des précultures.....	48
3.5.	Cultures en milieu liquide.....	49
3.5.1.	Conditions aérobies	49
3.5.2.	Conditions anaérobies	50
3.6.	Cultures en milieu solide	50
3.7.	Suivi de la croissance	50
3.8.	Extraction de la toxine émétique	51
3.9.	Courbe de calibration.....	52
3.10.	Dosage de la toxine émétique par analyses de LC-MSMS.....	52
3.11.	Détermination de la thermo-résistance de cellules végétatives de <i>B. cereus</i>	53
3.11.1.	Traitement à la chaleur des cellules végétatives de <i>B. cereus</i>	53
3.11.2.	Modélisation des courbes de survie	53
3.12.	Microscopie à contraste de phase et épifluorescence.....	54
3.12.1.	Matériel de microscopie	54
3.12.2.	Observations en contraste de phases	54
3.12.3.	Observation des inclusions lipidiques par coloration au Rouge de Nile.....	54
3.12.4.	Observation de la viabilité des cellules par coloration au Live/dead	55
4.	Chapitre 4 : Effets combinés de l'anaérobiose, des bas pH et des basses températures sur les capacités de croissance des <i>Bacillus cereus</i> psychrotrophes.....	58
4.1.	Introduction	58
4.2.	Résultats et discussion	59
4.3.	Combined effect of anaerobiosis, low pH and cold temperatures on the growth capacities of psychrotrophic <i>Bacillus cereus</i>	61
4.4.	Conclusion	76
5.	Chapitre 5 : Le destin de <i>Bacillus weihenstephanensis</i> dans un bouillon de carotte: impact de la température et de l'oxygène	78
5.1.	Introduction	78
5.2.	Résultats et discussion	79
5.3.	The fate of <i>Bacillus weihenstephanensis</i> in carrot broth: impact of temperature and oxygen	82

Table des matières

5.4. Complementary results	103
5.5. Conclusion	106
6. Chapitre 6 : La production de céréulide par <i>Bacillus weihenstephanensis</i> à différentes températures et pH	108
6.1. Introduction	108
6.2. Résultats et discussion	109
6.3. Cereulide production by <i>Bacillus weihenstephanensis</i> during growth at different temperatures and pH	112
6.4. Conclusion	131
7. Chapitre 7 : Thermo-résistance des cellules végétatives de <i>Bacillus cereus</i> psychrotolerant.....	134
7.1. Introduction	134
7.2. Résultats et discussion	135
7.3. Heat-resistance of psychrotolerant <i>Bacillus cereus</i> vegetative cells	139
7.1. Conclusion	157
8. Chapitre 8 : Discussion et perspectives	160
8.1. Influence des facteurs environnementaux sur les capacités de croissance de souches psychrotolérantes de <i>Bacillus cereus</i>	160
8.2. Croissance de souches psychrotolérantes de <i>Bacillus cereus</i> dans un milieu aliment (bouillon de carotte).....	165
8.3. Capacités de production de céréulide par des souches psychrotolérantes de <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	168
8.4. Thermo-résistance des cellules végétaives de souches psychrotolérantes de <i>Bacillus cereus</i>	171
8.5. Conclusion sur les comportements possibles de <i>Bacillus cereus</i> pendant la vie d'un produit alimentaire.....	174
9. Chapitre 9 : Références bibliographiques	176
10. Chapitre 10 : Valorisations des travaux	196
10.1. Publication acceptée.....	196
10.2. Publications soumises et en preparations.....	196
10.3. Communications orales.....	196
10.4. Posters	197

Liste des figures et tableaux

Chapitre 1

Figure 1 : Evolution de l'indice conjoncturel de fécondité entre 1936 et 2006 en France (p 8)

Figure 2 : Pyramide des âges dans le Monde, en Europe et en France, en 2016 et 2050 (p9)

Figure 3 : La spirale de la dénutrition d'après le docteur Monique Ferry (p 11)

Figure 4 : Partenaires du projet OPTIFEL (p 13)

Figure 5 : Proportion des TIAC déclarées en fonction du lieu de repas en France de 1996 à 2014 (p 16)

Figure 6 : Proportion des TIAC déclarées en fonction de l'agent pathogène en France de 1996 à 2014 (p 18)

Figure 7 : *Bacillus cereus* en microscopie à contraste de phase (p 20)

Tableau 1 : Groupes phylogénétiques de *Bacillus cereus* (p 21)

Figure 8 : Distribution des types de produits alimentaires impliqués dans des intoxications causées par les toxines de *Bacillus cereus* en Europe entre 2009 et 2012 (p 23)

Figure 9 : Schéma représentant les deux types d'intoxication possibles par *Bacillus cereus* (p 25)

Figure 10 : Structure du céréulide (p 26)

Figure 11 : Thermo-résistance des spores de *Bacillus cereus* (p 29)

Tableau 2 : Moyennes et classement des valeurs de $T_{\log D=0.8}$ et des valeurs de z pour les spores des différents groupes phylogénétique de *Bacillus cereus* (p 30)

Tableau 3 : Paramètres des taux de croissance et des températures de souches de *Bacillus cereus* (p 31)

Tableau 4 : Paramètres des taux de croissance et des valeurs de pH de souches de *Bacillus cereus* (p 32)

Tableau 5 : Effet du pH sur la croissance de souches de *Bacillus cereus* appartenant aux différents groupes phylogénétiques (p 33)

Figure 12 : Capacité de croissance d'une souche psychrotrophe de *Bacillus cereus* en fonction de la présence d'oxygène dans des purées de légumes (p 34)

Chapitre 2

Figure 1 : Bilan des comportements possible de *Bacillus cereus* lors de la vie du produit alimentaire (p 41)

Chapitre 3

Figure 1 : $^{13}\text{C}_6$ -cereulide (p 52)

Chapitre 4

Figure 1 : Croissance de *Bacillus cereus* KBAB4 à 10 °C en fonction du type de préculture (p 66)

Tableau 1 : Paramètres de croissance de *Bacillus cereus* KBAB4 et ADRIA I21 cultivées en BHI à 8 et 10 °C et à différents pH (p 68)

Figure 2 : Cinétique de croissance de *Bacillus cereus* KBAB4 dans différentes conditions de culture (p 69)

Figure 3 : Cinétique de croissance de *Bacillus cereus* ADRIA I21 dans différentes conditions de culture (p 70)

Chapitre 5

Tableau 1 : Chute de la population de *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 suite à l'inoculation dans du bouillon de carotte tyndallisé en présence d'oxygène (p 88)

Figure 1 : Croissance de *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 en bouillon de carotte (p 89)

Figure 2 : Croissance de *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 en bouillon de carotte suite à une inoculation avec des spores (p 90)

Figure 3 : Observation en microscopie à contraste de phase de cellules de *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 cultivées en bouillon de carotte (p 91)

Figure 4 : Observation en microscopie à contraste de phase et en fluorescence suite à une coloration au Rouge de Nile et Live/dead de *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 cultivé en bouillon de carotte (p 93)

Figure 5 : Observation en microscopie à contraste de phase de cellules de *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 en fonction du type de préparation du bouillon de carotte (p 104)

Chapitre 6

Figure 1 : Croissance et production de céréulide de *Bacillus weihenstephanensis* BtB2-4 and MC67 en fonction des températures de culture sur boîtes de PCA (p 121)

Figure 2 : Croissance et production de céréulide de *Bacillus weihenstephanensis* BtB2-4 and MC67 sur boîtes de TSA (p 122)

Figure 3 : Croissance et production de céréulide de *Bacillus weihenstephanensis* BtB2-4 and MC67 en fonction des valeurs de pH de culture sur boîtes de PCA (p 123)

Chapitre 7

Figure 1 : Thermo-résistance des cellules végétatives de *Bacillus cereus* cultivées à température optimale (p 146)

Figure 2 : Thermo-résistance des cellules végétatives de *Bacillus cereus* KBAB4 cultivées à 8 °C (p 147)

Tableau 1 : Valeurs δ (min) des cellules végétatives des souches de *Bacillus cereus* chauffées à différentes températures (p 148)

Tableau 2 : Valeurs de z (°C) et $T_{\delta=1}$ (°C) des cellules végétatives des souches de *Bacillus cereus* (p 149)

Chapitre 8

Tableau 1 : Données de la littérature scientifique et notre étude sur la croissance *Bacillus cereus* et l'absence de croissance en fonction de la température et du pH en anaérobiose (A) et en anaérobiose (B) (p 164)

Figure 2 : Ajustement de la réduction via un modèle d'inactivation avec des données expérimentales en microonde et en bain marie (p 172)

Figure 3 : Bilan des conditions d'environnement à prendre en compte lors de la vie du produit afin de limiter le risque de toxiinfection par *Bacillus cereus* (p 173)

Liste des abréviations

AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARS : Agence régionale de santé

BHI : Brain heart Infusion

bpm : battement par minute

CNA : Conseil National de l'Alimentation

crl : céréulide

CytK : Cytotoxine K

D : Death

Da : Dalton

Ddass : Directions départementales des affaires sanitaires et sociales

DD(CS)PP : Direction Départementale de la protection des populations

DLC : Date Limite de Consommation

DO/OD : Densité Optique

EFSA : European Food Safety Authority

EG : Erratic Growth

EU : Europe

Hbl : Hémolysine BL

HCl : Acide chloridrique

HD : High Decline

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

IMS : Institut Médico-Social

INED : Institut national d'études démographiques

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

INSEE : Institut national de la statistique et des études économiques

Liste des abréviations

INVS : Institut de Veille Sanitaire

LB : Luria Bertani

LC-MSMS : Chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse

LD : Low Decline

MNA : Mini Nutritional Assessment

N : population bactérienne (UFC/ml)

N₀ : population bactérienne initiale (UFC/ml)

NaCl : Chlorure de sodium

N_{max} : Population bactérienne maximale (UFC/ml)

Nhe : Non hémolytic enterotoxin

NT/nt : Not Tested

OMS : Organisation mondiale de la Santé

ONU : Organisation des Nations Unies

OPTIFEL : Optimised Food Products for Elderly Populations

p* : Paramètre définissant la forme de la courbe de survie

PBS : Tampon phosphate salin

PC : Phosphatidylcholine

PCA : Plate Count Agar

pH : potentiel d'hydrogène

PHB : parahydroxybutirate

PNNS : Programme National Nutrition et Santé

REFPEDs : Refrigerated Processed Foods of Extended Durability

RPM : Rotation par minute

S : Survival

t : Temps

T : Température

t_{-6log(T)} : Temps pour avoir une réduction de 6 log₁₀ UFC/ml à une température donnée

Liste des abréviations

$T_{\delta=1}$: Température à laquelle δ est égale à 1 min

$T_{\log D=0.8}$: Température à laquelle $\log D$ est égale à 0.8 min

TIAC : Toxi-infection alimentaire collective

TSA : Tryptic Soy Agar

TSB : Tryptic Soy Broth

UFC/CFU : Unité Formant Colonie

$\mu_{\max}$: taux de croissance (h^{-1})

z : Valeur de l'augmentation de température nécessaire pour réduire d'un facteur 10 δ

δ : Temps de la première réduction d'un facteur 10 de la population bactérienne

**Chapitre 1 :
Introduction**

1. Chapitre 1 : Introduction

1.1. Contexte de l'étude

1.1.1. Les personnes âgées, une population qui grandit

1.1.1.1. Le vieillissement de la population

Le vieillissement de la population et l'augmentation de la longévité de l'être humain dans le monde est largement admis. « D'ici à 2050, les personnes âgées seront deux fois plus nombreuses que les enfants dans les pays développés et il est prévu que leur nombre double dans les pays en voie de développement. Cette tendance va retentir en profondeur sur les pays et les individus. » (Message du Secrétaire général de l'ONU, journée 2013).

Après la Seconde Guerre mondiale, le taux de mortalité a baissé et le taux de natalité a largement augmenté entre 1945 et 1975 (Baby-Boom). Suite à l'après-guerre le taux de fécondité en France a été compris entre 2,6 et 3 enfants par femme puis à partir de 1965 ce taux a diminué (Daguet, 1996; Le Bras, 2011) (Fig 1). Ce phénomène de Baby-boom a occasionné un effet en « V » de la population, il y a eu un retardement du vieillissement en augmentant les tranches d'âge active puis par la suite une ré-accélération du vieillissement à partir de 2006 (Blanchet and Le Gallo, 2013; Insee, 2011).

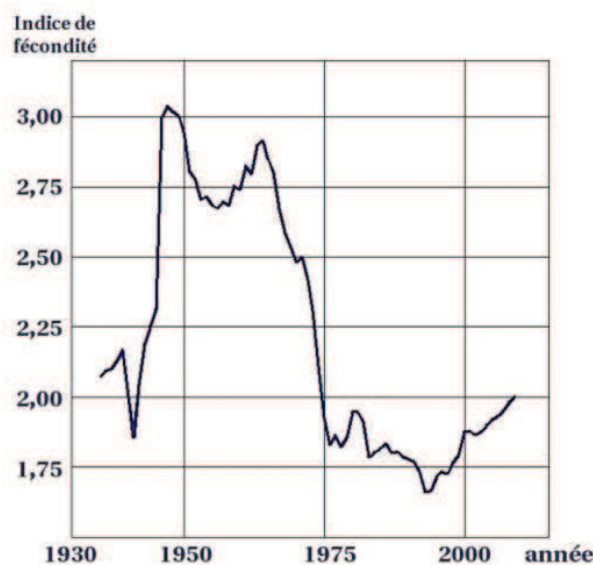


Figure 1 : Evolution de l'indice conjoncturel de fécondité entre 1936 et 2006 en France (Le Bras, 2011)

En 2050 la population mondiale sera de 9,6 milliards personnes soit 2,2 milliards de plus qu'aujourd'hui (2016) ce qui signifie une augmentation d'environ 23 % (Ined; ONU, 2013) (Fig 2). La population française augmentera également d'environ 10 % (Ined) (Fig 2). Par contre la population européenne tendra, d'après les projections démographiques à augmenter jusqu'aux alentours de 2040 puis diminuer pour se stabiliser par la suite (Ined; Insee, 2011) (Fig 2). En 2050, une personne sur trois aurait 60 ans ou plus. Ce vieillissement de la population est dû à plusieurs facteurs. L'allongement de l'espérance de vie, une fécondité qui a baissé suite au phénomène de Baby-boom jusqu'à un seuil inférieur à celui qui précédait cette période et les « Baby-boomeurs » arrivent dans cette classe d'âge de 60 ans et plus (Blanchet and Le Gallo, 2013; Le Bras, 2011; Robert-Bobée, 2006). D'après l'ONU, la proportion de cette classe d'âge devrait doubler dans le monde passant de 10 à 22 % de l'année 2000 à 2050.

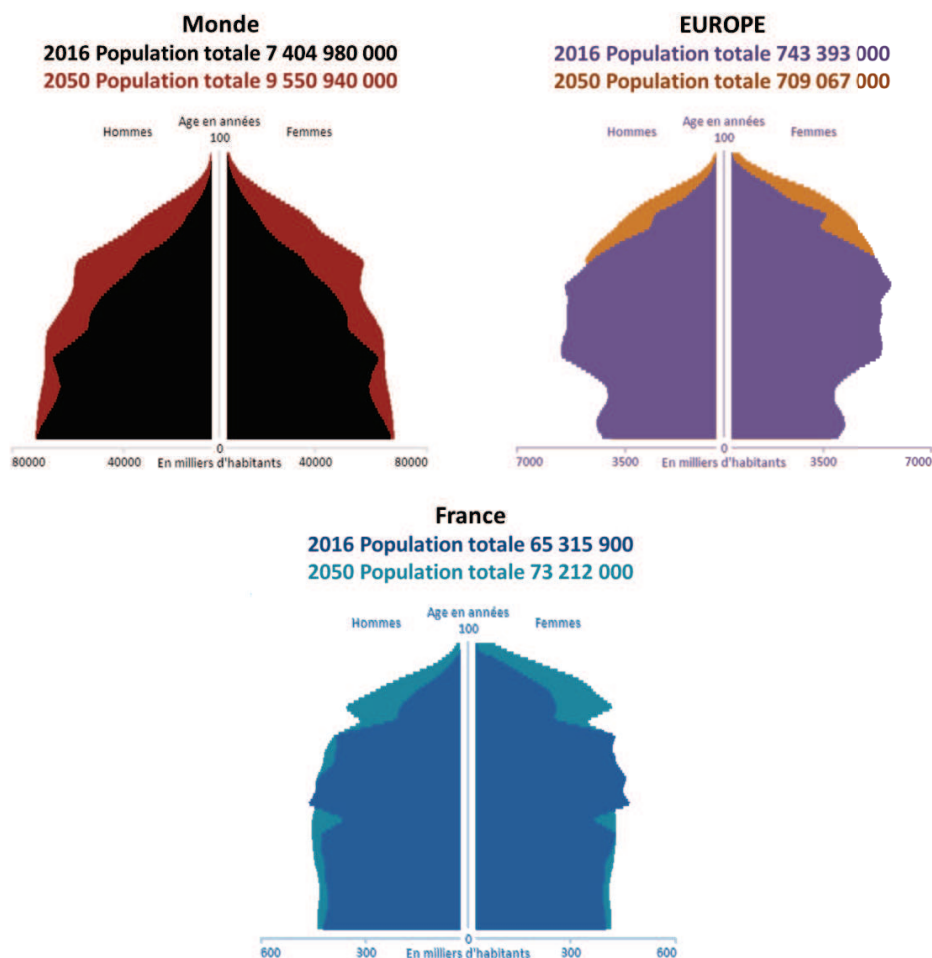


Figure 2 : Pyramide des âges dans le Monde, en Europe et en France, en 2016 et 2050 (Ined)

Ce vieillissement de la population reflète également des améliorations de la santé et des conditions de vie (ONU). Cependant l'état de santé de ces personnes âgées reste variable avec des problématiques plus ou moins importantes selon la région.

La capacité à « bien vieillir » va dépendre de nombreux facteurs. Le système biologique d'une personne se développe jusqu'à l'âge adulte puis décline naturellement par la suite. Ce déclin peut être influencé par de l'exercice physique, par l'exposition aux risques sanitaires (tabac, alcool, substance toxique...) ainsi que par l'environnement et l'alimentation. Certains individus de 80 ans peuvent posséder des capacités mentales et physiques comparables à une personne de 20 ans et d'autres voient leurs capacités diminuer alors qu'ils sont plus jeune (OMS). D'après l'OMS la perte d'autonomie chez les personnes âgées devrait être multipliée par quatre d'ici 2050. Le maintien à domicile de ces personnes âgées s'accompagne de plus en plus de soins et d'aménagement du domicile. Lorsque les limites au niveau de l'habitat et de l'entourage ne peuvent plus répondre aux besoins, le placement en établissement spécialisé s'impose. Les systèmes de santé s'adaptent de plus en plus à la prise en charge des besoins des personnes âgées afin d'essayer de préserver au maximum les capacités restantes de ces personnes au fur et à mesure que celles-ci prennent de l'âge (OMS). Le « vieillir en bonne santé » et l'autonomie des personnes âgées sont des objectifs importants de notre société. Une bonne santé passe souvent par une bonne alimentation. La qualité de l'alimentation tout au long de la vie a une grande influence sur le processus du « bien vieillir ».

1.1.1.2. Les enjeux alimentaires pour un vieillissement en bonne santé

Le vieillissement n'est pas une pathologie mais il fait naître des besoins et des risques spécifiques souvent liés à l'alimentation (CNA, 2005). Quatre facteurs de fragilité pour les personnes âgées peuvent être à l'origine d'hospitalisation ou d'une entrée en établissement spécialisé. Le premier de ces facteurs est la dénutrition qui est le problème majeur chez les personnes âgées. Il y a aussi la dépression, l'iatrogénie médicamenteuse qui correspond aux effets néfastes provoqués par les médicaments qui peuvent survenir du médicament lui-même, d'une erreur de prise de médicament, d'une interaction entre différents médicaments... (Maladie, 2010). Le quatrième facteur correspond aux chutes répétées conduisant à de multiples fractures ou autres conséquences plus importantes chez les personnes âgées. La dénutrition chez les personnes âgées peut conduire à de multiples dégradations de la santé:

amaigrissement, anorexie, déficit immunitaire, infections urinaires et pulmonaires, troubles psychiques, iatrogénie médicamenteuse, chutes, escarres jusqu'à arriver à un état grabataire (CNA, 2005; Ministère de l'agriculture) (Fig 3). Ceci nous permet de comprendre l'importance de la prévention de cette état de dénutrition et le fait que cela soit une des principales préoccupations des autorités de santé en ce qui concerne l'alimentation des personnes âgées (CNA, 2005).

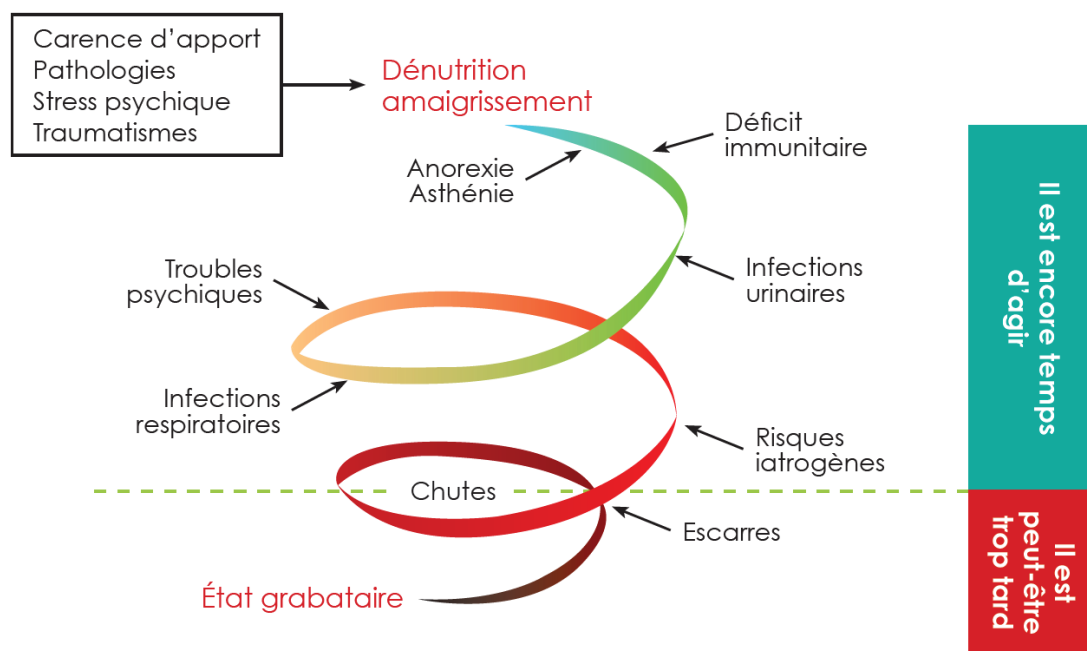


Figure 3 : La spirale de la dénutrition d'après le docteur Monique Ferry (Ministère de l'agriculture)

Le vieillissement amène à une réduction des apports alimentaires souvent dû à une sensation de satiété précoce chez les personnes âgées ainsi qu'à des troubles nutritionnels pouvant être le résultat de maladies antérieures. Pourtant les besoins nutritionnels des personnes âgées sont similaires à ceux d'un jeune adulte (AFSSA, 2009). La dénutrition représente un critère important concernant la fragilité. Une personne âgée est dite fragile si elle a un risque important de morbidité, de dépendance fonctionnelle, d'hospitalisation, d'entrée en institution ou de mortalité (AFSSA, 2009). Les facteurs de risque de dénutrition sont répertoriés dans un questionnaire « Mini Nutritional Assessment » (MNA) qui est l'outil

recommandé pour le dépistage de la dénutrition chez la personne âgée dans le cadre du Programme National Nutrition et Santé (PNNS) ainsi que le calcul annuel de l'IMC et un contrôle de poids mensuel (AFSSA, 2009; CNA, 2005; Ministère de l'Agriculture). Le suivi de l'IMC pour toute personne hospitalisée est un indicateur qualité obligatoire suite aux recommandations de la Haute Autorité de Santé.

La dénutrition peut être due à des carences en nutriments (vitamines et oligoéléments) et à une malnutrition protéino-énergétique (CNA, 2005). Par exemple, les besoins protéiques estimés pour une personne âgée en bonne santé sont d'environ 1 g/kg/j et pour une personne âgée fragile entre 1 et 1,3 g/kg/j (AFSSA, 2009). Lors du constat d'un état de dénutrition, il est donc nécessaire de supplémenter l'alimentation en vitamines et protéines. L'enrichissement des aliments permet donc d'augmenter les apports énergétiques et protéiques sans avoir une augmentation des portions alimentaires des personnes âgées (Ministère de l'agriculture). La dénutrition peut être, par exemple, une des conséquences de la maladie d'Alzheimer ainsi que la perte de poids, ce qui peut aggraver la maladie. La mise en place d'une amélioration de l'alimentation avec ou non une supplémentation nutritionnelle (vitamines, protéines, caroténoïdes...) peut permettre de limiter cet état de dénutrition chez ces patients et une reprise de poids (AFSSA, 2009). Une attention particulière vis-à-vis des apports alimentaires nécessaires pour répondre aux besoins de la personne âgée permet également de limiter les risques d'apparition d'escarres (lésion tissulaire d'origine ischémique, due à la compression des tissus sous-cutanés entre les proéminences osseuses et le plan d'appui) ainsi que d'infections broncho-pulmonaires et urinaire ou encore de fractures. La fracture la plus souvent associée à un état de dénutrition est la fracture de l'extrémité supérieure du col du fémur (AFSSA, 2009).

Le moment des repas correspond à un moment privilégié et essentiel de plaisir, de sociabilité et convivialité pour les personnes âgées en particulier pour celles résidant en établissement d'hébergement. L'alimentation répond non seulement aux besoins physiologiques mais apporte aussi une sensation de plaisir et de bien-être au corps (Divert et al., 2015; Ministère de l'agriculture). Favoriser les plaisirs de la table doit donc être une des préoccupations permanentes des gens qui sont concernés par l'alimentation des personnes âgées (CNA, 2005). « La capacité à prendre du plaisir reste intacte, c'est le plaisir pris au repas qui chute dès lors qu'il est considéré comme subi » (Ministère de l'agriculture). Le

manque de prise de plaisir pendant les repas peut aussi conduire à la dénutrition de la personne.

L'alimentation doit donc être étudiée et contrôlée afin que les apports nutritionnels soient suffisants, que sa texture et sa présentation soient adaptées aux différentes capacités physiques, et qu'elle respecte les choix de vie et d'habitudes alimentaires des personnes âgées afin de maintenir cette notion de plaisir.

1.1.2. Présentation du projet OPTIFEL

1.1.2.1. Enjeux – caractéristique des produits

Le projet OPTIFEL « Optimised Food Products for Elderly Populations » est un projet européen coordonné par Catherine Renard de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) (<http://www.optifel.eu/fr>). Ce projet a pour principale conviction l'amélioration de l'alimentation des personnes âgées en identifiant les besoins et les souhaits de ces personnes pour pouvoir élaborer et valider des produits alimentaires optimisés. Ce projet OPTIFEL se déroule sur une durée de 3 ans et demi (2013-2017) avec un soutien financier de 3 millions d'euros du 7^{ème} programme cadre de recherche et développement de l'Union européenne. Vingt-six partenaires européens participent à ce projet (Fig 4).



Figure 4 : Origine géographique des partenaires du projet OPTIFEL

Chapitre 1 : Introduction

Parmi ces partenaires il y a des institutions publiques et privées incluant des industriels, dont des PME :

- Institut national de la recherche agronomique (INRA) – France
- Centre hospitalo-universitaire de Dijon (CHUD) – France
- Institut Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA) – Espagne
- Instytut Ogrodnictwa (IO) – Pologne
- MedicalUniversity of Lodz (MUL) – Pologne
- University of Leeds (UL) – Royaume-Uni
- Wageningen University and Research Centre (WUR) – Les Pays-Bas
- Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften (ZHAW) – Suisse
- AiledenBiri (AB) – Turquie
- Casa Mas (CM) – Espagne
- Centiv GmbH (Centiv) – Allemagne
- Centre technique de la conservation des produits agricoles (CTCPA) – France
- Christian Potier S.A (CP) – France
- QuantisSarl (Quantis) – Suisse
- Ecole Supérieure d’Agriculture (ESA) – France
- Fundació Alícia (Alícia) – Espagne
- PolskaRóża (POLROZ) – Pologne
- Emporhotel (EH) – Espagne
- Roquette (ROQ) – France
- Seb (Seb) – France
- SAS Plastiques RG (PLASTIQUES RG) – France
- Natural Resources Institute Finland (LUKE) – Finlande
- Inra Transfert (IT) – France
- CCAS – Les Jardins d’Adoyra (JA) – France
- ARCADIA International (AI) – Belgique
- NutriMarketing – France
- HAMK University of Applied Sciences (HAMK) – Finlande

Ce projet a pour ambition de définir et proposer des produits alimentaires principalement à base de fruits et légumes pour une meilleure alimentation et un plus grand plaisir alimentaire des personnes âgées. Les fruits et légumes ont été choisis principalement car ils permettent d'offrir une grande variété de goûts, de couleurs et de textures, mais ils font surtout partie du répertoire alimentaire des personnes âgées. L'intérêt nutritionnel des produits est optimisé par des ajouts de protéines de pois et de blé, de vitamines et de minéraux, mais surtout par le goût et la texture pour qu'ils puissent être consommés facilement et avec un maximum de plaisir et d'appétit. La gamme des produits proposés par le projet OPTIFEL résulte ainsi d'une sélection opérée par plusieurs étapes d'évaluation sensorielle.

Suite à des premières études menées par les partenaires de ce projet OPTIFEL, auprès de 420 personnes âgées, des préférences entre différents fruits et légumes ont été décrites. Le fruit et le légume qui en sont ressortis sont la pomme et la carotte. Ces fruits et légumes ont donc été naturellement choisis pour être les principaux composants de futurs produits alimentaires conçus lors de ce projet. Les produits choisis sont destinés à être sous forme de purées, de soupes, etc. Ceci permet également d'obtenir des produits adaptés pour les personnes âgées ayant des difficultés à se nourrir pour cause de perte de capacité de mastications (aliments hachés/mixés en établissement d'hébergement). Suivant les produits, les procédés de stabilisation testés dans le projet OPTIFEL étaient la stérilisation, les hautes pressions hydrostatiques et la pasteurisation. Concernant les purées, les premières évaluations sensorielles ont montré l'intérêt d'un traitement de pasteurisation le plus doux possible, ce qui nécessite une conservation au froid. D'autres facteurs sont également pris en compte comme l'existence d'un emballage approprié, le coût environnemental et une grande attention est portée à la sécurité microbiologique de ces produits alimentaires.

1.1.2.2. Risque bactérien possible dans ce type de produit

Les personnes âgées sont des personnes pouvant être plus facilement sujettes à des toxi-infections alimentaires, du fait d'un affaiblissement dû à une malnutrition ou de certaines maladies.

Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est définie comme l'apparition d'au moins deux cas groupés et similaires d'une symptomatologie, en générale gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire (Delmas *et al.*, 2010). En

France, la surveillance des TIAC est assurée par l'Institut de veille sanitaire (INVS, regroupé avec d'autres organismes dans « Santé Publique France » depuis 2016) par le biais de la déclaration obligatoire. Ces déclarations permettent aux médecins inspecteurs de la santé publique des Directions départementales des affaires sanitaires et sociales (Ddass) de réaliser une enquête épidémiologique dans le but d'identifier les aliments responsables et les facteurs favorisants afin de mettre en place des mesures adaptées pour prévenir les récurrences (ANSES, 2016; Delmas *et al.*, 2010). Une TIAC est le plus souvent liée à l'utilisation de matière première contaminée, au non-respect des conditions d'hygiène et des températures pendant le stockage et la préparation des produits alimentaires (chaîne du froid et du chaud) et à la non maîtrise des contaminations croisées pendant la manipulation des aliments (ANSES, 2016). L'origine de ces TIAC est souvent la restauration collective, restaurant ou encore des restaurations sociales comme les cantines ou les centres médico-sociaux (Fig 5).

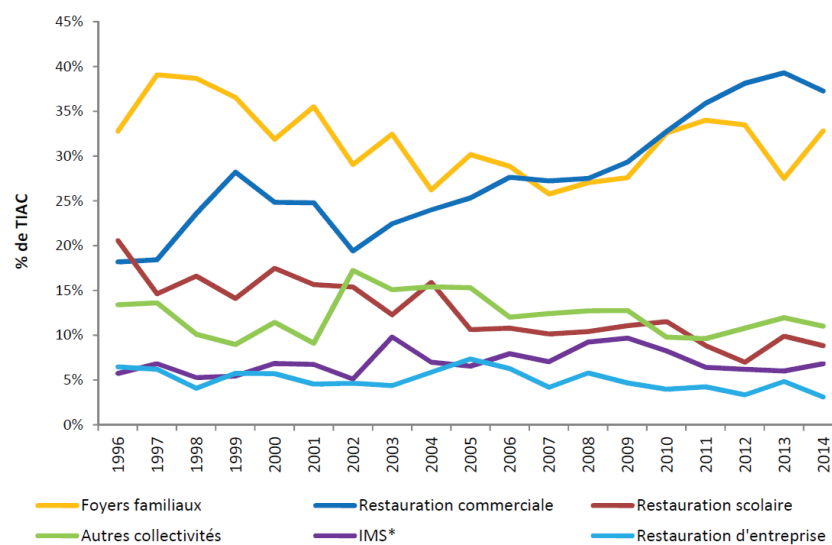


Figure 5 : Proportions de TIAC déclarées à l'Agence régionale de santé (ARS) et/ou Direction Départementale de la protection des populations (DD(CS)PP) en fonction du lieu de repas en France entre 1996 et 2014 (InVS, 2014). IMS* : Institut Médico-Social

Les microorganismes et toxines responsables, le plus souvent, de TIAC sont les *Staphylococcus aureus* via la synthèse d'entérotoxines dans l'aliment, les salmonelles, les *Campylobacter* thermotolérants, les virus entériques et des bactéries sporulantes comme

Clostridium perfringens et *Bacillus cereus* (ANSES, 2016; InVS, 2012, 2013, 2014). En France, 3 127 foyers de TIAC ont été déclarés entre 2006 et 2008, presque deux fois plus qu'entre 1998 et 2005. Ces TIAC ont occasionné 33 404 personnes malades dont 2 302 qui ont dû être hospitalisées et 15 qui sont décédées (Delmas *et al.*, 2010). Même si le nombre de foyers où *Salmonella* a été isolée diminue depuis 2001, les salmonelles restaient le principal agent retrouvé dans des foyers confirmés entre 2006 et 2008. Depuis 2007, les TIAC sont principalement causées par l'entérotoxine de *Staphylococcus aureus*, ainsi que, depuis 2010, par *Bacillus cereus* (Figure 6). De plus, par rapport aux TIAC en milieu familial, les TIAC survenues en restauration collective sont le plus souvent causées par des *Staphylococcus aureus* (31 % pour 2006-2008) mais également par *Clostridium perfringens* ou *Bacillus cereus* (23 % pour 2006-2008). Celles-ci sont souvent liées à un temps trop long de maintien du produit alimentaire à température ambiante ou à des mauvaises conditions de remise en température (Delmas *et al.*, 2010). Dans le cas des IMS, en 2014 5 % des TIAC ont été causées par *Salmonella*, 29 % par *B. cereus*, 25 % par *C. perfringens*, alors que les TIAC familiales étaient causées à 27 % par *Salmonella*, 13 % par *B. cereus* et 4 % par *C. perfringens* (InVS, 2014).

Concernant les produits alimentaires préparés, qui vont subir un processus de décontamination comme l'appertisation ou la pasteurisation, une partie des agents microbiens qui auraient pu être présents dans la matière première va être éliminée. Cependant les bactéries ayant la capacité de sporuler vont potentiellement être capables de survivre sous forme de spores à cette étape. En particulier, d'après l'INVS, la bactérie *B. cereus* représente la deuxième cause de TIAC depuis 2012 (InVS, 2012) (Fig 6).

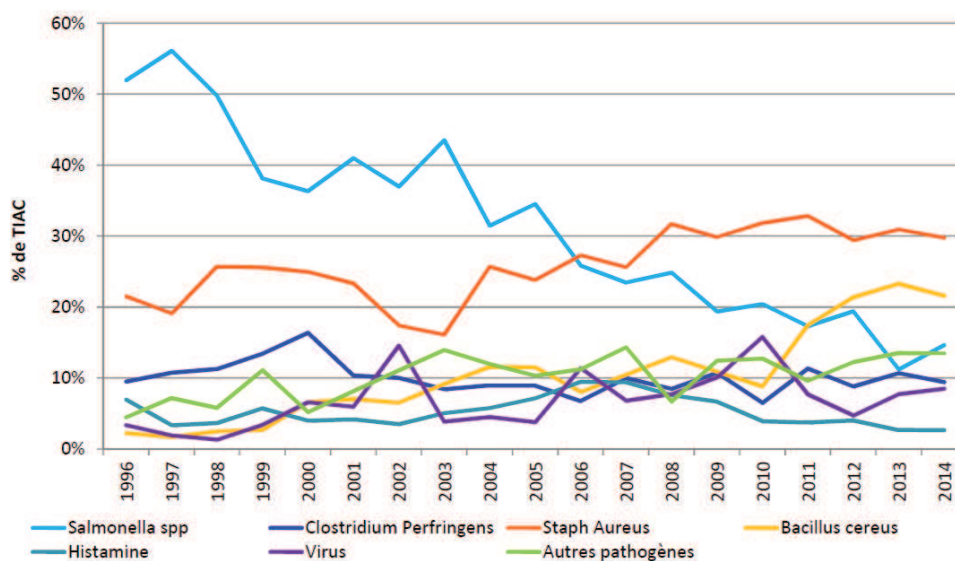


Figure 6 : Proportion des TIAC selon l'agent pathogène suspecté ou confirmé – TIAC déclarées aux ARS et/ou DD(CS)PP en France entre 1996 et 2014 (InVS, 2014).

Bacillus cereus semblait donc correspondre à un bon modèle pour définir les paramètres nécessaires à mettre en place afin d'assurer une bonne sécurité microbiologique des produits alimentaires conçus lors du projet OPTIFEL.

1.2. *Bacillus cereus*

1.2.1. Description globale et historique de *Bacillus cereus*

En 1887, Un couple anglais de la « Royal School of Mines », Grace et Percy Frankland répertoriaient les différentes bactéries présentes dans l'air d'une étable au Royaume Uni sur des boîtes de Pétri. Lors de cette étude, ils ont isolé pour la première fois une souche de *Bacillus cereus*. Cette souche fût nommée ATCC 14579 et sert encore de souche de référence aujourd'hui (Frankland and Frankland, 1887). A cette époque-là, *B. cereus* n'était pas qualifié de pathogène émergent et ne représentait pas un enjeu important au niveau de la santé publique contrairement à d'autres pathogènes alimentaires causant des maladies comme *Salmonella*. *B. cereus* est décrit comme un micro-organisme qui « tue parfois, mais ce n'est pas dangereux » d'après Gilles Tétart et Didier Torny en 2009 (Tétart and Torny, 2009). Il correspond à un micro-organisme que l'on retrouve à tous les niveaux de la chaîne alimentaire, de l'environnement, jusqu'au tube digestif du consommateur. Tout ceci en fait un objet d'étude très intéressant pour tous les acteurs de l'industrie agro-alimentaire. *B. cereus* se

définit donc comme un symbole du rapprochement entre la recherche fondamentale et appliquée, ce qui tend vers une recherche dite fondamentale finalisée (Tétart and Torny, 2009).

Suite à sa découverte en 1887 il a été décrit, pour la première fois, comme étant un pathogène, en 1937, lors de la mise en évidence de la mort d'un cochon d'Inde après avoir subi une injection d'une suspension de *B. cereus* (Clark, 1937). Ce n'est qu'en 1950 qu'il fût démontré que *B. cereus* pouvait être à l'origine de TIAC. En Norvège, entre 1947 et 1949, quatre TIAC ont affecté environ 600 personnes qui présentaient des maux de ventre ainsi que des diarrhées. L'intervention des services sanitaires ont permis de mettre en évidence qu'une crème à la vanille semblait être à l'origine de ces TIAC. Celle-ci avait été préparée avec de l'amidon de maïs dans lequel 10^4 spores de *B. cereus* par gramme furent retrouvés. Une étude fût donc réalisée pour confirmer que ces spores étaient bien la cause de ces TIAC. Une nouvelle crème à la vanille fût préparée avec cet amidon et servie à 16 personnes qui ont toutes présentées également des douleurs abdominales ainsi que des nausées et diarrhées (Hauge, 1950). Cette étude a permis de confirmer la capacité de *B. cereus* à causer des TIAC. Depuis, plusieurs épisodes diarrhéiques liés à *B. cereus* ont été décrits dans différents aliments comme des sauces, des soupes, des légumes, viandes, épices, pâtes, riz,... (Cadel Six *et al.*, 2012; Cadel Six *et al.*, 2014; EFSA, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2015b; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Par exemple, en 2004, une importante TIAC à *B. cereus* est survenue dans une maison de retraite pour des personnes âgées atteintes de pathologies psychiatriques, dans l'Essonne. Suite à celle-ci, 40 personnes (âge moyen : 78 ans) sur 70 exposées ont été malades. Trente-neuf personnes ont dû être hospitalisées pour des raisons de diarrhées, vomissements, fièvres et nausées. Les principaux aliments incriminés furent des petits pois-carottes entiers ou mixés et de la purée de légumes verts (De Buyser *et al.*, 2008).

1.2.2. Taxonomie et Phylogénie du groupe *Bacillus cereus*

B. cereus est une bactérie correspondant à des bacilles à coloration Gram positive. Ces bacilles sont assez volumineux, mesurant 1 à 1,8 μm de diamètre par 4 à 8 μm de long et forment habituellement de courtes chaînettes (Fig 7). Les colonies peuvent avoir des formes très variables, mais néanmoins distinctives, ce qui permet de les reconnaître facilement. Elles sont assez grandes, 2 à 7 mm de diamètre, avec une forme circulaire peu régulière et une couleur crème (De Vos *et al.*, 2009). Cette bactérie est dite ubiquitaire (Guinebretière *et al.*, 2008) ce qui explique donc que nous la retrouvons dans l'environnement et notamment dans

les sols où elle semble pouvoir faire des cycles complets de germination, croissance et sporulation (Margulis *et al.*, 1998). Ceci explique pourquoi elle est retrouvée sur les matières premières utilisées en agro-alimentaire.

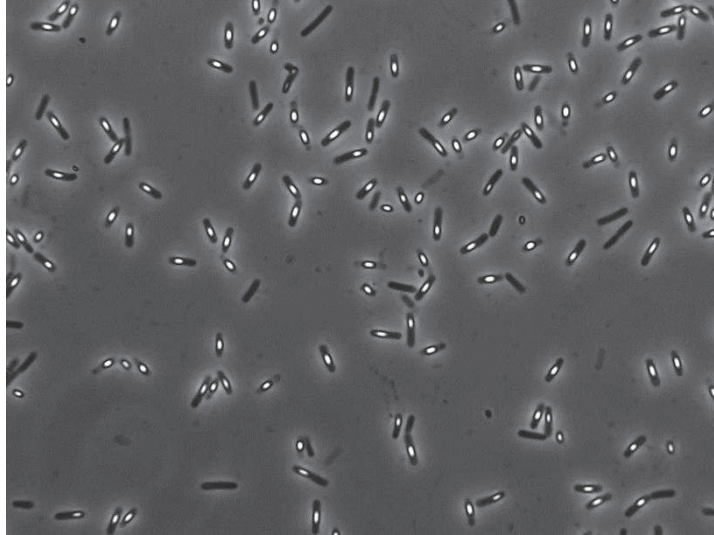


Figure 7 : Photographie au microscope à contraste de phase de cellules végétatives de *Bacillus cereus* contenant des endospores (UMR 408 SQPOV INRA)

B. cereus est une bactérie capable de produire des spores, lui permettant notamment de résister aux traitements thermiques.

B. cereus aussi appelé *B. cereus sensu stricto*, fait partie d'un ensemble d'espèces apparentées et regroupées sous le nom de *B. cereus sensu lato* (De Vos *et al.*, 2009). Ce groupe comprend 7 espèces génétiquement proches qui se différencient principalement par leurs caractères physiologiques, morphologiques ou de virulence.

- *Bacillus cereus sensu stricto*, hémolytique
- *Bacillus thuringiensis*, caractérisés par la production d'un cristal parasporal toxique pour les insectes
- *Bacillus weihenstephanensis*, correspond à une espèce psychrotolérante capable de croître à des températures minimales comprises entre 4 et 7 °C
- *Bacillus anthracis*, non hémolytique et responsable de la maladie du charbon

- *Bacillus cytotoxicus*, espèce décrite en 2013 (Guinebretiere *et al.*, 2013)
- *Bacillus mycoïdes* et *Bacillus pseudomycoïdes*, capables de former des colonies à bords filamenteux sur milieux gélosés

Outre la subdivision en espèces, une étude phylogénétique du groupe *B. cereus sensu lato* a permis de mettre en évidence l'existence de 7 groupes phylogénétiques caractérisés par différents domaines de températures de croissance ou « thermotypes » (Guinebretière *et al.*, 2008). Le groupe phylogénétique VI correspond au groupe le plus psychrotolérant ayant des températures de croissance comprises entre 5 et 37 °C. Les groupe I, II, IV et V sont des groupes dit intermédiaires avec des gammes de températures de croissance comprises respectivement entre 10 et 43 °C, 7 et 40 °C, 10 et 45 °C et 8 et 40 °C. Puis les groupes III et VII sont les plus thermophiles avec des gammes de températures de croissance allant respectivement de 15 à 45 °C et de 20 à 50 °C (Tableau 1) (Guinebretière *et al.*, 2008; Guinebretiere *et al.*, 2010).

Tableau 1 : Structure phylogénétique du groupe *B. cereus* présentant les 7 groupes phylogénétiques du groupe *B. cereus sensu lato* et leur principales caractéristiques (Guinebretiere *et al.*, 2010)

Phylogenetic group ^a	Species	Subgroup	Other designation	Growth temp range (°C)	No. of tested strains	% of strains carrying ^b :				
						<i>hbl</i>	<i>cytK-2</i>	<i>cytK-1</i>	<i>nhe</i>	<i>ces</i>
I	<i>B. pseudomycoïdes</i>	BC10	I-1	10–43	17	41	0	0	100 ^c	0
		BC13	I-2		7	86	0	0		
II	<i>B. cereus</i> II, <i>B. thuringiensis</i> II	BC06	II	7–40	31	61	13	0	100	0
III	<i>B. cereus</i> III, <i>B. thuringiensis</i> III, <i>B. anthracis</i> (found only in subgroup III-4)	BC12	III-1	15–45	15	67	73	0	100	0
		BC05	III-2		26	12	31			31
		BC09	III-3		14	14	57			7
		BC08	III-4		28	14	39			0
IV	<i>B. cereus</i> IV, <i>B. thuringiensis</i> IV	BC04	IV-1	10–45	34	97	79	0	100	0
		BC03	IV-2		32	97	97			
		BC07	IV-3		29	86	79			
V	<i>B. cereus</i> V, <i>B. thuringiensis</i> V	BC11	V	8–40	17	88	6	0	100	0
VI	<i>B. weihenstephanensis</i>	BC01	VI-1	5–37	93	83	0	0	100	0
	<i>B. mycoïdes</i> , <i>B. thuringiensis</i> VI	BC02	VI-2		43	60	0		100	
VII	<i>B. cytotoxicus</i>	BC14	VII	20–50	5	0	0	100	100	0

^a The phylogenetic groups to which they belong in the *B. cereus* group (previously defined in reference 10).

^b Distribution of the known food poisoning toxin genes among these groups (data from this study). Results shown in boldface indicate important results that are in contrast with those of other groups.

^c In group I, 9 strains (rather than 24 strains) were tested for *nhe* genes.

Les différentes espèces de *B. cereus* ne correspondent pas toutes aux groupes phylogénétiques. *B. weihenstephanensis* (Lechner *et al.*, 1998) et *B. mycoïdes* sont inclus dans le groupe phylogénétique VI (psychrotolérant). *B. pseudomycoïdes* dans le groupe phylogénétique I. *B. cytotoxicus* correspond au groupe phylogénétique VII (Guinebretiere *et al.*, 2013; Lapidus *et al.*, 2008), tandis que *B. anthracis* se retrouve dans le groupe phylogénétique III. *B. cereus sensu stricto* se retrouve à la fois dans les groupes phylogénétiques II, III, IV et V. *B. thuringiensis* se retrouve dans les groupes phylogénétiques contenant des souches porteuses du cristal parasporal, soit les groupes II, III, IV, V et VI (Guinebretiere *et al.*, 2010) (Tableau 1).

Une des hypothèse émise par Guinebretière *et al.*, (2008) serait que *B. cereus sensu lato* aurait tendance à évoluer vers une meilleure adaptation au froid et donc provoquer une augmentation du nombre de groupes psychrotolérants (Guinebretière *et al.*, 2008). Les souches de ces groupes représentent un véritable problème lors de la conservation d'aliments aux températures de réfrigération. Pourtant, si certaines souches des groupes II et V ont été isolées de TIAC, le plus souvent ce sont des souches appartenant aux groupes phylogénétiques III, IV et VII qui sont impliquées dans des TIAC (Guinebretiere *et al.*, 2010).

1.2.3. Caractéristiques de *Bacillus cereus*

1.2.3.1. *Bacillus cereus* dans les aliments

Comme vu précédemment, *B. cereus* est une bactérie ubiquitaire que l'on retrouve principalement dans les sols. De ce fait, *B. cereus* est retrouvé dans des aliments très variés et représente donc un problème pour l'industrie agro-alimentaire. Les produits céréaliers comme le riz (Lee *et al.*, 1995; Melling *et al.*, 1976; Mortimer and McCann, 1974) ainsi que les fruits et légumes (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008) (Fig 8) sont fréquemment mis en cause lors d'intoxications alimentaires dues à *B. cereus*. Concernant les aliments incriminés dans des TIAC, *B. cereus* est plus souvent retrouvé dans des produits d'origine végétale contrairement à *Clostridium perfringens* qui lui est surtout retrouvé dans des produits carnés (EFSA, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2015b). Une étude de Valero *et al.* (2002) a mis en évidence la présence de *B. cereus* sur de multiples ingrédients qui font partie de la recette d'un gaspacho. *B. cereus* était présent sur 14 % des échantillons d'oignons et de courgettes, sur 33 % des concombres, 43 % des carottes, 90 % des tomates et 100 % des échantillons de poivre (Valero

et al., 2002). Il a également déjà été retrouvé sur des produits carnés, même si cela reste moins fréquent. Par exemple, une étude a montré la présence de *B. cereus* sur des échantillons de produits carnés transformés comme le salami et la saucisse ainsi qu'à la surface de poulet rôti même si ces échantillons furent plus rare (Nortje *et al.*, 1999). De plus, *B. cereus* est également retrouvé dans des produits laitiers, comme des crèmes et des crèmes glacées, dans des poudres de lait ou encore dans du lait fermenté ou pasteurisé (EFSA, 2016; Hauge, 1950; Wong *et al.*, 1988). La plupart des contaminations par une ou différentes souches de *B. cereus* proviennent de la matière première, cependant durant le procédé de transformation et/ou de la conservation des aliments, il peut y avoir une nouvelle contamination et/ou une sélection de certaines souches déjà présentes.

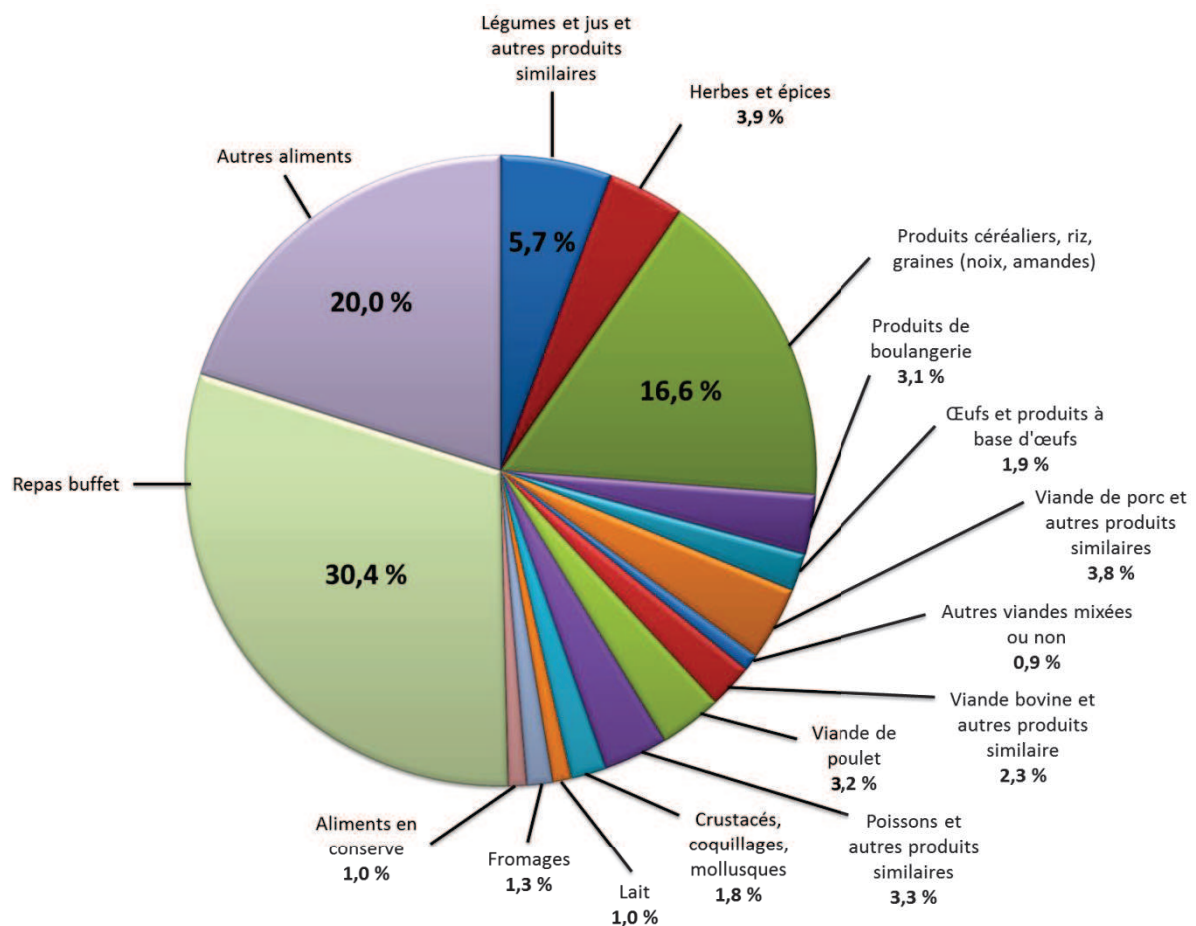


Figure 8 : Distribution des types de produits alimentaires qui furent impliqués dans des intoxications confirmées causées par *B. cereus* en Europe entre 2009 et 2012 (EFSA, 2011, 2012, 2013, 2014)

1.2.3.2. Pouvoir pathogène de *Bacillus cereus*

Il existe deux types de syndromes causés par *B. cereus*, certains sont décrits comme diarrhéiques et d'autres comme émétiques. Les souches à l'origine de ces syndromes sont souvent dénommées « souches diarrhéiques » et « souches émétiques ».

Le syndrome diarrhéique est causé par l'ingestion de *B. cereus* sous forme de spores ou de cellules végétatives (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Une concentration de 10^5 UFC par gramme d'aliment peut provoquer ce type de syndrome (Granum *et al.*, 1995). Les symptômes sont dus à des toxines diarrhéiques produites au niveau intestinal. Ces toxines ne résistent pas aux traitements thermiques ni au pH acide lors du passage dans l'estomac (Dromigny, 2008). Ceci signifie que le syndrome diarrhéique nécessite que les spores et/ou cellules végétatives survivent au passage dans l'estomac pour pouvoir produire ces toxines par la suite, dans l'intestin. Le transit des cellules dans l'estomac dure au minimum 6 h et 4 h dans l'intestin grêle (Dromigny, 2008; Granum *et al.*, 1995) (Fig 9). Les symptômes liés à ces entérotoxines surviennent après minimum 6 h suite à l'ingestion du produit alimentaire et durent au maximum une journée (Granum *et al.*, 1993).

Les souches dites émétiques produisent une toxine appelé céréulide qui résiste à de forts traitements thermiques, à des pH acides et à la protéolyse (Agata *et al.*, 1994). Le céréulide est préformé directement dans l'aliment, qui va contaminer directement l'individu au moment de l'ingestion même si la bactérie n'est plus présente (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Dans des études précédentes, il a été montré que 10 ng/g de céréulide dans des échantillons de produits alimentaires ont suffi à provoquer une intoxication alimentaire de type émétique (Agata *et al.*, 2002). Le syndrome émétique apparaît entre 0,5 et 5 h après la consommation de l'aliment contaminé. Il est caractérisé par l'apparition de crampes abdominales suivies de sévères vomissements, et peut conduire à des déficiences hépatiques graves, voir même des décès (Agata *et al.*, 1995; Dierick *et al.*, 2005; Ehling-Schulz *et al.*, 2004; Hoton *et al.*, 2005; Mahler *et al.*, 1997; Mikkola *et al.*, 1999; Naranjo *et al.*, 2011; Paananen *et al.*, 2002; Teplova *et al.*, 2006). Hormis ces cas graves, le rétablissement est généralement spontané après 6 à 24 h (Fig 9).

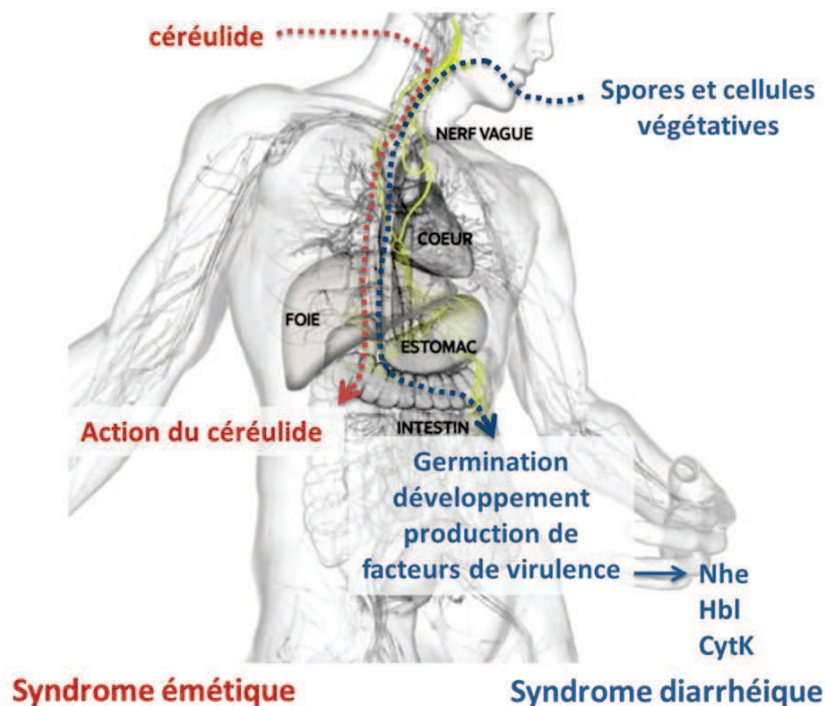


Figure 9 : Schéma représentant les deux types d'intoxication possibles par *B. cereus*

Plus précisément, les toxines reconnues comme responsables des syndromes diarrhéiques sont au nombre de trois (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). La première est appelée hémolysine BL (Hbl) correspondant à un complexe de 3 protéines (L1, L2 et B) (Beecher and Macmillan, 1990, 1991; Granum *et al.*, 1993). Hbl est produite pendant la phase exponentielle de croissance de *B. cereus* avec un maximum en fin de cette phase de croissance (Dromigny, 2008). La seconde correspond à un complexe protéique qui ne dispose pas d'activité hémolytique, contrairement à Hbl, mais d'une activité toxique. C'est pourquoi cette toxine s'appelle « non hémolytic enterotoxin » (Nhe). Cette toxine nécessite également la complexation de trois composants pour avoir une activité toxique maximale (Lund and Granum, 1996). Les modes d'action de Hbl et Nhe sont comparables (Lund and Granum, 1997). La troisième est une toxine non-protéique, la cytotoxine K (CytK). Elle fait partie d'une famille de porines et possède une activité dermonécrotique, cytotoxique et hémolytique (Lund *et al.*, 2000). Les gènes codant pour les toxines diarrhéiques sont retrouvés dans quasiment tous les groupes phylogénétiques de *B. cereus* (Guinebretière *et al.*, 2008; Guinebretière *et al.*, 2010), avec des prévalences différentes suivant les toxines (Tableau 1).

Concernant le céréulide, responsable des intoxications de type émétique, il fut isolé, et sa structure chimique décrite, pour la première fois en 1994 par Agata *et al.*, (Agata *et al.*, 1994). Tout commença en 1971 en Angleterre, où 13 personnes furent victimes de nausées importantes accompagnées de vomissements suite à la consommation de plats à base de riz qui contenaient de fortes concentrations de *B. cereus* (Mortimer and McCann, 1974). Les syndromes différaient de ceux définis comme diarrhéiques et furent donc nommés « syndromes émétiques ». Durant les années 1974 et 1975, de nombreuses intoxications émétiques furent observées en Angleterre comme en Australie, au Canada, aux Pays-Bas, etc. (Taylor and Gilbert, 1975). Puis en 1976, l'étude réalisée par Melling *et al.*, mis en avant qu'il y avait deux types de souches de *B. cereus*, responsables d'intoxications alimentaires, bien distinctes. Selon Melling *et al.* (1976), certaines étaient spécifiquement diarrhéiques et d'autres émétiques (Melling *et al.*, 1976). Les données plus récentes montrent néanmoins que les souches émétiques produisent aussi les toxines diarrhéiques (Guinebretiere *et al.*, 2010).

Le céréulide est un dodécadepsipeptide cyclique, proche de la valinomycine, avec une structure $[\text{D-O-Leu-D-Ala-O-Val-L-Val}]_3$ et une masse molaire égale à 1153 Da (Agata *et al.*, 1995; Teplova *et al.*, 2006) (Fig 10).

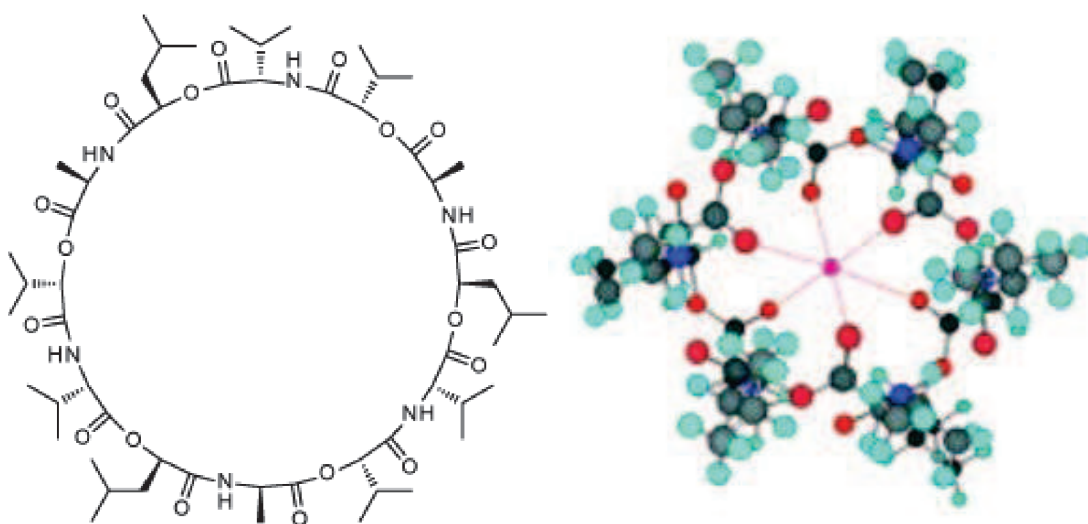


Figure 10 : Structure et formule du céréulide en 2D (Chiralix <http://www.chiralix.com/rightclick.cfm?id=67352>) et en 3D (Pitchayawasin *et al.*, 2003)

Le céréulide est une toxine fortement résistante à la chaleur (121 °C pendant 15 min) et à l'acide (Agata *et al.*, 1995; Shinagawa *et al.*, 1996; Teplova *et al.*, 2006). La synthèse du céréulide se fait de manière non ribosomale via une synthase peptidique appelée céréulide synthase et codée par le cluster de gènes *ces* (Ehling-Schulz *et al.*, 2005). Ce cluster de gènes *ces* est le plus souvent localisé sur un méga-plasmide de virulence nommé pCER270 qui ressemble au plasmide pXO1 de *Bacillus anthracis* (Ehling-Schulz *et al.*, 2015; Ehling-Schulz *et al.*, 2006a; Hoton *et al.*, 2005). Cependant, chez de rares souches émétiques de *B. cereus*, ces gènes *ces* sont localisés sur un plasmide de taille différente ou sur le chromosome (Mei *et al.*, 2014). Jusqu'en 2006, toutes les souches émétiques connues étaient mésophiles et appartenaient au groupe phylogénétique III (Carlin *et al.*, 2006; Guinebretière *et al.*, 2008; Guinebretiere *et al.*, 2010) (Tableau 2). Ces souches étant dans l'incapacité de se développer aux températures de réfrigération des produits alimentaires, selon les connaissances en 2006, le céréulide ne pouvait être retrouvé dans un produit alimentaire réfrigéré, que s'il avait été produit lors d'une étape antérieure au stockage et transport au froid de ces produits, ou en cas de défaillance de la chaîne du froid. Cependant, depuis 2006 des souches psychrotolérantes de *B. weihenstephanensis* ont été décrites comme des souches émétiques (Hotton *et al.*, 2009; Thorsen *et al.*, 2006), appartenant au groupe phylogénétique VI et donc pouvant se développer à des températures supérieures ou égales à 5 °C (Guinebretière *et al.*, 2008; Guinebretiere *et al.*, 2010) (Tableau 2). Ces souches représentent un risque important au niveau de la sécurité microbiologique des produits alimentaire durant leur conservation au froid positif, car si le céréulide est produit à des concentrations importantes pendant cette étape de stockage, il ne pourra pas être détruit lors de la préparation du produit alimentaire avant sa consommation. Trois études ont étudié la capacité de deux de ces souches à se développer à 8 °C et à produire du céréulide dans ces conditions (Rossvoll *et al.*, 2014; Thorsen *et al.*, 2009a; Thorsen *et al.*, 2009b), avec des résultats contradictoires, montrant une absence de production (Thorsen *et al.*, 2009a et b) ou une production (Rossvoll *et al.*, 2014). Rossvoll *et al.*, (2014) expliquait ces différences par les milieux de cultures utilisés dans ces études.

1.3. Thermo-résistance de *Bacillus cereus*

B. cereus peut être retrouvé sous deux formes bien distinctes, sous forme de spores ou de cellules végétatives dans différents milieux comme des milieux de laboratoire ou des aliments. Les spores de *B. cereus* sont résistantes à la chaleur et peuvent donc résister à des processus de décontamination des produits alimentaires comme l'étape de pasteurisation. Plusieurs études ont caractérisé la thermo-résistance des spores en déterminant plusieurs paramètres (Afchain *et al.*, 2008; Carlin *et al.*, 2006; Choma *et al.*, 2000; Luu-Thi *et al.*, 2014). Cette thermo-résistance est premièrement décrite par la mesure de la valeur de D en minutes (si la courbe de survie est linéaire) ou δ en minutes (si la courbe est non linéaire suivant le modèle de Mafart *et al.* 2002), qui correspond au temps nécessaire pour la première réduction décimale de la population bactérienne initiale, pour une température de chauffage. L'allure de la courbe de survie ($\log_{10}$ du nombre de survivants en fonction du temps) est définie par un paramètre p (noté p^* dans notre étude). Si la courbe est linéaire la valeur de p^* sera égale à 1, si elle tend plus à être concave p^* sera supérieur à 1 et inversement si la courbe de survie à une forme convexe. Puis la valeur de z est déterminée, elle correspond à l'élévation de température (°C) nécessaire pour obtenir une réduction d'un facteur 10 de la valeur de D ou δ .

La thermo-résistance des spores de *B. cereus* varie en fonction des souches sans qu'une tendance claire se dessine entre souches mésophiles et psychrotolérantes (Fig 11) (Wells-Bennik *et al.*, 2016). Toutefois, la thermo-résistance des spores de *B. cereus* varie en fonction du groupe phylogénétique (Luu-Thi *et al.*, 2014; Wells-Bennik *et al.*, 2016). En particulier, les souches mésophiles du groupe III productrices de toxine émétique sont plus résistantes que les souches diarrhéiques (Carlin *et al.*, 2006). Les valeurs de z, pour les spores de souches de *B. cereus* appartenant aux différents groupes phylogénétiques, sont proches (Luu-Thi *et al.*, 2014) (Tableau 2).

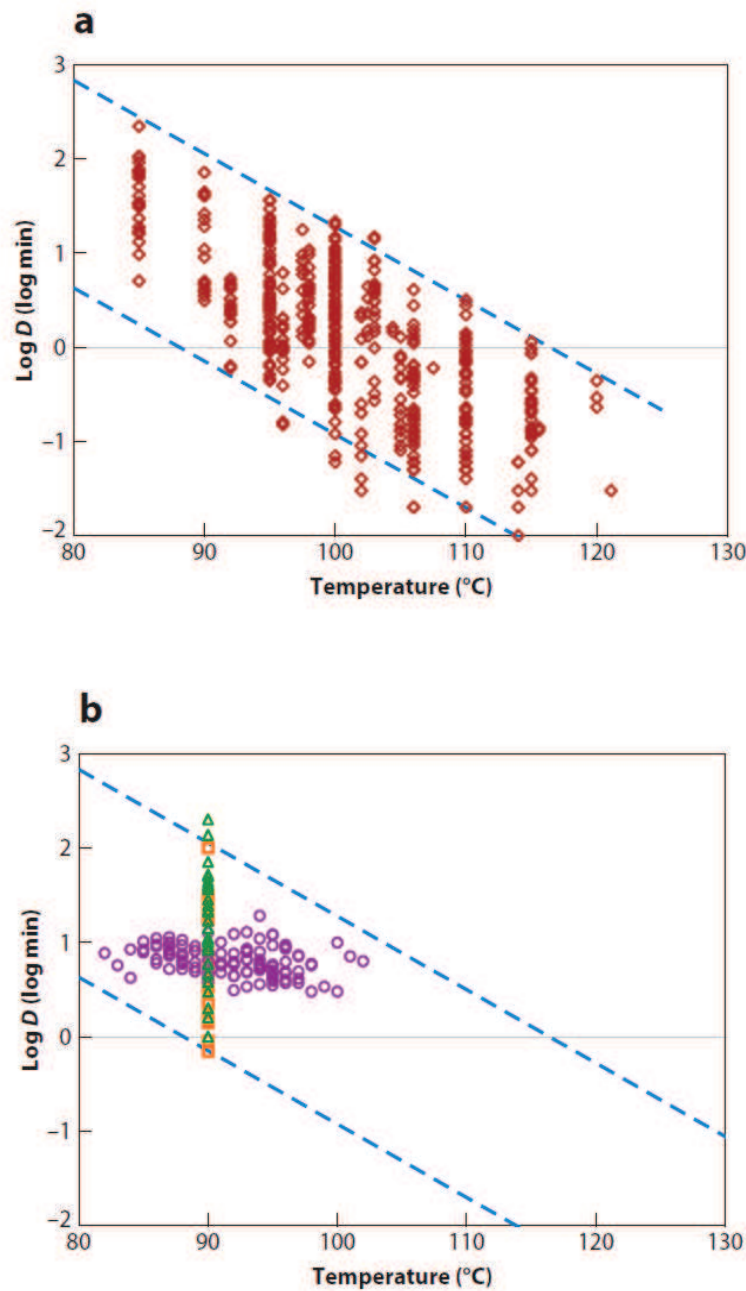


Figure 11 : Thermo-résistance des spores de *B. cereus* en fonction de la température ; a : valeurs des $\log_{10} D$ en fonction de la température (lozange rouge) d'après van Asselt and Zwietering, (2006). b : valeurs des $\log_{10} D$ à 90 °C, de souches psychrotolérantes (carré orange) et de souche mésophiles (triangle vert) d'après Membre *et al.*, (2006) ainsi que les $\log_{10} D$ en fonction de la températures reportés par Luu-Thi *et al.*, (2014) (Luu-Thi *et al.*, 2014; Membre *et al.*, 2006; van Asselt and Zwietering, 2006). Les lignes bleues pointillées représentent les intervalles de précision à 95 % d'après van Asselt & Zwietering (2006). Figure tirée de (Wells-Bennik *et al.*, 2016).

Tableau 2 : Moyennes et classement des valeurs de $T_{\log D=0.8}$ *et des valeurs de z pour les spores des différents groupes phylogénétiques de *Bacillus cereus* (Luu-Thi *et al.*, 2014).

Group	Number of strains	Average $T_{\log D = 0.8} \pm SD$ (°C)	Range (°C)	Average z value $\pm SD$ (°C)	Range (°C)
II	3	91.4 ± 2.7^{AB}	88.4–95	10.2 ± 2.2^{AB}	8.3–12.6
III	6	96.6 ± 3.5^A	91.8–101.8	8.4 ± 1.9^{AB}	6.0–10.0
IV	6	93.3 ± 2.6^A	90.6–97.5	10.5 ± 3.1^{AB}	8.2–16.5
V	3	94.1 ± 1.4^A	93.1–96.1	11.0 ± 3.8^{AB}	7.2–14.7
VI	15	88.5 ± 2.4^B	82.7–92.7	12.0 ± 2.9^A	7.7–19.5
VII	5	94.3 ± 0.6^A	93.6–94.9	5.7 ± 0.9^B	4.2–6.4

SD = standard deviation. Values within the same column with a different letter in superscript are significantly different ($p < 0.05$).

* $T_{\log D=0.8}$: Température pour laquelle le logarithme décimal de D (temps pour une réduction décimale en minute) est égale à 0,8 (soit $D=6,31$ min)

Les conditions environnementales lors de la production des spores de *B. cereus*, peuvent également influencer leur thermo-résistance. Par exemple des spores produites à basse température sont moins résistantes que des spores produites à 30 °C (Planchon *et al.*, 2011), tandis que les spores produites en anaérobioses sont plus résistantes (Abbas *et al.*, 2014a).

Le risque d'aboutir à une intoxication devient important si des spores de souches psychrotolérantes de *B. cereus* résistent aux traitements thermiques appliqués, puis germent et se développent pendant l'étape de stockage au froid des produits alimentaires. A ce moment-là, ces souches de *B. cereus* se retrouveraient sous forme, principalement, de cellules végétatives et la seule étape susceptible de les détruire avant la consommation du produit sera l'étape de réchauffage. Très peu d'études ont été réalisées sur la thermo-résistance des cellules végétatives de *B. cereus* contrairement à celle des spores. L'obtention de ces informations sur la thermo-résistance des cellules végétatives de *B. cereus*, principalement de celles capables de se développer à de basse température, semblait donc important dans le cadre du projet OPTIFEL.

1.4. Croissance de *Bacillus cereus* en fonction des conditions environnementales

1.4.1. Capacité de croissance de *Bacillus cereus* au froid

Les produits alimentaires préparés, comme les REPFEDs, sont stockés et transportés à basse température jusqu'à la date limite de consommation (DLC). IL y a un risque de germination des spores de *B. cereus* et de développement durant cette étape. Comme nous avons pu le voir précédemment, certaines souches de *B. cereus* sont capables de se multiplier à ces températures de réfrigération et donc de présenter un risque d'intoxication alimentaire lors de la consommation de ces produits par la suite. Les domaines de température de croissance en fonction des groupes phylogénétiques ont bien été définis par Guinebretière *et al.*, (2008) et une étude réalisé par Carlin *et al.*, (2013) à permit de définir les paramètres cardinaux de croissance pour certaines souches de *B. cereus* appartenant à différents groupes phylogénétiques (Carlin *et al.*, 2013) (Tableau 3).

Tableau 3 : Taux de croissance en conditions optimales (μ_{opt}) et températures cardinales (températures minimales T_{min} , optimale T_{opt} et maximales T_{max} de croissance) de souches de *B. cereus* appartenant aux différents groupes phylogénétiques, Carlin *et al.*, (2013)

Group ^a and strain	RMSE ^b	μ_{opt} (h ⁻¹)	T_{min} (°C)	T_{opt} (°C)	T_{max} (°C)
II, RIVM BC120	0.130	2.44, 2.61 , 3.48c	-2.0, 1.4 , 5.1	36.1, 36.8 , 40.0	40.0, 41.0 , 41.1
II, NVH 0861-00	0.116	2.53, 2.72 , 2.92	2.3, 5.1 , 8.4	34.1, 35.0 , 36.0	40.0, 40.2 , 40.4
III, F4810/72	0.137	2.99, 3.12 , 3.30	4.5, 7.9 , 10.7	38.1, 38.7 , 39.3	47.4, 48.0 , 48.4
III, F837/76	0.128	3.14, 3.32 , 3.55	4.1, 7.4 , 10.3	38.2, 38.9 , 39.6	47.3, 48.0 , 48.2
IV, F4430/73	0.181	3.01, 3.27 , 3.54	4.9, 9.1 , 12.9	37.5, 38.3 , 39.3	47.2, 48.0 , 48.5
IV, ATCC 14579	0.143	2.63, 2.76 , 2.91	4.6, 7.8 , 11.1	36.6, 37.4 , 38.2	47.4, 48.0 , 48.4
V, F2769/77	0.180	2.56, 2.81 , 3.23	0.8, 5.1 , 9.4	35.0, 36.0 , 37.5	40.3, 41.0 , 41.1
V, NVH 141	0.126	2.65, 2.82 , 3.07	2.1, 5.2 , 8.4	35.5, 36.2 , 36.9	40.5, 41.0 , 41.1
VI, KBAB4	0.135	1.71, 1.83 , 1.95	0.5, 3.9 , 7.5	29.1, 31.0 , 32.5	40.1, 40.9 , 41.7
VI, ADRIA I21	0.167	2.34, 2.59 , 3.61	-0.8, 3.3 , 7.5	35.1, 36.1 , 40.0	40.0, 41.0 , 41.3
VII, NVH 391-98]	0.219	3.62, 3.89 , 4.29	8.1, 12.6 , 16.3	42.1, 43.1 , 44.3	53.8, 55.0 , 55.9
VII, NVH 883-00	0.177	2.14, 2.31 , 2.54	15.2, 19.1 , 21.2	37.0, 37.6 , 38.6	53.6, 55.0 , 56.8

2.5th percentile, mean (in bold) and 97.5th percentile.

^a As defined by Guinebretière *et al.* (2008).

^b RMSE : Root Mean Square Error.

D'après ces paramètres, nous pouvons constater, par exemple, que les souches KBAB4 et ADRIA I21, appartenant au groupe phylogénétique VI, ont respectivement une température minimale de croissance de 3,9 °C et 3,3 °C. Ces souches représentent donc un risque potentiel de par leur capacité à croître aux températures de réfrigération des produits

alimentaires. En particulier, plusieurs études ont déjà mis en avant la capacité de souches de *B. cereus* à se développer à basse température dans des aliments contenant des légumes, comme la carotte ou encore la courgette et épinard (Choma *et al.*, 2000; De Sarrau *et al.*, 2013a; Lanciotti *et al.*, 2001; Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2000).

1.4.2. Capacité de croissance de *Bacillus cereus* à différents pH

Le pH représente aussi un facteur important à prendre en compte car les produits alimentaires à base de fruits et de légumes sont susceptibles d'avoir des pH plus acides que l'optimum pour la croissance de *B. cereus*. Cependant *B. cereus* est également capable de croître dans une gamme de pH allant de 7,4 à 4,3 (Carlin *et al.*, 2013). Carlin *et al.*, (2013) ont également défini les valeurs de pH minimales et optimales pour les mêmes souches que dans le Tableau 3 mais également, de manière plus générale, les limites inférieures des pH de croissance pour tous les groupes phylogénétiques de *B. cereus* (Tableau 4 et 5).

Tableau 4 : Taux de croissance en conditions optimales (μ_{opt}), pH minimales pH_{min} , et pH optimale pH_{opt} de croissance, de souches de *B. cereus* appartenant aux différents groupes phylogénétiques, Carlin *et al.*, (2013)

Group ^a and strain	RMSE ^b	μ_{opt} (h ⁻¹)	pH _{min}	pH _{opt}
II, RIVM BC120	0.130	2.44, 2.61 , 3.48c	4.53, 4.68 , 4.76	6.41, 6.51 , 6.71
II, NVH 0861-00	0.116	2.53, 2.72 , 2.92	4.57, 4.62 , 4.69	6.35, 6.43 , 6.55
III, F4810/72	0.137	2.99, 3.12 , 3.30	4.53, 4.63 , 4.70	6.53, 6.68 , 6.95
III, F837/76	0.128	3.14, 3.32 , 3.55	4.59, 4.65 , 4.71	6.32, 6.39 , 6.48
IV, F4430/73	0.181	3.01, 3.27 , 3.54	4.50, 4.59 , 4.66	6.31, 6.42 , 6.57
IV, ATCC 14579	0.143	2.63, 2.76 , 2.91	4.51, 4.60 , 4.68	6.54, 6.73 , 7.04
V, F2769/77	0.180	2.56, 2.81 , 3.23	4.76, 4.87 , 5.03	6.40, 6.51 , 6.70
V, NVH 141	0.126	2.65, 2.82 , 3.07	4.62, 4.69 , 4.76	6.36, 6.45 , 6.57
VI, KBAB4	0.135	1.71, 1.83 , 1.95	4.73, 4.85 , 5.00	6.41, 6.49 , 6.61
VI, ADRIA I21	0.167	2.34, 2.59 , 3.61	4.87, 4.96 , 5.03	6.32, 6.39 , 6.49
VII, NVH 391-98	0.219	3.62, 3.89 , 4.29	4.58, 4.79 , 4.90	6.43, 6.59 , 7.11
VII, NVH 883-00	0.177	2.14, 2.31 , 2.54	4.44, 4.59 , 4.73	6.34, 6.50 , 6.81

2.5th percentile, mean (in bold) and 97.5th percentile.

^a As defined by Guinebretière *et al.* (2008).

^b RMSE : Root Mean Square Error.

D'après le tableau 4, nous pouvons constater que les deux souches (KBAB4 et ADRIA I21), qui étaient capable de croître à de basse température, sont également capables

de se multiplier respectivement à des valeurs de pH minimales de 4,85 et 4,96. Par exemple, les carottes cuites sont à des pH proche de 6 et donc une croissance de *B. cereus* dans ce type de produit semble possible. Un abaissement du pH dans le cadre des produits développés dans le projet OPTIFEL pourrait être envisagé, mais une étude a montré qu'une souche psychrotrophe de *B. cereus* (INRA TZ415) était capable de se développer à un pH de 4,75 à 25 °C dans du jus de carotte acidifié avec du jus de citron (Valero *et al.*, 2000).

Tableau 5 : Effet du pH sur la croissance de souches de *B. cereus* appartenant aux différents groupes phylogénétiques (Carlin *et al.*, 2013)

Phylogenetic group ^a	% strains ^b growing in BHI at a pH of:				
	7.4	5	4.8	4.6	4.3
II	100	100	100	100	17
VII	100	100	100	100	25
III	100	100	100	88	25
I	100	100	100	83	0
IV	100	100	100	67	0
V	100	100	100	40	0
VI	100	100	67	17	0

Grey shade covers conditions allowing growth of 100% strains.

^a As defined by Guinebretière *et al.* (2008).

^b 4–8 strains tested in each genetic group.

Ceci est cohérent avec les résultats présentés dans le tableau 5, montrant que 17% des souches du groupe VI (auquel appartiennent les souches ADRIA-I21, KBAB4 et TZ415) peuvent se développer à pH 4,6. En outre, 100% des souches appartenant au groupe phylogénétique II, contenant aussi des souches psychrotolérantes, se développe à pH 4,6, (Carlin *et al.*, 2013). Le pH est donc un facteur important à prendre en compte lors de la formulation du produit alimentaire tout en prenant en considérant les autres facteurs pouvant jouer sur la sécurité microbiologique du produit, comme la température et l'emballage.

1.4.3. Capacité de croissance de *Bacillus cereus* en anaérobiose

Les produits alimentaires peuvent être emballés de différentes manières, en présence d'oxygène, sous atmosphère modifiée ou encore sous vide. Un emballage sous vide est

souvent utilisé car il permet d'appliquer un traitement thermique dans l'emballage final, souvent de ralentir l'altération microbiologique et aussi d'éviter l'oxydation de certains composants contenus dans les produits alimentaires. Cependant *B. cereus* est une bactérie aéro-anaérobie facultative, ce qui signifie qu'elle est capable de se développer en absence d'oxygène. Plusieurs études ont montré la capacité de croissance en anaérobiose de diverses souches de *B. cereus*. Par exemple, l'étude de De Sarrau *et al.*, (2012) a permis d'observer la croissance d'une souche mésophile de *B. cereus* (ATCC 14579) en anaérobiose en milieux de laboratoire (De Sarrau *et al.*, 2012). Une autre étude a mis en avant la capacité de croissance de souches psychrotolérantes de *B. cereus* en anaérobiose mais dans de la purée de légume (Samapundo *et al.*, 2011) (Fig 12). Cependant, plus le taux d'oxygène était faible au niveau de l'espace tête, plus la phase de latence avant croissance d'une souche psychrotolérante de *B. cereus* était longue et sa population maximale (N_{max}) faible (Samapundo *et al.*, 2011).

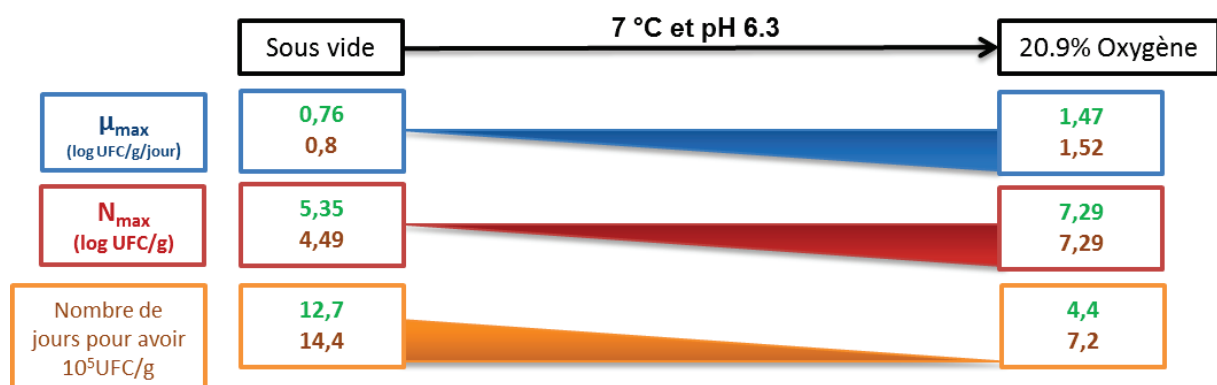


Figure 12 : Schéma représentant la capacité de croissance d'une souche psychrotrophe de *B. cereus* en fonction de la présence d'oxygène dans un mélange de purée de pommes de terre et d'épinard (résultats en vert) et dans de la purée de pomme de terre seule (résultats en marron), à partir des données de Samapundo *et al.*, (2011)

Dans un produit commercial à base de légumes conditionné sous vide, le nombre de *B. cereus* pouvait atteindre 6 à 8 $\log_{10}$ UFC/g au moment de l'apparition d'une détérioration visuelle du produit. Par exemple, dans différentes purées emballées sous vides et incubée à des températures allant de 2 à 42 °C (Choma *et al.*, 2000):

- À 20-25 °C, une détérioration était observée au bout de 7-12 jours avec 6.2-8,5 log₁₀ UFC/g de *B. cereus*
- À 10 °C, 50 % des échantillons de purées testés contenaient 4-6 log₁₀ UFC/g de *B. cereus* sans détérioration visible.
- À 4 °C aucun *B. cereus* n'a été retrouvés

L'absence d'oxygène réduit, mais n'empêche pas, la croissance de *B. cereus*, et représente donc un facteur à prendre également en compte lors de la conception de nouveaux produits alimentaires.

1.4.4. Capacité de croissance de *Bacillus cereus* lors de stress croisés

Pendant le cycle de vie d'un produit alimentaire, les souches de *B. cereus* peuvent rencontrer différents facteurs stressants simultanément ou non, comme de basses températures, de bas pH ou encore l'absence d'oxygène. Comme précisé précédemment, certaines souches de *B. cereus* sont capables de se développer quand elles subissent ce type de stress séparément. Plusieurs études ont décrit le comportement de *B. cereus* en fonction d'un ou de deux de ces facteurs de stress. Certaines ont mis en avant les capacités de *B. cereus* à se développer à de basses températures ainsi qu'à des pH acides dans des milieux variés dont des aliments composés de légumes (Benedict *et al.*, 1993; Jaquette and Beuchat, 1998; Lanciotti *et al.*, 2001; Olmez and Aran, 2005; Sutherland *et al.*, 1996; Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2000). Par exemple, les études de Valero *et al.*, ont montré qu'une souche psychrotolérante de *B. cereus* (INRA TZ415) était capable de croître dans du jus de carotte acidifié et dans du bouillon de courgette à 8 °C en présence d'oxygène (Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2000). D'autres études ont démontré la capacité de croissance de souches de *B. cereus* à basse température et en absence d'oxygène mais à des pH neutres (De Sarrau *et al.*, 2012; Samapundo *et al.*, 2011; Thorsen *et al.*, 2009b).

De plus, plusieurs modèles de prédiction de croissance en fonction de la température, du pH, des souches et du type de milieux existent, comme Sym'Previus et Combase. Sym'Previus est un outil disponible en ligne qui permet d'obtenir des prévisions des données microbiologiques. Ce type d'outil est une aide pour avoir une première idée du comportement possible de microorganismes, comme *B. cereus*, pour les industriels multinationaux, comme

pour les PME, pour le développement de nouveaux produits. Combase est un outil similaire à Sym'Previus, en libre accès et qui permet la prédiction de la croissance ou de l'inactivation des micro-organismes. Cependant l'absence d'oxygène ne peut être appliquée lors d'une prédiction de croissance avec ces outils.

Dans un produit alimentaire composé de légumes, emballé sous vide et conservé à des températures de réfrigération, si *B. cereus* est présent il va faire face à au moins trois facteurs de stress au même moment (froid, bas pH, anaérobiose). Le comportement de *B. cereus* face à ces trois conditions stressantes combinées n'a encore jamais été étudié.

Vis-à-vis des objectifs du projet OPTIFEL, du point de vu de la sécurité microbiologique, il semblait important de comprendre au mieux le comportement possible de cette bactérie pathogène, *B. cereus*, durant toutes les étapes de la vie des futurs produits alimentaires destinés aux personnes âgées.

**Chapitre 2 :
Contexte et Objectifs**

2. Chapitre 2 : Contexte et Objectifs

Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivaient dans le projet Européen OPTIFEL qui avait pour ambition de concevoir de nouveaux produits optimisés pour l'alimentation des personnes âgées en perte d'autonomie, à base de fruits et légumes. Les fruits et légumes ont été choisis car ils offrent une variété importante de goût, de couleur et de texture et qu'ils font partie du répertoire alimentaire des personnes âgées. La sécurité microbiologique de ces produits était un point important du projet sachant que les seniors représentent une population à risque par rapport aux toxi-infections alimentaires (<http://www.optifel.eu/fr>).

Bacillus cereus a été choisi pour cette étude car c'est une bactérie ubiquitaire qui produit des spores résistantes à la chaleur. De plus, cette bactérie pose de plus en plus problèmes dans l'industrie agroalimentaire et est depuis 2012 la deuxième cause de toxi-infections alimentaires collectives en France (InVS, 2012, 2013, 2014). On la retrouve dans les sols, et donc sur les matières premières comme les légumes, qui composent un aliment préparé (Guinebretiere *et al.*, 2003a; Guinebretiere and Nguyen-The, 2003b; Valero *et al.*, 2002). Cette bactérie va premièrement être capable de résister au procédé de transformation et de pasteurisation des produits alimentaires puis deuxièmement certaines souches vont se développer au cours de la conservation (Abee and Wouters, 1999; Carlin *et al.*, 2000; Luu-Thi *et al.*, 2014). Les souches qui vont pouvoir se développer dans le cas d'un stockage au froid sont des souches dites psychrotrophes ou psychrotolérantes (Guinebretière *et al.*, 2008; Lechner, 1998).

Notre étude a donc naturellement cherché à définir les capacités de ce type de souches de *B. cereus* à se développer et à représenter un risque pendant le processus de conservation des produits alimentaires, jusqu'à leur consommation. Pendant ces étapes cette bactérie peut rencontrer des conditions stressantes variées. La conservation à basse température de ces aliments prêts à l'emploi est souvent liée à un conditionnement en absence d'oxygène. De plus les aliments préparés à base principalement de fruits et légumes sont régulièrement à des pH inférieurs à 6,5 (Clavel *et al.*, 2004; Samapundo *et al.*, 2011).

Une première partie de notre étude avait donc pour objectif de définir l'impact de la combinaison de ces multiples conditions stressantes, basse température, pH acide et absence d'oxygène sur la capacité de croissance de souche psychrotolérantes de *B. cereus* (Chapitre 4

et 5). Plusieurs études préalables avaient défini les limites dans lesquelles cette bactérie était capable de se développer pour chacune de ces trois conditions de stress considérée indépendamment (Brillard and Broussolle, 2012; Broussolle *et al.*, 2010; Browne and Dowds, 2002; Choma *et al.*, 2000; Desriac *et al.*, 2013; Jaquette and Beuchat, 1998; Rosenfeld *et al.*, 2005). Puis d'autres études ont montré l'influence de la combinaison de deux de ces facteurs, comme l'étude de la capacité de croissance de multiples souches de *B. cereus* en milieu carotte à différents pH et à basses températures (Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2007). Les travaux de De Sarrau *et al.*, mettent en avant l'influence du froid et de l'anaérobiose sur les mécanismes d'adaptation d'une souche mésophile (De Sarrau *et al.*, 2012). L'objectif de cette première partie était donc de définir l'impact combiné de ces trois facteurs de stress sur la croissance de souches psychrotolérantes, premièrement dans un milieu de laboratoire (Chapitre 4) qui leur était favorable afin de définir des zones de croissances et de non croissances pour des températures inférieures ou égales à 10 °C, puis dans un second temps, tester l'impact d'une matrice alimentaire. Le milieu aliment choisi ici était un bouillon de carotte, celle-ci étant le légume choisi pour les produits conçus dans le projet OPTIFEL (Chapitre 5) (Fig 1).

La seconde partie de notre étude s'est dirigée sur l'analyse de la croissance à basse température de souches émétique et psychrotolérante de *B. cereus* appartenant au groupe phylogénétique VI, ainsi que leur capacité de production de la toxine émétique, le céréulide (Chapitre 6). La découverte de souches psychrotolérantes capable de synthétiser cette toxine émétique, a attiré notre attention sur le risque de production de céréulide dans les produits réfrigérés (Ehling-Schulz *et al.*, 2015; Hoton *et al.*, 2009; Ronning *et al.*, 2015; Rossvoll *et al.*, 2014; Thorsen *et al.*, 2006). Ces souches peuvent représenter un risque majeur si elles se retrouvent dans l'aliment, se développent pendant le stockage au froid et y produisent cette toxine émétique. Si celle-ci est produite dans l'aliment, elle ne pourra être éliminée par un simple réchauffage du plat avant sa consommation car elle est hautement résistante à la chaleur (121 °C pendant 15 min) (Agata *et al.*, 1995; Shinagawa *et al.*, 1996). L'objectif de cette partie était de définir la capacité de croissance de ces souches à de basses températures pour différents pH, tout en déterminant la quantité de toxine émétique produite, afin d'évaluer si ces niveaux de productions, pourraient conduire à des toxi-infections alimentaires. (Chapitre 6) (Fig 1).

La dernière partie de nos travaux s'est portée sur l'étude de la thermo-résistance des cellules végétatives de souches psychrotolérantes de *B. cereus* (Chapitre 7). Dans l'optique où il y aurait eu croissance de ces souches dans l'aliment durant l'étape de stockage au froid, il serait important de savoir si un simple réchauffage pourrait détruire les cellules végétatives de *B. cereus*. La thermorésistance des spores de *B. cereus* a été largement étudiée (Luu-Thi *et al.*, 2014), contrairement à celle des cellules végétatives. Nous avons donc mesuré les paramètres de thermorésistance des cellules végétatives d'un panel de souches psychrotolérantes de *B. cereus*. (Chapitre 7) (Fig 1).

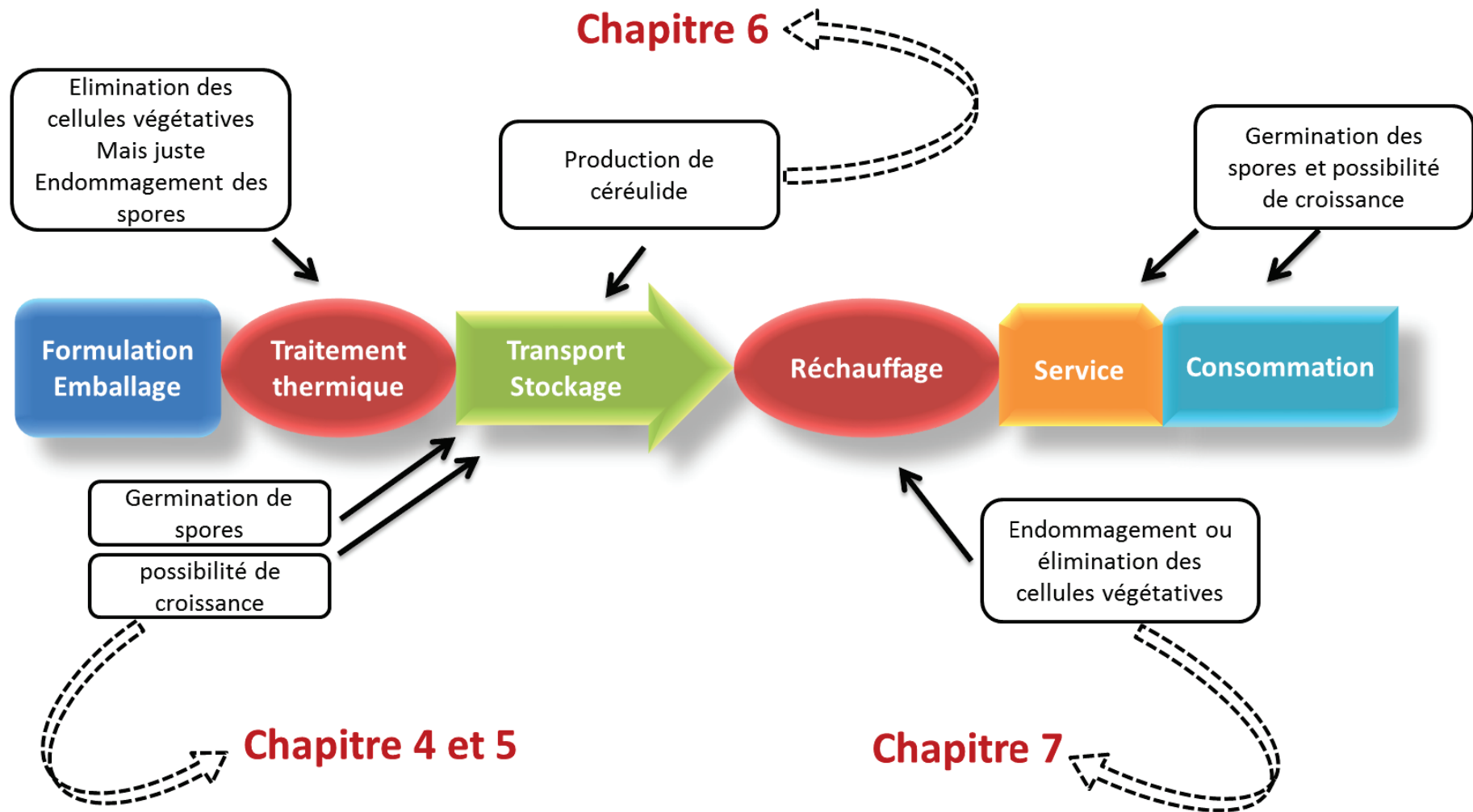


Figure 1 : Comportements possible de *Bacillus cereus* lors de la vie du produit alimentaire

**Chapitre 3 :
Matériels et Méthodes**

3. Chapitre 3 : Matériels et méthodes

3.1. Souches de *Bacillus cereus*

Ce travail a été focalisé sur l'étude de souches de *Bacillus cereus* susceptibles de pouvoir se développer durant les phases de réfrigération de produits alimentaires. Il s'agit de souches psychrotolérantes appartenant aux groupes phylogénétiques II, V et VI définis par Guinebretière *et al.*, (2008). L'étude de la croissance à basse température en milieux de laboratoire et dans différentes conditions (pH, aérobiose et anaérobiose) a été réalisée avec les souches *B. weihenstephanensis* KBAB4 et *B. cereus* ADRIA I21 appartenant toutes deux au groupe phylogénétique VI. La souche *B. weihenstephanensis* KBAB4 a aussi servi à l'étude de la croissance dans du bouillon de carotte dans différentes conditions (températures, aérobiose et anaérobiose). Pour l'étude de la thermo-résistance des cellules végétatives de souches psychrotolérantes de *B. cereus*, deux souches appartenant à chaque groupe phylogénétique II, V et VI ont été utilisées ainsi que, à titre de comparaison, deux souches thermotolérantes du groupe phylogénétique VII :

- Groupe phylogénétique II : RIVM BC 938 et RIVM BC 485
- Groupe phylogénétique V : PHLS F2769/77 et INRA SB'
- Groupe phylogénétique VI : KBAB4 et ADRIA I21
- Groupe phylogénétique VII : AFFSA 08 CEB 44 BAC et NVH 391-98

L'étude de la production de céréulide à basse température et à différents pH a été réalisée avec deux souches émétiques et psychrotolérantes appartenant au groupe phylogénétique VI, *B. weihenstephanensis* BtB2-4 et MC67.

Les souches de *B. cereus* du groupe VI utilisées dans cette étude ont aussi été identifiées comme des *Bacillus weihenstephanensis*, espèce comprenant certaines souches psychrotolérantes de *B. cereus*. Ces souches seront dénommées *B. cereus* groupe VI ou *B. weihenstephanensis* dans la suite du mémoire.

3.2. Milieux de croissance

3.2.1. BHI

Les croissances à basse températures (Chapitre 4) ainsi que l'étude de la thermo-résistance des cellules végétative de *B. cereus* (Chapitre 7) et la majorité des précultures ont été réalisées en Brain Heart Infusion (BHI) contenant 17,5 g/l d'extrait de levure, 10 g/l de peptone pancréatique de gélatine, 5 g/l de chlorure de sodium (NaCl), 2,5 g/l de phosphate disodique (NaH_2PO_4) et 2 g/l de glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$). Les ajustements de pH ont été réalisés grâce à de l'acide chlorhydrique 1N ou 6N (HCl) avant autoclavage à 121 °C pendant 20 min et vérifiés par la suite. L'oxygène fut éliminé pour les cultures en anaérobiose en tube Hungate par bullage du milieu sous flux d'azote, préalablement débarrassé des traces d'oxygène par passage sur une colonne de Hungate. Les tubes de milieu ont été stérilisés à l'autoclave (120 °C, 20 min).

3.2.2. TSB

Le milieu Tryptic Soy Broth (TSB) a servi pour les précultures destinées à l'étude de la production de céréulide par des souches psychrotolérantes (Chapitre 6). Il contient 17,0 g/l de tryptone, 3 g/l de peptone papaïnique de soja, 2,5 g/l de glucose, 2,5 g/l de phosphate dipotassique (K_2HPO_4) et 5 g/l de chlorure de sodium.

3.2.3. PCA

Le milieu Plate Count Agar (PCA) a été utilisé pour réaliser les croissances sur boîte des souches psychrotolérantes et émétiques de *B. cereus* (Chapitre 6). Ce milieu est composé de 2,5 g/l d'extrait de levure, 5 g/l de peptone pancréatique de caséine, 1 g/l de glucose et 15 g/l d'agar. Pour certaines cultures ce milieu a été acidifié avant autoclavage avec de l'acide chlorhydrique 6N (HCl).

3.2.4. TSA

Ce milieu a aussi servi pour des cultures sur boîte lors de l'étude de la production de céroïde par des souches psychrotolérantes de *B. cereus* (Chapitre 6). Il est composé de 15 g/l de peptone pancréatique de caséine, 5 g/l de peptone papaïnique de soja, 5 g/l de chlorure de sodium et 15 g/l d'agar.

3.2.5. LB agar

Le milieu Luria-Bertani agar a principalement servi pour les suivis de croissance par dénombrement sur boîtes de gélose. Il contient 10 g/l de tryptone, 5 g/l d'extrait de levure, 10 g/l de chlorure de sodium et 15 g/l d'agar.

3.2.6. Bouillon de carotte

Dans le Chapitre 5 des tests de croissance ont été réalisés dans du bouillon de carotte préparé de 4 manières différentes avec des carottes de type nantaise :

Préparation 1

Les carottes ont été lavées, épluchées et râpées et mises dans des sachets sous vide (entre 100 et 150 g par sachet). Par la suite, ces sachets ont été plongés dans un bain marie à 80 °C pendant 25 min. Les carottes râpées cuites ont ensuite été transvasées dans des sachets stomacher avec filtre intégré (< 100 g/sachet). Pour 50 g de carottes râpées cuites, 100 ml de tampon phosphate à pH $7,0 \pm 0,2$ ont été ajoutés. L'ensemble a été malaxé au stomacher pendant 2 min puis filtré grâce au filtre intégré. Ce bouillon de carotte a été réparti dans des tubes KIMAX qui ont servi aux cultures en aérobiose et dans des flacons Amsco (entre 100 et 150 ml/flacon), ainsi que dans des tubes Hungate, pour celles en anaérobiose (10 ml/tube). Après avoir éliminé l'oxygène des tubes Hungate et des flacons Amsco par bullage sous flux d'azote grâce à une colonne de Hungate, un processus de stérilisation appelé tyndallisation a été réalisé. La tyndallisation consiste en une étape de chauffage à 80 °C durant 1 h répétée à trois reprises espacées de 24 h à chaque fois, à température ambiante et dans le noir. Ces bouillons de carotte sont ensuite conservés à température ambiante et dans le noir.

Préparation 2

Les carottes ont été lavées, épluchées et râpées et mises avec un peu d'eau stérile dans un récipient en verre et chauffées au microonde 6 min à 450 W. Ces carottes râpées ont ensuite été transférées dans des sachets stomacher et ont subi le même traitement que dans la préparation 1.

Préparation 3

Les carottes ont été lavées, épluchées et passées dans un extracteur de jus. Le jus ainsi que la pulpe ont été récupérés et dilués avec du tampon phosphate à pH $7,0 \pm 0,2$ comme précédemment et stérilisés aussi par un processus de tyndallisation.

Préparation 4

Les carottes ont été lavées, épluchées et coupées en rondelles puis cuites à la vapeur pendant 12 min grâce à un Nutricook (SEB). Les rondelles de carottes cuites ont ensuite été malaxées dans du tampon phosphate avec un stomacher comme dans les préparations précédentes. Par contre le processus de stérilisation n'était pas par tyndallisation mais par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

3.2.7. Ajout de phosphatidylcholine dans le milieu

Une solution mère à 12,5 mg/ml (L- α -phosphatidylcholine, Sigma) a été préparée dans du tampon phosphate pH $7,0 \pm 0,2$ stérilisée par filtration à 0,2 μ m puis ajoutée au milieu de culture stérile afin d'obtenir une concentration de 125 μ g/ml.

3.3. Stock de souches bactériennes à -80 °C

Un stock de souches conservé à -80 °C a été réalisé pour toutes les souches de cette étude. A partir de boîtes LB agar inoculées par stries et incubées à 30 °C sur la nuit. Deux ou trois colonies ont servi à ensemercer 10 ml de milieu BHI en tubes KIMAX. Les tubes ont été incubés à 20 °C sur la nuit avec une agitation de 200 rpm. Cette préculture a servi à inoculer 100 ml de BHI en erlenmeyer à une densité optique à 600 nm initiale de 0,01 (DO_{600}). Puis cet erlenmeyer fût incubé à 20 °C sous agitation (200 rpm) jusqu'à DO_{600} de 0,5

correspondant à la phase exponentielle de croissance. Des aliquotes de cette culture ont été mélangés avec du glycérol 80 % afin d'obtenir une concentration finale de glycérol à 30 %, puis stockés à -80 °C. Une cinquantaine d'aliquotes était réalisée par souche en moyenne. Pour deux souches thermotolérantes du groupe phylogénétique VI les étapes à 20 °C ont été réalisées à 37 °C.

3.4. Préparation des précultures

La majorité des précultures des différentes souches psychrotolérantes de *B. cereus* utilisées dans ces études ont été réalisées à 20 °C afin d'avoir une préadaptation progressive aux basses températures.

Pour les cultures en milieu BHI du Chapitre 4 les précultures se sont faites en deux temps. Une première préculture a été faite à partir de suspensions bactériennes conservées à -80 °C. 10 ml de BHI en tube KIMAX furent inoculés avec 100 µl de suspension bactérienne et incubés à 20 °C sous agitation (200 rpm). Quand cette première préculture atteignait une DO₆₀₀ de 0,5, 100 µl de celle-ci ont servi à inoculer à nouveau 10 ml de BHI en tubes KIMAX incubés à 10 °C cette fois ci, toujours sous agitation (200 rpm) jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,5. Cette seconde préculture a servi à ensemercer les différentes cultures de 10 ml de BHI en tubes KIMAX ou Hungate à une concentration initiale de 10² UFC/ml.

Les précultures ayant servi à l'inoculation de bouillons de carotte ou de BHI du Chapitre 5 ont aussi été réalisées à partir des stocks à -80 °C. Cent µl ont servi à inoculer 10 ml de BHI en tubes KIMAX incubés à 20 °C sous agitation (200 rpm) jusqu'à obtenir une DO₆₀₀ de 0,5 (environ 9 h). Cette préculture a servi à ensemercer les différents bouillons de carotte et les tubes de milieu BHI à une concentration initiale de 10³ ou 10⁶ UFC/ml.

Pour l'étude concernant la production de céréulide à basses températures (Chapitre 6) les précultures n'ont pas été réalisées en BHI comme les précédentes. A partir du stock à -80 °C, des boîtes de PCA ont été inoculées par stries et incubées à 30 °C sur la nuit. Trois colonies ont servi à ensemercer 10 ml de TSB incubé à 20 °C sous agitation (200 rpm) pendant une durée de 18 à 20 h afin d'atteindre une concentration d'environ 10⁸ UFC/ml. Par la suite cette préculture a été transférée à 4 °C pour une préadaptation au froid des cellules

bactériennes pendant 18 à 21 h. Cette préculture a ensuite servi à l'ensemencement de boîtes de PCA ou TSA à une concentration initiale de 10^2 UFC/boîte.

Les cultures ayant servi à l'étude de la thermo-résistance des cellules végétatives de *B. cereus* (Chapitre 7) n'ont pas nécessité de précultures et ont été inoculées directement à partir des suspensions bactériennes conservées à -80 °C.

3.5. Cultures en milieu liquide

3.5.1. Conditions aérobies

Toutes les cultures en condition aérobie de cette étude ont été réalisées dans des volumes de 10 ml contenus dans des tubes KIMAX.

Dans le Chapitre 4 l'ensemencement a été fait afin d'obtenir une concentration initiale de 10^2 UFC/ml par tubes de BHI. Les cultures ont été réalisées à différents pH ajustés avant autoclavage du milieu avec du HCl (1N ou 6N), en tenant compte de la modification induite par l'autoclavage, puis vérifiés après la stérilisation. Les cultures ont ensuite été faites à 8 et 10 °C sous agitation (200 rpm). Un dénombrement de la population bactérienne a été réalisé une à deux fois par jour.

Dans le Chapitre 5 les cultures en bouillon de carotte ou BHI ont débuté à des concentrations initiales de 10^3 ou 10^6 UCF/ml. Elles ont été, par la suite, incubées à 8 ou 30 °C sous agitation (200 rpm). Le suivi de croissance a été réalisé par dénombrement sur boîte de milieu gélosé (LB).

Pour l'étude de la thermo-résistance des cellules végétatives de *B. cereus* (Chapitre 7), les cultures ont été réalisées aux températures optimales de croissance, soit 30 °C pour les souches des groupes phylogénétiques II, V et VI et à 37 °C pour les souches du groupe VII. Elles ont été réalisées aussi à partir de 100 µl de suspension bactérienne conservée à -80 °C dans 10 ml de BHI en tube KIMAX et incubées à 30 °C ou 37 °C pendant 15 à 17 h afin d'obtenir une concentration d'environ 10^8 UFC/ml (phase stationnaire).

Toutes les conditions testées ont été répétées trois fois, à partir de trois inoculums différents.

3.5.2. Conditions anaérobies

Les cultures en anaérobiose ont toutes été réalisées en tubes Hungate, dans lesquels l'oxygène a été éliminé par bullage sous flux d'azote, fermés hermétiquement par des septums en butyl.

Les ensemencements des tubes Hungate ont été réalisés aux mêmes concentrations initiales que les tubes en condition d'aérobiose (KIMAX) et incubés de la même façon (Chapitre 4 et 5). L'ensemencement de ces tubes a été fait par injection de 100 μ l à travers le septum grâce à une seringue de 1 ml. Chaque dénombrement était fait à partir d'un tube qui était éliminé par la suite. Tous les tubes nécessaires pour l'ensemble d'une cinétique de croissance ont été ensemencés de la même manière et incubés dans les mêmes conditions. Toutes les conditions testées ont été répétées trois fois, à partir de trois inoculums différents.

3.6. Cultures en milieu solide

Les croissances effectuées dans le Chapitre 6 ont été réalisées sur milieux solide et non liquide comme pour les autres études. Plusieurs boîtes de TSA et de PCA acidifiées ou non avec du HCl 6N, ont été ensemencées de la même manière afin d'obtenir une concentration initiale de 10^2 UFC/boîte. Pour chaque dénombrement l'ensemble des colonies présentes sur la surface de la gélose était récupéré grâce à 2 ml d'eau permutée stérile à l'aide de râteau en plastique stérile. Chaque suspension bactérienne récupérée fût dénombrée puis conservée à -20 °C pour réaliser l'extraction de la toxine émétique (Rossvoll *et al.*, 2014). Toutes les conditions testées ont été répétées trois fois, à partir de trois inoculums différents.

3.7. Suivi de la croissance

Les suivis de croissance des précultures ont été réalisés par suivi de DO_{600} . Concernant toutes les cultures réalisées dans les différents chapitres, le suivi de croissance a été réalisé par une étape de dilution en série en Eppendorf de 1,5 ml contenant 900 μ l d'eau permutée stérile, puis par étalement de 100 μ l des trois dilutions choisies sur boîtes de LB incubées à 30 °C pendant la nuit ou à température ambiante sur 48 h.

Les paramètres de croissance comme le temps de latence, le taux de croissance, le niveau maximum de population ont été déterminés grâce au modèle de Rosso *et al.*, (Rosso *et al.*, 1995). Dans le Chapitre 4 ces paramètres ont aussi été déterminés, en parallèle, avec le modèle de Baranyi and Roberts (Baranyi *et al.*, 1993) et de Gompertz (Zwietering *et al.*, 1990).

3.8. Extraction de la toxine émétique

L'extraction de céréulide s'est faite à partir des échantillons conservés à -20 °C durant le suivi de croissance sur boîtes. 1,4 ml de chaque échantillon fût transféré dans des microtubes de 2 ml avec bouchon à vis, contenant 0,3 g de sphères de silice de 0,1 mm de diamètre. Les cellules bactériennes ont été broyées pendant 45 s à 1500 bpm (battements par minute) grâce à un Mini-GTM. Après une centrifugation à 19000 g pendant 3 min, 1 ml du surnageant a été récupéré pour chaque échantillon et transféré dans un tube en verre de 10 ml. 10 ng de standard interne, $^{13}\text{C}_6$ -cereulide (Chiralix) et 1 ml de méthanol, de qualité LC-MS, ont été ajoutés à chaque échantillon (Fig 1). Chaque échantillon a été ensuite mélangé au vortex pendant 30 s et évaporé à 80 °C sous un flux d'azote. Quand la totalité de l'échantillon fût évaporée, 1 ml de méthanol a été ajouté à nouveau et le tube centrifugé à 5000 g pendant 5 min. Le surnageant a été récupéré dans un nouveau tube en verre de 10 ml et évaporé à nouveau à 80 °C sous azote. Après évaporation à sec, 100 µl de mélange méthanol/eau permutée stérile (3/1) ont été ajoutés dans chacun des tubes en verre et mélangés au vortex 30 s. Ces 100 µl ont ensuite été centrifugés en une courte impulsion pour faire redescendre la totalité de l'échantillon des parois du tube puis transférés dans un microtube contenant une colonne à filtre de 0,2 µm en nylon et centrifugé à 10000 g pendant 1 min. Les échantillons filtrés ont été ensuite transférés dans des vials HPLC contenant un insert de 100 µl et conservés à -20 °C jusqu'au moment de l'analyse en LC-MSMS. Dans les étapes précédentes, les liquides ont été prélevés à l'aide de seringues Hamilton de 1 ml ou 100 µl, rincées à trois reprises avec du méthanol et séchées entre chaque prélèvement.

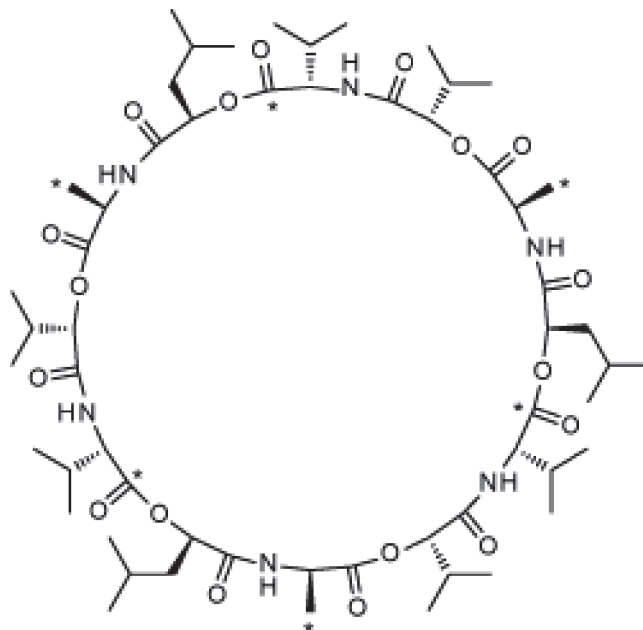


Figure 1 : $^{13}\text{C}_6$ -céréulide (Chiralix, <http://www.chiralix.com/rightclick.cfm?id=67337>)

3.9. Courbe de calibration

La courbe de calibration a été réalisée par addition de céréulide (Chiralix) dans une suspension de cellules végétatives d'une souche non émétique, *B. weihenstephanensis* KBAB4, produite sur boîtes de PCA à 30 °C et fraîchement broyées comme précédemment. Le céréulide était ajouté à ce broyat de cellules avant l'étape d'extraction, à des concentrations de 0,1 ; 1,0 ; 5,0 ; 10,0 ; 50,0 et 100,0 ng/ml, ainsi que le standard interne $^{13}\text{C}_6$ -céréulide (Fig 1). Trois échantillons ont été réalisés pour chaque concentration de céréulide ajoutée, soit un total de 18 échantillons. Par la suite, l'extraction décrite précédemment a été réalisée pour ces échantillons ainsi que pour des contrôles : extrait de KBAB4 sans ajout de céréulide ni de $^{13}\text{C}_6$ -céréulide ; extrait de KBAB4 avec 10,0 ng/ml de cereulide ou 10,0 ng/ml de $^{13}\text{C}_6$ -cereulide.

3.10. Dosage de la toxine émétique par analyses de LC-MSMS

L'analyse du céréulide par LC-MS/MS a été réalisé avec le protocole présenté dans l'article de Rønning *et al.*, (2015) en utilisant un système de LC Agilent 1200 SL (Agilent

Technologies, Waldbronn, Germany) couplé avec un système de MS/MS Agilent G6460 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (Ronning *et al.*, 2015).

3.11. Détermination de la thermo-résistance de cellules végétatives de *B. cereus*

3.11.1. Traitement à la chaleur des cellules végétatives de *B. cereus*

Les cultures des différentes souches de *B. cereus* en phase stationnaire ont été centrifugées à 5000 g pendant 5 min à température ambiante, puis les cellules végétatives ont été remises en suspension dans 10 ml de BHI stérile.

Les tests d'inactivation ont été réalisés en deux exemplaires en utilisant des capillaires de 100-200 µl. A chaque temps et pour chaque température de chauffage testés, 100 µl de suspension de cellules végétatives de *B. cereus* ont été injectés dans un capillaire scellé au chalumeau, placé dans de la glace quelques minutes, le temps de préparer tous les capillaires nécessaires. Par la suite les capillaires ont été incubés dans un bain marie thermostaté, à différentes températures allant de 40 °C à 68 °C pendant 0 min à 15 min. A chaque temps de prélèvement, les capillaires concernés étaient sortis du bain marie et refroidis rapidement en les plaçant dans de la glace afin d'arrêter l'effet de la chaleur sur les cellules végétatives. La surface des capillaires a été désinfectée avec de l'éthanol à 70 %, les extrémités ont été cassées et les suspensions furent diluées avec de l'eau permutée stérile. Les cellules végétatives viables ont été dénombrées par la suite sur boîte de LB agar. Toutes les conditions testées ont été répétées trois fois, avec trois inoculums différents.

3.11.2. Modélisation des courbes de survie

Pour toutes les températures testées, les courbes de survie ont été réalisées avec le modèle proposé par Mafart *et al.*, (2002) basé sur la distribution de Weibull (Mafart *et al.*, 2002):

$$\log N = \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right)^{p^*}$$

N correspond à la population bactérienne au temps t (UFC/ml) ; N_0 est la population initiale (UFC/ml), δ correspond au temps en min de la première réduction d'un facteur 10 de la population initiale et p^* est le paramètre définissant la forme de la courbe de survie. La

valeur de p^* est supérieure à 1 si la courbe de survie est de forme convexe, p^* est égale à 1 quand elle est linéaire et inférieure à 1 quand elle est concave. Une seule valeur de p^* a été définie par souche de *B. cereus* testée. Les valeurs de p^* et de δ ont été déterminées par la fonction Solver du logiciel Microsoft® Excel 2010. Les valeurs de z qui correspondent à l'augmentation de la température nécessaire pour obtenir une réduction de 10 du facteur δ , ont été déterminées pour toutes les souches de *B. cereus* à partir de la droite de régression de $\log_{10} \delta$ en fonction de la température, en utilisant Microsoft® Excel 2010.

Pour comparer la thermo-résistance des cellules végétatives des différentes souches de *B. cereus*, la température à laquelle δ égale 1 min, notée $T_{\delta=1}$ en °C (Luu-Thi et al., 2014) a été calculée. L'impact de la chaleur a été évalué par la détermination du temps nécessaire pour avoir une réduction de la population bactérienne de 6 $\log_{10}$ UFC/ml, notée $t_{-6\log(T)}$ en min.

3.12. Microscopie à contraste de phase et épifluorescence

3.12.1. Matériel de microscopie

Les observations microscopiques ont été réalisées grâce à un microscope à contraste de phase Olympus BX 50 (Rungis, France) avec un module de lumière fluorescente BX-FLA. Puis les images ont été obtenues grâce à une caméra coolSNAP EZ (Tucson, USA) et traitées avec les logiciels Micromanager et PMC Capture Pro pour les observations de microscopie à fluorescence.

3.12.2. Observations en contraste de phases

La majorité des observations microscopiques des différentes cultures des souches de *B. cereus* ont été réalisées en contraste de phase. Les images ont été faites à l'objectif X 100 (grossissement X 1000).

3.12.3. Observation des inclusions lipidiques par coloration au Rouge de Nile

La présence d'inclusions lipidiques fut vérifiée par une coloration au Rouge de Nile. 5 μ l de Rouge de Nile (Sigma) ont été ajoutés à 100 μ l de suspension bactérienne, puis mélangés au vortex et incubés à 37 °C dans le noir pendant 10 min. Par la suite, une

centrifugation à 4000 g a été réalisée pendant 10 min et le surnageant fut éliminé et remplacé par 100 µl de tampon phosphate salin (PBS) avec du tween 80 afin de rincer les cellules. Cette étape a été réalisée à deux reprises et les cellules ont finalement été suspendues dans 100 µl de PBS et observées en microscopie à fluorescence avec l'aide d'un filtre vert (« G excitation cube Wide band ; U-MWB ; exciter filter BP510-550 »). Les inclusions lipidiques apparaissent de couleur rouge. Les images en microscopie à contraste de phase ont été prises en parallèle des images en microscopie à fluorescence.

3.12.4. Observation de la viabilité des cellules par coloration au Live/dead

L'observation des cellules viables et non viables a été réalisée par une coloration de Live/dead (Invitrogen, Eugene, USA). Trois µl du mélange de solutions A et B (50/50) ont été ajoutés à 1 ml de suspension bactérienne et mélangés au vortex. Cette suspension a été incubée dans le noir, à température ambiante (20-22 °C) pendant 15 min. L'observation en microscopie à fluorescence s'est faite avec l'aide d'un filtre bleu (« B excitation cube Wide band ; U-MWB ; exciter filter BP450-480 »), avec lequel les cellules viables apparaissaient vertes et les non viables rouges, ainsi qu'avec le filtre vert, avec lequel seules les cellules non viables rouges étaient visibles. Les images ont été obtenues avec ce dernier filtre, en parallèle des images de microscopie à contraste de phases. La proportion de cellules viables et non viables a été déterminée par comptage des cellules de différentes couleurs sur 5 champs d'observations différents, représentant un total de 632 cellules.

Chapitre 4 :

Effets combinés de l'anaérobiose, des bas pH et des basses températures sur les capacités de croissance des *Bacillus cereus* psychrotrophes

4. Chapitre 4 : Effets combinés de l'anaérobiose, des bas pH et des basses températures sur les capacités de croissance des *Bacillus cereus* psychrotrophes

4.1. Introduction

Les spores des souches psychrotolérantes de *B. cereus* sont capables de survivre au processus de pasteurisation puis de germer et de se développer à basse température (Carlin *et al.*, 2013; Guinebretière *et al.*, 2008; Luu-Thi *et al.*, 2014). Ces souches psychrotolérantes peuvent donc représenter un risque pendant les étapes de stockage à basse températures et de transports des produits alimentaires comme les produits développés dans le projet OPTIFEL par exemple.

Plusieurs études ont mis en avant leur capacité à croître dans des aliments contenant des légumes à basses températures ainsi qu'à des pH variés (Benedict *et al.*, 1993; Jaquette and Beuchat, 1998; Lanciotti *et al.*, 2001; Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2000). Par exemple, la souche psychrotolérante INRA TZ415 est capable de se développer à une température de 8 °C dans du jus de carottes acidifié ou encore dans un bouillon de courgettes (Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2000). Ces études ont été réalisées en présence d'oxygène, cependant les produits alimentaires peuvent être conditionnés sous vide ou avec une atmosphère sans oxygène. D'autres études ont mis en avant qu'un taux plus faible voir l'absence d'oxygène limite la croissance de *B. cereus* (De Sarrau *et al.*, 2012; Samapundo *et al.*, 2011). Cependant ces études ont été réalisées à des pH neutres (entre 6 et 7). Les produits à bases de légumes peuvent avoir des pH plus acides et ce facteur est important à prendre en compte. En résumé, plusieurs combinaisons de stress entre deux des trois conditions basse température, bas pH et anaérobiose ont été étudiées : basses températures et anaérobiose à un pH neutre (De Sarrau *et al.*, 2012; Samapundo *et al.*, 2011; Thorsen *et al.*, 2009b) d'une part ; baisse de pH et de température mais en présence d'oxygène (Olmez and Aran, 2005; Sutherland *et al.*, 1996) d'autre part. L'étude combinée des trois conditions n'a jamais été réalisée.

A travers cette étude nous avons déterminé l'impact de l'absence d'oxygène sur la capacité de croissance de deux souches psychrotolérantes appartenant au groupe

phylogénétique VI (*B. cereus* KBAB4 et *B. cereus* ADRIA I21) dans un milieu de laboratoire (BHI) à pH acide (jusqu'à un pH égale à 5,0) et à de basses températures (8 et 10 °C).

4.2. Résultats et discussion

Nous avons tout d'abord déterminé l'effet de différentes préadaptations au froid des cellules végétatives de ces deux souches de *B. cereus* via des protocoles de précultures variés. Nous avons mis en avant qu'une préadaptation progressive, avec une étape de préculture à 20 °C, suivi d'une deuxième puis à 10 °C, avant le lancement des cultures à 8 °C ou 10 °C, diminue le temps de latence en début de culture (Fig 1).

Des cultures ont été conduites soit dans des tubes KIMAX en présence d'oxygène ou en tubes Hungate, à différents pH allant de 5,0 à 7,0 et à 8 °C ou 10 °C. Les analyses de suivi de croissance par dénombrement ont permis de mettre en avant que l'absence d'oxygène augmente la valeur de pH limite dans des conditions de croissance à basses températures. A une température de 10 °C, les deux souches psychrotolérantes de *B. cereus* ont été capables de croître à un pH de 5,4 en présence d'oxygène dans le milieu mais sans oxygène le pH limite était de 5,7 (Fig 2 et 3). Toutefois, seule la souche KBAB4 fût capable de croître à un pH de 5,7 en absence d'oxygènes, avec un taux de croissance ($\mu_{\max}$) similaire à celui obtenu à un pH de 7,0, elle semble donc mieux adaptée à l'absence d'oxygène que la souche ADRIA I21. L'absence d'oxygène limitait les $\mu_{\max}$ de la souche ADRIA I21 mais pas ceux de KBAB4. Par contre le temps de latence augmentait pour les deux souches en absence d'oxygène. L'anaérobiose semble donc augmenter le temps d'adaptation des cellules avant la phase exponentielle de croissance. La valeur de $N_{\max}$ a été diminuée en anaérobiose, le taux maximal de population était proche de 6 log₁₀ UFC/ml en anaérobiose et aux alentours de 8 log₁₀ UFC/ml en aérobiose (Tableau 1). Ce phénomène avait été observé avec des souches mésophiles de *B. cereus* à des températures plus élevées que dans cette études (De Sarrau *et al.*, 2012) mais aussi avec des cultures de souches psychrotrophes dans de la purée de légume (Samapundo *et al.*, 2011). La baisse de température en anaérobiose limitait la croissance à des pH acides. A 8 °C en anaérobiose la souche KBAB4 a été capable de croître seulement à pH 7,0 (Fig 2B). En présence d'oxygène, le $\mu_{\max}$ de la souche KBAB4 était constant sur tout le domaine de pH de croissance, contrairement à la souche ADRIA I21 dont le $\mu_{\max}$ diminuait quand le milieu était acidifié (Tableau 1).

Chapitre 4 : Effets combinés de l'anaérobiose, des bas pH et des basses températures sur les capacités de croissance de *Bacillus cereus* psychrotrophes

Il n'y a pas eu d'études antérieures décrivant la croissance de *B. cereus* en condition d'anaérobiose à basse température et à des pH acides, limitant ainsi la comparaison de nos résultats à des études réalisées à des pH proches de 7,0. Les résultats de croissance obtenus dans notre étude sont cohérents avec des croissances de souches psychrotrophes de *B. cereus* dans des purées de légumes à des pH allant de 6,15 à 6,3, à 8 °C (Samapundo *et al.*, 2011). Ils avaient obtenu une valeur de $\mu_{\max}$ aux environs de $0,03 \text{ h}^{-1}$, ce qui est similaire à ce qui a été observé pour la souche ADRIA I21 à 8 °C pH 7,0 ($0,04 \text{ h}^{-1}$). Puis leurs valeurs de $N_{\max}$ allaient de $4,49 \log_{10} \text{ UFC/g}$ et $5,35 \log_{10} \text{ UFC/g}$, en fonction du type de purée, similaires aux de ADRIA I21 en BHI ($N_{\max}$ de $4,79 \log_{10} \text{ UFC/ml}$).

Comme vu précédemment en présence d'oxygène le pH limite à 8 °C et 10 °C était de 5,4 ce qui correspond aussi au résultat trouvé préalablement lors d'une culture d'un mélange de deux souches psychrotrophes dans de la purée de carotte acidifiée (Valero *et al.*, 2003). Cependant les taux de croissances observés dans les études menées par Valero *et al.*, sont plus faible que ceux obtenues dans notre étude (Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2000). Dans une autre étude, aucune croissance n'avait été observée à 8 °C et à des pH inférieurs à 6,5 (Benedict *et al.*, 1993). Ces résultats nous ont permis de conclure que la souche KBAB4 semble avoir une bonne capacité d'adaptation à des conditions de basses températures couplées à de bas pH.

4.3. Combined effect of anaerobiosis, low pH and cold temperatures on the growth capacities of psychrotrophic *Bacillus cereus*

Article publié dans "Food Microbiology" 59 (2016) : 119-123

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.015>

Combined effect of anaerobiosis, low pH and cold temperatures on the growth capacities of psychrotrophic *Bacillus cereus*

Alizée Guérin, Claire Dargaignaratz, Véronique Broussolle,

Thierry Clavel and Christophe Nguyen-the^{*}

UMR408 SQPOV « Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale », INRA, University of Avignon, 84000 Avignon, France

*Corresponding author. Mailing address: INRA, UMR408, site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9, France. Phone: +33 (0)4 32 72 25 21 Fax: +33 (0)4.32.72.24.92, Email: Christophe.nguyen-the@avignon.inra.fr

Abstract

Psychrotrophic strains of the foodborne pathogen *Bacillus cereus* can multiply during the refrigerated storage of food products. The aim of this study was to determine the impact of anaerobiosis on the growth of two psychrotrophic *B. cereus* strains exposed to acidic pH at a cold temperature in a laboratory medium. At 10 °C, growth occurred at pH values equal to or higher than 5.7 during anaerobiosis, whereas aerobic growth was observed from pH 5.4. Growth rates during aerobiosis were similar at pH 5.4 and pH 7. No growth was observed for the two tested strains at 8 °C without oxygen regardless of the pH; however, both strains grew at this temperature from pH 5.4 in the presence of oxygen. These pH growth limits in aerobiosis are consistent with those reported for different strains and different foods or media, but no other studies have described anaerobic growth at acidic pH values. The maximal *B. cereus* concentration was approximately 6.0 log₁₀ CFU/ml for cultures in the absence of oxygen and approximately 8.0 log₁₀ CFU/ml for cultures in the presence of oxygen. In conclusion, we found that the combination of anaerobiosis, pH<5.7 at 10°C, or anaerobiosis and temperatures ≤ 8°C prevent psychrotrophic *B. cereus* growth.

Keywords

Acid; low temperature; oxygen; growth limits

Introduction

B. cereus was reported as the second leading cause of foodborne illnesses between 2006 and 2010 in France (INVS, 2012), and it is an increasing cause of foodborne outbreaks in the EU (EFSA, 2012, 2013, 2014, 2015). *B. cereus* produces heat-resistant spores (Luu-Thi *et al.*, 2014), and some strains are able to grow at refrigeration temperatures; thus, these bacteria can contaminate different types of food, such as Refrigerated Processed Foods of Extended Durability (REPFEDs), particularly those containing vegetables (Choma *et al.*, 2000; Daelman *et al.*, 2013; Del Torre *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2012).

B. cereus psychrotrophic strains are able to survive to pasteurization treatments (Luu-Thi *et al.*, 2014). The risk depends on their ability to grow at cold temperatures during product storage and transport (Carlin *et al.*, 2013; Guinebretière *et al.*, 2008). However, food products containing fruits and vegetables have different levels of acidity. The capacity of several *B. cereus* strains to grow at cold temperatures was studied, at various pH values, in laboratory medium or in food products such as natural and acidified carrot substrates or zucchini broth at pH 6.5 (Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2000). These studies were done in the presence of air, but food products can also be packaged in the absence of oxygen to prevent oxidative deterioration. Some studies previously showed that oxygen limitation can reduce the growth of *B. cereus* (De Sarrau *et al.*, 2012; Samapundo *et al.*, 2011), but these studies only evaluated growth at neutral pH values. The following combinations of pH, temperature and anaerobiosis have been examined: i) low temperatures and anaerobiosis at neutral pH (De Sarrau *et al.*, 2012) (Samapundo *et al.*, 2011) and ii) pH and temperatures in aerobic conditions (Fernández *et al.*, 2002; Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2000). Moreover, models of *B. cereus* growth as a function of pH, temperature, a_w were developed in the presence of oxygen (Olmez and Aran, 2005; Sutherland *et al.*, 1996).

The goal of the present study was to determine the impact of anaerobic conditions (e.g., by vacuum packaging) on the potential development of *B. cereus* in foods varying in pH and stored at low temperatures. The impact of acidification on *B. cereus* growth at cold temperature and anaerobic conditions was also assessed.

Materials and methods

Strains and media

Two *B. cereus* strains able to grow at cold temperatures, as described by (Carlin *et al.*, 2013), were used. Strain INRA KBAB4 was isolated from forest soil (Sorokin *et al.*, 2006; Vilas-Boas *et al.*, 2002), and strain ADRIA I21 was isolated from food by ADRIA Normandie (Villiers Bocage, France).

Growth experiments were performed in Brain Heart Infusion (BHI; Biokar) broth acidified with HCl 1N or 6N after autoclaving to achieve final pH values of 5.0, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7 and 7.0.

Growth conditions

The stock of cultures for the whole study consisted in suspensions of exponential phase cells (OD₆₀₀ of 0.5) in 30 % final concentration of glycerol, stored at -80 °C.

10 ml of BHI were inoculated in KIMAX tubes with 100 µl of the frozen cultures and incubated at 20 °C under shaking at 200 rpm. When this culture reached an OD₆₀₀ of 0.5, 100 µl were used to start a new culture of 10 ml BHI that was incubated at 10 °C with shaking at 200 rpm to reach an OD₆₀₀ of 0.5. Then, 100 µl of this culture was diluted and used to inoculate tubes containing 10 ml of BHI medium at various pH values at a final concentration of 10² CFU/ml. These tubes were then incubated at 8 or 10 °C, with or without oxygen, and shaken at 200 rpm. The CFU were enumerated once or twice a day by sampling 100 µl of each of the different cultures and plating serial dilutions on Luria Bertani (LB; Biokar) agar plates incubated at 30°C. The drop in pH medium at the end of aerobic growth was of 1 unit for an initial pH of 7.0 and decreased with the decrease of the initial pH value.

Anaerobic cultures were performed in 20 ml Hungate tubes (Dutscher) with butyl septa. Oxygen was eliminated from BHI medium by boiling under a flow of nitrogen passed through a Hungate column to remove any trace of oxygen. Hungate tubes were filled under the flow of oxygen-free nitrogen and autoclaved. Cultures were inserted through the septum with 1 ml sterile syringes (BD Plastipak). For each replicate culture, at each sampling time, one Hungate tube was opened to enumerate bacterial CFU and then discarded. Aerobic

Chapitre 4 : Effets combinés de l'anaérobiose, des bas pH et des basses températures sur les capacités de croissance de *Bacillus cereus* psychrotrophes

cultures were done in KIMAX tubes. For each condition and replicate, the same tube was used for all sampling times. The drop in pH medium at the end of anaerobic growth was of 0.3 unit for an initial pH of 7.0 and decreased with the decrease of the initial pH value.

All growth curves were performed in triplicate with three independent inocula.

Estimation of lag times, growth rate, and maximal population

Growth curves were established by plotting the $\log_{10}$ CFU/ml as a function of time. Lag times, maximal specific growth rates ($\mu_{\max}$), and maximal populations ($N_{\max}$) were determined with the models of Rosso *et al.* (Rosso *et al.*, 1995), Baranyi and Roberts (Baranyi *et al.*, 1993) and Gompertz (Zwietering *et al.*, 1990).

Criteria to define growth versus no growth

Growth was defined by an increase in CFU of more than 1 $\log_{10}$ (Pujol *et al.*, 2012), considering that it should be twice the commonly accepted microbiological experimental error of 0.5 $\log_{10}$ CFU. In one of the conditions tested in our study, successive slight increases in counts, approx. 1.5 $\log_{10}$, followed by decreases, were observed and considered as “erratic growth”.

Statistical analysis

The results are expressed as the means of three independent biological replicates. A Student's T-test was used to compare mean values. The null hypothesis was rejected for $P < 0.05$.

Results

We studied the combined effect of pH and absence of oxygen on the growth capacity of two strains of *B. cereus* at cold temperatures. We first investigated the effect of the inoculum on growth at low temperature in BHI medium. Inoculum prepared through one subculture at 10 °C always led to lag times of unpredictable durations (up to several days) of the subsequent culture at 10 °C. One subculture at 20 °C reduced the lag time of the subsequent culture at 10 °C. Combining two subcultures, one at 20 °C followed by one at 10 °C, led to growth without lag time for the subsequent culture at 10 °C (Fig. 1). These two successive subculture steps allowed the best cold adaptation of the two *B. cereus* strains and were applied to all growth kinetic studies.

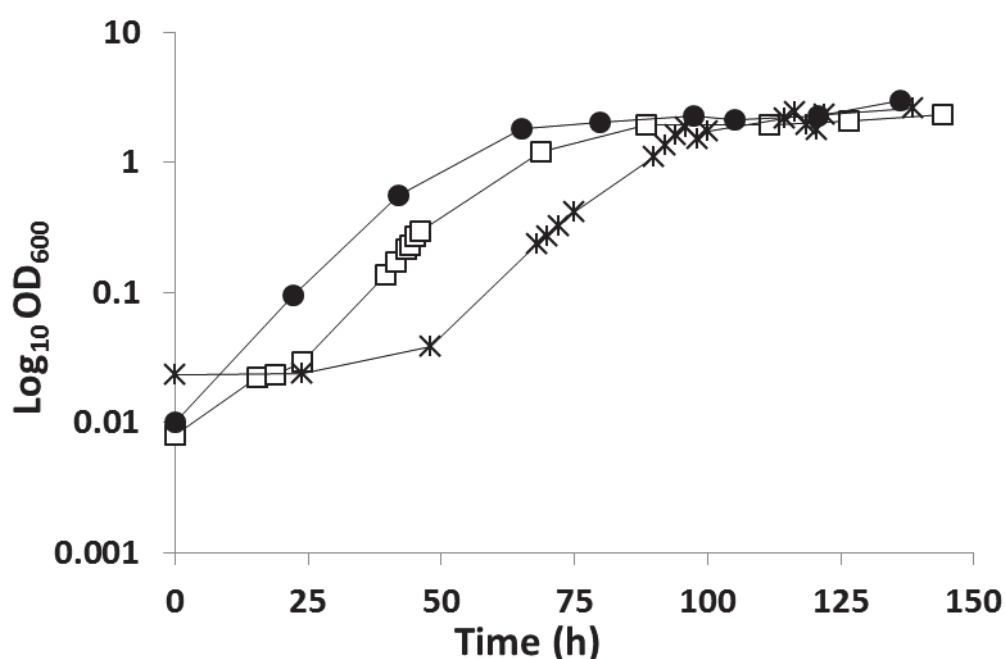


Figure 1. *B. cereus* KBAB4 growth in BHI at pH 7.0 at 10 °C with oxygen after (●) a subculture at 20 °C followed by subculture at 10 °C, (□) a subculture at 20 °C, and (×) a subculture at 10 °C.

Table 1 shows growth parameters obtained with the model of Rosso. Growth parameters obtained with the two other models were similar and are not presented. Without oxygen at 10 °C, growth of strain *B. cereus* KBAB4 was observed between pH 5.7 and 7.0 (Fig. 2A). For both pH values, maximal specific growth rates and lag phases were similar ($p > 0.05$) (Table 1). The maximal populations were 5.4 log₁₀ CFU/ml and 6.2 log₁₀ CFU/ml at pH 5.7 and pH 7.0, respectively (Table 1). At pH 5.6, cells survived without significant decline or growth over the duration of the experiment (Fig. 2A). At 8 °C and in absence of oxygen, KBAB4 cells survived at pH 7.0 but not at the other tested pH values (Fig. 2B). In contrast, in the presence of oxygen, KBAB4 cells grew similarly at pH 5.4 and 7.0 at 10 °C and 8 °C (Fig. 2C and 2D), with maximal populations of approximately 8 log₁₀ CFU/ml (Table 1). At 10 °C and pH values of between 5.4 and 7.0, the maximal specific growth rates were the same, approximately 0.13 h⁻¹ ($p > 0.05$) (Table 1) and lag phases were comprised between 5 h and 10 h.

Chapitre 4 : Effets combinés de l'anaérobiose, des bas pH et des basses températures sur les capacités de croissance de *Bacillus cereus* psychrotrophes

Table 1. Calculated parameters of growth curves obtained with *B. cereus* KBAB4 and *B. cereus* ADRIA I21 in brain heart infusion (BHI) broth at different pH values and at 10 °C or 8 °C, using the model of Rosso (Rosso *et al.*, 1995) for maximal specific growth rate. Data shown are the means of three replicate growth curves $\pm$ range. NT: Not tested; S: Survival; D: Death; EG: Erratic Growth

pH	Anaerobic						Aerobic					
	KBAB4			ADRIA I21			KBAB4			ADRIA I21		
	Lag time	Maximal	Nmax	Lag time	Maximal	Nmax	Lag time	Maximal	Nmax	Lag time	Maximal	Nmax
	(h)	specific growth rate (h ⁻¹)	(log ₁₀ UFC/ml)	(h)	specific growth rate (h ⁻¹)	(log ₁₀ UFC/ ml)	(h)	specific growth rate (h ⁻¹)	(log ₁₀ UFC/ ml)	(h)	specific growth rate (h ⁻¹)	(log ₁₀ UFC/ ml)
10°C												
7.0	37.81 ± 9.39	0.13 ± 0.02	6.22 ± 0.04	25.95 ± 6.75	0.08 ± 0.02	6.03 ± 0.18	6.80 ± 3.38	0.13 ± 0.03	8.52 ± 0.10	2.03 ± 2.92	0.13 ± 0.01	8.31 ± 0.16
5.7	38.16 ± 10.44	0.11 ± 0.04	5.45 ± 0.02	S	S	S	10.03 ± 4.76	0.12 ± 0.00	8.15 ± 0.10	8.21 ± 3.41	0.11 ± 0.02	7.87 ± 0.09
5.6	S	S	S	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5.5	S	S	S	S	S	S	5.90 ± 0.53	0.13 ± 0.00	8.07 ± 0.05	6.11 ± 15.12	0.08 ± 0.01	7.71 ± 0.14
5.4	S	S	S	S	S	S	5.15 ± 0.61	0.13 ± 0.01	8.03 ± 0.05	24.46 ± 1.72	0.07 ± 0.01	7.65 ± 0.09
5.3	NT	NT	NT	NT	NT	NT	S	S	S	S	S	S
5.0	D	D	D	NT	NT	NT	D	D	D	NT	NT	NT
8°C												
7.0	EG	EG	EG	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.01	4.79 ± 0.40	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.00	8.39 ± 0.13	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.01	7.54 ± 0.39
5.7	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5.6	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5.5	S	S	S	NT	NT	NT	4.43 ± 13.17	0.06 ± 0.01	7.79 ± 0.10	S	S	S
5.4	NT	NT	NT	NT	NT	NT	13.40 ± 1.80	0.07 ± 0.01	7.77 ± 0.05	S	S	S
5.3	S	S	S	NT	NT	NT	S	S	S	D	D	D
5.0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	ND	ND	NT

In summary, growth of KBAB4 with and without oxygen shows that maximal population achieved without oxygen were markedly lower, but that the maximal specific growth rates, at permissive pH values (≥ 5.7), during the initial phase of growth, were similar

Chapitre 4 : Effets combinés de l'anaérobiose, des bas pH et des basses températures sur les capacités de croissance de *Bacillus cereus* psychrotrophes

in both conditions ($p > 0.05$) (Table 1). In contrast, lag phases of anaerobic and aerobic cultures were different, with a 30h-delay before growth in absence of oxygen at 10 °C, compared to growth in presence of oxygen (Table 1). At 8 °C and in aerobiosis, the maximal specific growth rates at pH 5.4 and 5.5 were slightly lower than at pH 7.0 (0.06 h^{-1} compared to 0.08 h^{-1}) ($p < 0.05$). Lag phases varied between 0 h at pH 7.0 and 13 h at pH 5.4. At both 10 °C and 8 °C, cell survival was observed at pH 5.3 throughout the experiment (Fig. 2C and 2D).

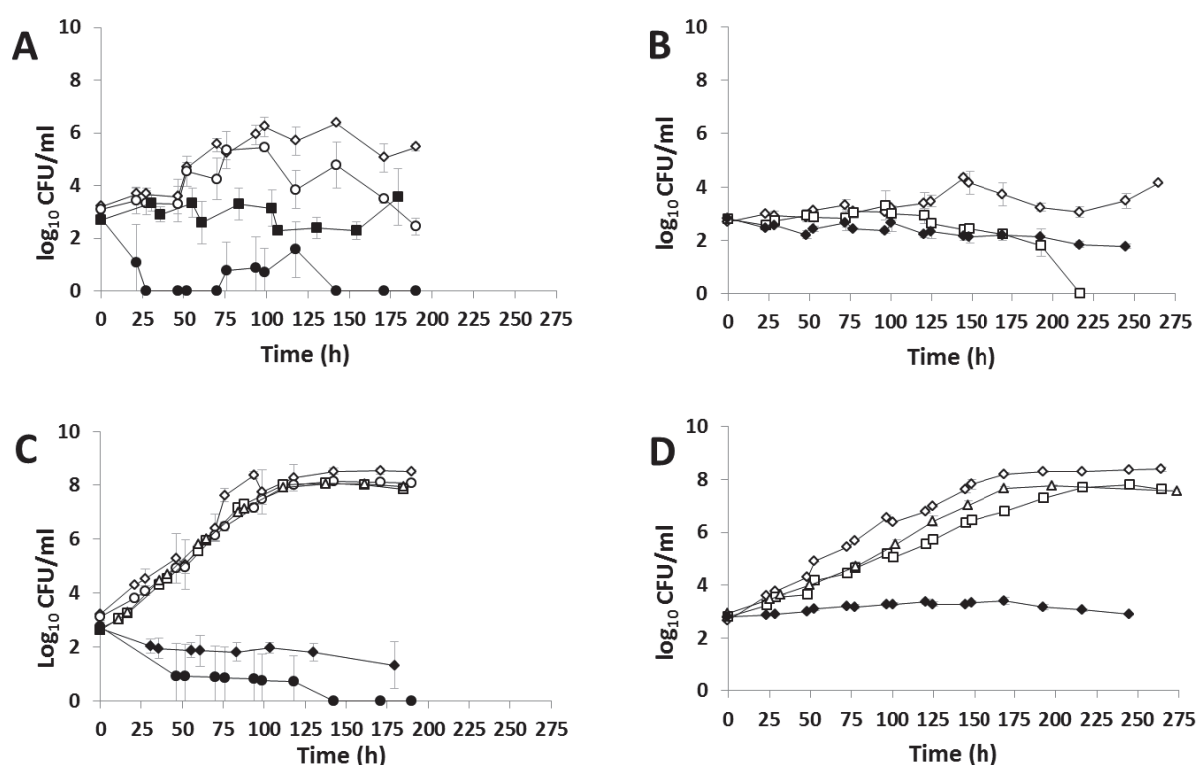


Figure 2. Growth kinetics of *B. cereus* KBAB4 in BHI at 10 °C (A and C) and 8 °C (B and D), without oxygen (A and B) or with oxygen (C and D) and at pH ($\diamond$) 7.0, ($\circ$) 5.7, ($\blacksquare$) 5.6, ($\square$) 5.5, (Δ) 5.4, ($\blacklozenge$) 5.3 and ($\bullet$) 5.0. Error bars represent standard deviations and can be smaller than symbols. They are comprised between 0.005 and 1.4 $\log_{10} \text{CFU/ml}$.

Without oxygen, the *B. cereus* ADRIA I21 strain grew only at pH 7.0 (Fig. 3A and 3B). At 10 °C, the maximal population was approximately 6 $\log_{10} \text{CFU/ml}$ with a maximal

Chapitre 4 : Effets combinés de l'anaérobiose, des bas pH et des basses températures sur les capacités de croissance de *Bacillus cereus* psychrotrophes

specific growth rate of 0.08 h^{-1} and lag phase of 26 h (Table 1). At 8°C , cells grew very slightly during the first 100 h before declining. In contrast, with oxygen, growth of strain ADRIA I21 was observed between pH 5.4 and 7.0 at 10°C (Fig. 3C) with maximal specific growth rates increasing from 0.07 h^{-1} at pH 5.4 to 0.13 h^{-1} at pH 7.0, without any lag phases (Table 1). The strain survived at pH 5.3 (Fig. 3C). Maximal populations of ADRIA I21 at 10°C were approximately $8 \log_{10} \text{ CFU/ml}$ at pH 7.0 but tended to be lower for other growth permissive conditions. At 8°C , growth was observed only at pH 7.0 with a maximal specific growth rate of 0.06 h^{-1} , a maximal population of $7.5 \log_{10} \text{ CFU/ml}$, and survival was observed at pH 5.5 (Fig. 3D). As for KBAB4, absence of oxygen markedly reduced maximal populations achieved by ADRIA I21.

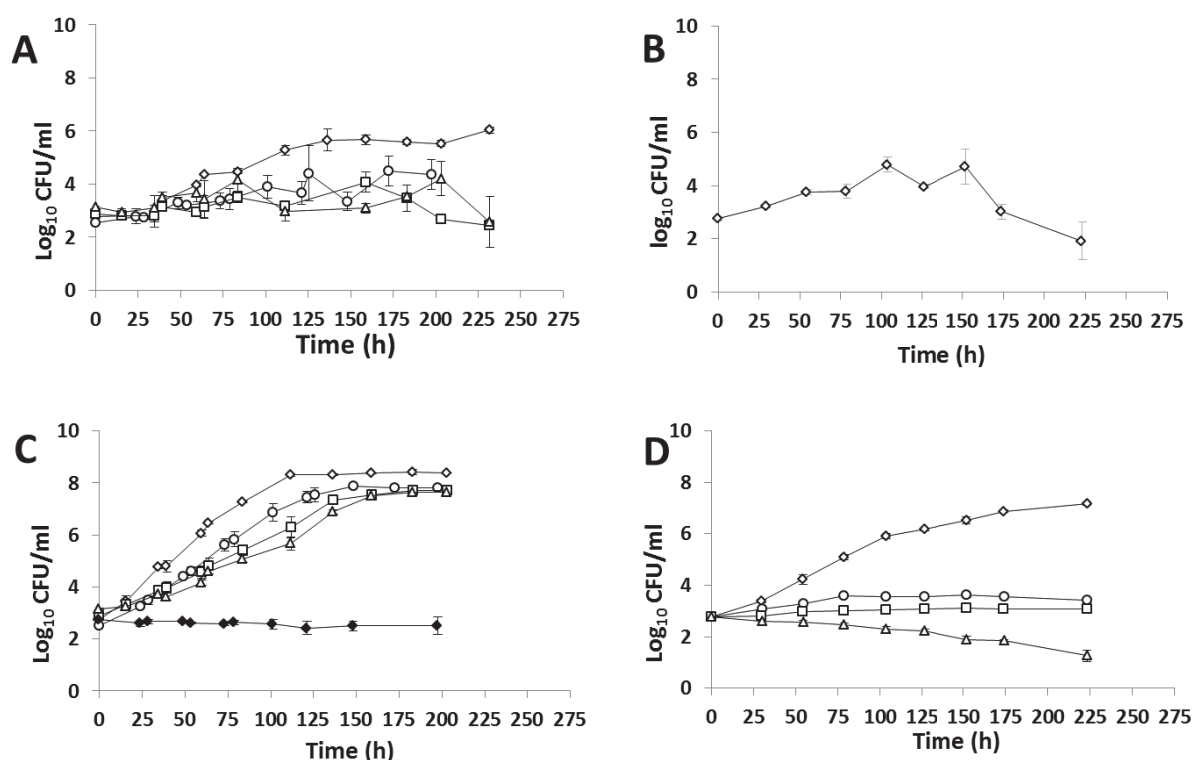


Figure 3. Growth kinetics of *B. cereus* ADRIA I21 in BHI medium at 10°C (A and C) and 8°C (B and D), without oxygen (A and B) or with oxygen (C and D), and at different pH ($\diamond$) 7.0, ($\circ$) 5.7, ($\square$) 5.5, (Δ) 5.4, and ($\blacklozenge$) 5.3. Error bars represent standard deviations and can be smaller than symbols. They are comprised between 0.01 and $0.96 \log_{10} \text{ CFU/ml}$.

Discussion

The absence of oxygen increased the lower pH limit for growth at cold temperature. At 10 °C, both KBAB4 and ADRIA I21 were able to grow at pH 5.4 in the presence of oxygen, whereas they did not grow below 5.7 without oxygen. In addition, ADRIA I21 did not grow at pH 5.7 and was thus less able to adapt to a low pH than KBAB4 in absence of oxygen. Absence of oxygen also increased the lower temperature limit for growth. At pH 7.0 and 8 °C, both KBAB4 and ADRIA I21 strains grew in aerobic conditions to final populations close to 8 log CFU/ml, which is consistent with predictive T_{min} values at 3.9 °C and 3.3 °C, respectively (Carlin *et al.*, 2013), whereas KBAB4 did not grow and ADRIA I21 grew slightly before rapidly declining without oxygen. In conditions permitting growth, the absence of oxygen reduced the maximal population (N_{max}) compared to aerobic cultures, as observed with a mesophilic strain of *B. cereus* grown at higher temperatures in laboratory media (De Sarrau *et al.*, 2012) and with a psychrotrophic strain of *B. cereus* grown in vegetable purées (Samapundo *et al.*, 2011). Absence of oxygen reduced the maximal specific growth rate for ADRIA I21 but not for KBAB4. Absence of oxygen increased lag phases of both KBAB4 and ADRIA I21. Probably, the lack of oxygen leads the cells to a significantly longer adaptation phase before exponential growth. In presence of oxygen, KBAB4 was less affected by pH reduction at cold temperatures than ADRIA I21, as it grew at similar rates and N_{max} values at all pH values permitting growth, in contrast to ADRIA I21 in which the growth rate decreased with acidification.

No previous studies have described *B. cereus* growth in anaerobic conditions at cold temperatures and acidic pH, restricting the comparison of our results with those of the literature to neutral pH. Our results in BHI are consistent with those obtained with a psychrotrophic *B. cereus* strain in vegetable purées ranging in pH from 6.15 to 6.3 in which the authors observed growth rates of approximately 0.03 h⁻¹, similar to that of ADRIA I21 (0.04 h⁻¹), at 8 °C, pH 7.0, and N_{max} values between 4.49 log₁₀ CFU/g and 5.35 log₁₀ CFU/g depending on the purée, which is similar to the N_{max} of 4.79 log₁₀ CFU/ml for ADRIA I21 (Samapundo *et al.*, 2011).

In the presence of oxygen, the pH limit of 5.4 we found in BHI at 10 °C and 8 °C for KBAB4 was the same as for a mixture of two psychrotrophic *B. cereus* strains in carrot purée (Valero *et al.*, 2003). A strain of *B. cereus* was previously reported to grow at pH 5.53 in BHI

Chapitre 4 : Effets combinés de l'anaérobiose, des bas pH et des basses températures sur les capacités de croissance de *Bacillus cereus* psychrotrophes

(Jaquette and Beuchat, 1998). However, the specific growth rates reported previously were lower than those found in our study. For instance, at 8 °C the growth rates of the *B. cereus* strains in the studies of Valero *et al.*, (2000 and 2003) were of 0.047 h⁻¹ at pH 6.2 and 0.01 h⁻¹ at pH 5.5, compared to 0.07 h⁻¹ at pH 5.4 for KBAB4 in the present study (Table 1). No growth was observed by Benedict *et al.*, 1993 at pH below 6.5 and 8 °C. Growth rates presumably differ because of differences in growth media and strains in these different studies. For studies that used BHI (Benedict *et al.*, 1993) the higher growth rate of KBAB4 may reflect a particularly good adaptation of this strain to the combined low pH and cold temperature.

The results from this study and from the previous studies cited above show that at 10 °C and during anaerobiosis, the pH limit for growth of psychrotrophic *B. cereus* is between 5.7 and 5.6, whereas it is between 5.4 and 5.3 during aerobiosis. At pH values between 6.15 and 7.0 and in anaerobiosis, the temperature growth limit is between 8 °C and 7 °C with no or limited growth, depending on strains and growth media, whereas it is below 5 °C with oxygen.

It can therefore be concluded that the combination of cold temperature, low pH and the absence of oxygen could help to control the growth of psychrotrophic *B. cereus* strains in food products.

Acknowledgements

This study is part of the OPTIFEL project that received funding from the European Union's Seventh Framework Program for research, technological development and demonstration under grant agreement n° 311754. AG PhD grant is also from the EU Optifel project. We are grateful to Monique Zagorec and Jeanne-Marie Membré for their useful advices and to Frederic Carlin for discussions and the different spreadsheets used for the models.

References

- Baranyi, J., Roberts, T.A., McClure, P., 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiol.* 10, 43-59.
- Benedict, R.C., Partridge, T., Wells, D., Buchanan, R.L., 1993. *Bacillus cereus*: aerobic growth kinetics. *J. Food Prot.* 56, 211-214.
- Carlin, F., Albagnac, C., Rida, A., Guinebretière, M.-H., Couvert, O., Nguyen-the, C., 2013. Variation of cardinal growth parameters and growth limits according to phylogenetic affiliation in the *Bacillus cereus* Group. Consequences for risk assessment. *Food Microbiol.* 33, 69-76.
- Choma, C., Guinebretière, M.H., Carlin, F., Schmitt, P., Velge, P., Granum, P.E., Nguyen-The, C., 2000. Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *J. Appl. Microbiol.* 88, 617-625.
- Daelman, J., Membré, J.-M., Jacxsens, L., Vermeulen, A., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., 2013. A quantitative microbiological exposure assessment model for *Bacillus cereus* in REPFEDs. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 433-449.
- de Sarrau, B., Clavel, T., Clerte, C., Carlin, F., Ginies, C., Nguyen-The, C., 2012. Influence of anaerobiosis and low temperature on *Bacillus cereus* growth, metabolism, and membrane properties. *Appl. Env. Microbiol.* 78, 1715-1723.
- Del Torre, M., Della Corte, M., Stecchini, M.L., 2001. Prevalence and behaviour of *Bacillus cereus* in a REPFED of Italian origin. *Int. J. Food Microbiol.* 63, 199-207.
- EFSA, 2012. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA J.* 10, 2597.
- EFSA, 2013. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA J.* 11, 3129.

Chapitre 4 : Effets combinés de l'anaérobiose, des bas pH et des basses températures sur les capacités de croissance de *Bacillus cereus* psychrotrophes

- EFSA, 2014. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. EFSA J. 12, 3547.
- EFSA, 2015. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA J. 13, 3991.
- Fernández, A., Collado, J., Cunha, L.M., Ocio, M.J., Martínez, A., 2002. Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. Int. J. Food Microbiol. 77, 147-153.
- Guinebretière, M.-H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., De Vos, P., 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. Env. Microbiol. 10, 851-865.
- Jaquette, C.B., Beuchat, L.R., 1998. Combined effects of pH, nisin, and temperature on growth and survival of psychrotrophic *Bacillus cereus*. J. Food Prot. 61, 563-570.
- Luu-Thi, H., Khadka, D.B., Michiels, C.W., 2014. Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. Int. J. Food Microbiol. 189, 183-188.
- Olmez, H.K., Aran, N., 2005. Modeling the growth kinetics of *Bacillus cereus* as a function of temperature, pH, sodium lactate and sodium chloride concentrations. Int. J. Food Microbiol. 98, 135-143.
- Pujol, L., Kan-King-Yu, D., Le Marc, Y., Johnston, M.D., Rama-Heuzard, F., Guillou, S., McClure, P., Membre, J.-M., 2012. Establishing Equivalence for Microbial-Growth-Inhibitory Effects ("Iso-Hurdle Rules") by Analyzing Disparate *Listeria monocytogenes* Data with a Gamma-Type Predictive Model. Appl. Env. Microbiol. 78, 1069-1080.

Chapitre 4 : Effets combinés de l'anaérobiose, des bas pH et des basses températures sur les capacités de croissance de *Bacillus cereus* psychrotrophes

- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P., 1995. Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 610-616.
- Samapundo, S., Everaert, H., Wandutu, J.N., Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Devlieghere, F., 2011. The influence of headspace and dissolved oxygen level on growth and haemolytic BL enterotoxin production of a psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* isolate on potato based ready-to-eat food products. *Food Microbiol.* 28, 298-304.
- Soares, C.M., Kabuki, D.Y., Kuaye, A.Y., 2012. Growth of enterotoxin producing *Bacillus cereus* in meat substrate at 10°C and 30°C. *Braz. J. Microbiol.* 43, 1401-1405.
- 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. Env. Microbiol.* 72, 1569-1578.
- Sutherland, J.P., Aherne, A., Beaumont, A.L., 1996. Preparation and validation of a growth model for *Bacillus cereus*: the effects of temperature, pH, sodium chloride and carbon dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 359-372.
- Valero, M., Fernández, P.S., Salmerón, M.C., 2003. Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 71-79.
- Valero, M., Leontidis, S., Fernández, P.S., Martínez, A., Salmerón, M.C., 2000. Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5–30°C. *Food Microbiol.* 17, 605-612.
- Vilas-Boas, G., Sanchis, V., Lereclus, D., Lemos, M.V.F., Bourguet, D., 2002. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Env. Microbiol.* 68, 1414-1424.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Vantriet, K., 1990. Modeling of the bacterial-growth curve. *Appl. Env. Microbiol.* 56, 1875-1881.

4.4. Conclusion

Les résultats obtenus lors de cette étude ont mis en avant les capacités de souches psychrotolérantes de *B. cereus* subissant trois conditions stressantes simultanément : basses température, bas pH et anaérobiose. Associés aux données de la littérature, ils permettent de tirer les conclusions suivantes. En anaérobiose à 10 °C le pH limite pour la croissance de ces souches est entre 5,7 et 5,6 et entre 5,4 et 5,3 en aérobiose. Pour des pH neutres (6,15 à 7,0) en anaérobiose, la température limite de croissance est entre 8 °C et 7 °C, avec une croissance très limitée observée pour certaines souches de *B. cereus*. La combinaison de basses températures, bas pH et l'absence d'oxygène semble pouvoir être de bons moyens pour aider à contrôler la croissance de souche psychrotolérante de *B. cereus* dans des produits alimentaires. Cette première étude a permis d'apporter des informations sur le type de conditionnement possible des produits OPTIFEL et sur leurs conditions de stockage et de distribution.

Chapitre 5 :

Le destin de *Bacillus weihenstephanensis* dans un bouillon de carotte: impact de la température et de l'oxygène

5. Chapitre 5 : Le destin de *Bacillus weihenstephanensis* dans un bouillon de carotte : impact de la température et de l'oxygène

5.1. Introduction

Bacillus cereus représente un risque pour les produits alimentaires cuisinés et/ou pasteurisés via sa capacité à sporuler. Il a été décrit comme étant la seconde cause de toxi-infections collectives (TIAC) en France et est en augmentation en Europe depuis 2010 (EFSA, 2012, 2013, 2014, 2015; InVS, 2012, 2013, 2014). Les TIAC associés à *B. cereus* sont souvent apparues suite à la consommation de produits d'origine non-animal, notamment de produits composés de légumes comme des purées (Bennett *et al.*, 2013; Cadel Six *et al.*, 2012; Cadel Six *et al.*, 2014; EFSA, 2012, 2013, 2014, 2015; Lund *et al.*, 2000).

Le groupe *Bacillus cereus sensu lato* est divisé en 7 groupes phylogénétiques en fonction de leur température optimale de croissance (Guinebretière *et al.*, 2008). En particulier, il inclut des groupes de souches psychrotolérantes dont les spores peuvent germer puis se développer dans les légumes et dans les produits alimentaires en contenant (Choma *et al.*, 2000; Del Torre *et al.*, 2001; Valero *et al.*, 2002). La capacité de croissance de ces souches psychrotolérantes de *B. cereus* dans ce type de milieux alimentaire a déjà été montré à travers diverses études (De Sarrau *et al.*, 2013a; Samapundo *et al.*, 2011; Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2007; Valero *et al.*, 2000). Toutefois, les produits alimentaires à base de légumes, comme les produits du projet OPTIFEL, peuvent être préparés de manière bien différentes, conditionnés dans des emballages contenant de l'oxygène ou non et stockés à des températures variables.

L'objectif de cette étude était de déterminer les capacités de croissance de *B. cereus* psychrotolérants en présence ou non d'oxygène dans une préparation à base de légumes. Cette étude a été réalisée avec une souche psychrotolérante de *B. weihenstephanensis* faisant partie du groupe phylogénétique VI du groupe *Bacillus cereus sensu lato* (Guinebretière *et al.*, 2008; Guinebretiere *et al.*, 2010). Nous avons utilisé la carotte (bouillon de carotte) comme légume modèle, car cela correspondait au légume choisi pour les produits alimentaires OPTIFEL. De plus, c'est un légume qui est facilement consommé et plusieurs études précédentes ont montré que *B. cereus* était capable de se développer dans des produit contenant des carottes cuites (Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2002; Valero *et al.*, 2000).

5.2. Résultats et discussion

La souche *B. weihenstephanensis* KBAB4 a été cultivée dans du bouillon de carotte tyndallisé avec ou sans oxygène. L'influence de différents modes de préparation de bouillons de carotte sur la morphologie des cellules de *B. weihenstephanensis* KBAB4 a été testée. Pour la suite de l'étude un seul mode de préparation a été choisi. Des cultures à 8 °C et à 30 °C ont été réalisées en aérobiose et anaérobiose. Les tubes de bouillon carotte pour les cultures en aérobiose ont été tyndallisés en présence d'oxygène, ou en absence d'oxygène avec une remise à l'air au moment de l'inoculation.

Le premier mode de préparations correspondait à des carottes râpées cuites sous vide en bain marie puis écrasées dans du tampon phosphate au stomacher, afin de récupérer le bouillon, puis tyndallisés. Dans le second mode de préparation, la cuisson avant broyage au stomacher était réalisée au micro-onde, tandis que dans le troisième il n'y a pas eu de cuisson car le bouillon a été récupéré à l'aide d'un extracteur de jus à partir de carottes crues. Les bouillons préparés selon ces deux derniers modes étaient tyndallisés, comme pour le premier. Enfin le quatrième mode de préparation correspondait à un mode de cuisson à la vapeur dans un autocuiseur « Nutricook », puis le bouillon était autoclavé et non tyndallisé. Aucune croissance n'a été observée dans le bouillon issu de ce quatrième type de préparation. Pour les bouillons issus des trois premiers types de préparations, des cultures de *B. weihenstephanensis* ont été réalisées à 30 °C en aérobiose pendant 72 h. La morphologie des cellules cultivées dans les différents bouillons différait (Fig 5). Les cellules provenant du premier type de bouillon (cuisson sous vide en bain marie) apparaissaient, en microscopie à contraste de phase, opaques et régulières comme des bacilles typiques de *B. weihenstephanensis* (De Vos *et al.*, 2009). Ce ne fut pas le cas pour la deuxième préparation via l'extracteur de jus, où les cellules apparaissaient irrégulières avec plusieurs inclusions. Puis, dans la troisième préparation, où les carottes étaient cuites au micro-onde, nous n'avons observé que des spores. Le mode de préparation influençait donc le devenir des cellules végétatives de *B. weihenstephanensis* KBAB4. Plusieurs facteurs rentraient en compte comme le chauffage, la présence d'oxygène, le type de stérilisation. L'élongation et l'irrégularité des cellules, voir même une sporulation rapide semblait indiquer des conditions stressantes pour la bactérie. De précédentes études ont montré que des réactions de Maillard dans des produits alimentaires pouvait créer des molécules antimicrobiennes comme les mélanoïdines (Rufian-Henares and

de la Cueva, 2009; Rufian-Henares and Morales, 2007) ou l'aminoréductone par exemple (Rufian-Henares and de la Cueva, 2009; Rufian-Henares and Morales, 2007, 2008; Trang *et al.*, 2013; Trang *et al.*, 2009; Trang *et al.*, 2011). Il est également possible que dans les préparations en présence d'air, une oxydation de produits présents dans la carotte provoque un stress pour les cellules végétatives de *B. weihenstephanensis*. De ce fait, pour la suite de l'étude, c'est le bouillon de carotte réalisé via une cuisson sous vide en bain marie (80 °C) qui a été utilisé.

Quand le bouillon de carotte était tyndallisé en présence d'air, les cellules de *B. weihenstephanensis* inoculées mourraient immédiatement. Par contre, quand les tubes de bouillon de carotte étaient tyndallisés sans oxygène, des croissances étaient observées par la suite (Fig 1). La présence d'oxygène durant le procédé de tyndallisation semble avoir créé des composés létaux pour les cellules de *B. weihenstephanensis* KBAB4. Ce phénomène n'a pas été observé quand l'inoculation a été réalisée avec des spores comme dans les études de Valero *et al.*, (Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2007; Valero *et al.*, 2000). L'effet léthal de la carotte crue, ou d'extraits de carottes crues avait déjà été décrite dans des études antérieures sur d'autres espèces bactériennes (Babic *et al.*, 1994; Beuchat and Brackett, 1990; Degirmenci *et al.*, 2012; Nguyenthe and Lund, 1991, 1992; Noriega *et al.*, 2010), mais pas pour des carottes cuites et tyndallisées. Par contre, en anaérobiose les cellules végétatives de *B. weihenstephanensis* KBAB4 se sont développées à 8 °C jusqu'à un $N_{\max}$ de 6,6 log₁₀UFC/ml et à 30 °C jusqu'à un $N_{\max}$ de 8 log₁₀UFC/ml (Fig 1B). Compte tenu du faible $N_{\max}$ obtenu en anaérobiose à 8 °C, nous avons testé l'apport de la phosphatidylcholine (PC) au bouillon de carotte, et à titre de comparaison dans du BHI. Des études précédentes avaient montré que l'ajout de PC pouvait augmenter la capacité de croissance des cellules végétatives dans ces conditions en apportant les acides gras insaturés que la bactérie n'est plus capable de synthétiser (De Sarrau *et al.*, 2013a). Le maximum de la population bactérienne qui a été obtenue à 8 °C en anaérobiose ne fut pas augmenté par l'ajout de PC, contrairement au milieu BHI (Fig 1B). *B. weihenstephanensis* KBAB4 ne se développait pas à 8 °C en anaérobiose en BHI (Guérin *et al.*, 2016), et l'addition de PC a permis d'obtenir une croissance jusqu'à une concentration de 7,3 log₁₀ UFC/ml. Ceci n'était pas le cas à 8 °C dans du bouillon de carotte ce qui semblait indiquer que la croissance était limitée par autre chose que l'absence d'acide gras insaturés.

Chapitre 5 : Le destin de *Bacillus weihenstephanensis* dans un bouillon de carotte : impact de la température et de l'oxygène

De plus, la morphologie des cellules de *B. weihenstephanensis* KBAB4 changeaient en fonction des conditions de culture (Fig 3). Suite à une coloration au Rouge de Nile, plusieurs inclusions lipidiques furent observées (Fig 4). Plusieurs petites inclusions étaient présentes par cellule cultivée en bouillon carotte. Ces inclusions lipidiques pourraient correspondre à des granules de polyhydroxybutyrate (PHB) qui ont déjà été décrites chez *B. thuringiensis* (Chen *et al.*, 2010). Les granules de PHB s'accumulent fréquemment dans les cellules bactériennes suite à un état de stress comme une limitation de nutriments, ce qui les aide à faire face à cet état de stress (Lopez *et al.*, 2012; Obruca *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2007). Ceci peut indiquer la présence de conditions stressantes pour *B. weihenstephanensis* dans le bouillon de carotte en aérobiose à 30 °C. Par contre les cellules cultivées en anaérobioses ne présentaient pas d'inclusions lipidiques.

5.3. The fate of *Bacillus weihenstephanensis* in carrot broth: impact of temperature and oxygen

Article en préparation

The fate of *Bacillus weihenstephanensis* in carrot broth: impact of temperature and oxygen

Alizée Guérin, Claire Dargaignaratz, Thierry Clavel,

Véronique Broussolle and Christophe Nguyen-the^{1*}

UMR408 SQPOV « Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale », INRA, University of Avignon, 84000 Avignon, France

*Corresponding author. Mailing address: INRA, UMR408, site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9, France. Phone: +33 (0)4 32 72 25 21, Fax: +33 (0)4 32 72 24 92, Email: Christophe.nguyen-the@avignon.inra.fr

Chapitre 5 : Le destin de *Bacillus weihenstephanensis* dans un bouillon de carotte : impact de la température et de l'oxygène

Abstract

The aim of this study was to determine the capacity of the *B. weihenstephanensis* strain KBAB4, a psychrotolerant species of the *B. cereus sensu lato* group, to multiply in carrot broth at different temperatures (30 °C and 8 °C) with or without oxygen. Carrot broth was sterilized by tyndallization. Vegetative cells of *B. weihenstephanensis* died immediately upon inoculation of carrot broth tyndallized in presence of oxygen, indicating production of some antibacterial molecule(s). This lethal effect was not observed when the carrot broth was tyndallized anaerobically and spores were not affected. In aerobically tyndallized carrot broth, vegetative cells that had survived the lethal effect grew at 30 °C but not at 8 °C. In contrast, they grew at 8 °C in anaerobic conditions. At 30 °C in aerobiosis lipid inclusions accumulated in the vegetative cells grown in carrot broth indicating possible stressing conditions. This study shows that composition of carrot broth and environmental condition during preparation and storage of this type of food product influenced the fate of *B. weihenstephanensis*.

Keywords

Bacillus cereus, vegetables, Parahydroxybutirate, lethal effect

Introduction

Bacillus cereus is a foodborne pathogen and an endospore-forming bacteria causing diarrheal or emetic food poisoning (Ehling-Schulz *et al.*, 2004; Forghani *et al.*, 2014; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Because its spores survive a wide range of heat-treatments, (Luu-Thi *et al.*, 2014), *B. cereus* represents a particular risk for cooked or pasteurised food products. It has been reported as the second leading cause of foodborne outbreaks in France, increasing in EU since 2012 (EFSA, 2012, 2013, 2014, 2015; InVS, 2012, 2013, 2014). *B. cereus* foodborne outbreaks are mostly associated to consumption of foods of non-animal origin, including vegetables and vegetables purées (Bennett *et al.*, 2013; Cadel Six *et al.*, 2012; Cadel Six *et al.*, 2014; EFSA, 2012, 2013, 2014, 2015; Lund *et al.*, 2000). *B. cereus sensu lato* was divided into seven phylogenetic groups in function of their optimal growth temperature (Guinebretière *et al.*, 2008). In particular, it includes groups of psychrotolerant strains which spores can germinate and grow in foods stored at cold temperature. Spores of *B. cereus* are particularly prevalent in vegetables and foods containing vegetables (Choma *et al.*, 2000; Daelman *et al.*, 2013; Del Torre *et al.*, 2001; Valero *et al.*, 2002). The capacity of psychrotolerant *B. cereus* strains to grow in vegetables was reported (De Sarrau *et al.*, 2013a; Samapundo *et al.*, 2011; Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2007; Valero *et al.*, 2000). Food products prepared with vegetables can be processed under different ways, packaged with or without oxygen and stored at different temperatures.

The aim of the present study was to determine the growth capacity of psychrotolerant *B. cereus* in presence or absence of oxygen in vegetable preparation. This study was performed with a psychrotolerant *B. weihenstephanensis* strain belonging to the phylogenetic group VI of *Bacillus cereus sensu lato* (Guinebretière *et al.*, 2008; Guinebretiere *et al.*, 2010). We used carrot (buffered-carrot broth) as the vegetable model as it is widely consumed and because several studies previously showed that *B. cereus* could grow in products containing cooked carrots (Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2002; Valero *et al.*, 2000).

Materials and methods

Strains

We used the psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 strain isolated from forest soil (Sorokin *et al.*, 2006; Vilas-Boas *et al.*, 2002).

Carrot broth preparation

Carrot broths were prepared with Nantaise carrots from Normandy, France. Carrots were washed, peeled, grated and vacuum -packed into plastic pouches (between 100 g and 150 g per plastic pouches). These pouches were heated at 80 °C during 25 min in a water bath. Grated carrots were then weighted, transferred into a stomacher bag with filter (< 100 g/stomacher bag), and stomached during 2 min after addition of phosphate buffer at pH 7.0 ± 0.2 (100 ml buffer for 50 g of carrots). The filtered carrot broth was poured from the stomacher bag into a sterile flask and dispensed into KIMAX tubes, or in Hungate tubes (Dutscher) (10 ml/tube) or in Amsco flasks. Oxygen was eliminated from Hungate tubes and Amsco flasks by boiling under a flow of nitrogen passed through a Hungate column (Guérin *et al.*, 2016), whereas the KIMAX tubes had a head space of air. All tubes and Amsco flasks were then sterilized following a tyndallization protocol, consisting in heating the carrot broth tubes and flasks three times at 80 °C during 1 h in a water bath, with a 24 h-storage at room temperature in the dark between each heat treatment. The sterile tubes and flasks were finally stored at room temperature in the dark before use.

Growth conditions

The stock of *B. weihenstephanensis* KBAB4 consisted in suspensions of exponential phase cells ($OD_{600} = 0.5$), in a 30 % glycerol final concentration, stored at -80 °C (Guérin *et al.*, 2016). Inoculum was realized in Brain Heart Infusion (BHI; Biokar), pH 7.4 ± 0.2 . Ten ml of BHI were inoculated with 100 µl of the frozen KBAB4 culture in KIMAX tubes and incubated at 20 °C under shaking at 200 rpm during around 9 h to obtain an OD_{600} equal to 0.5, then diluted to inoculate 10 ml of carrot broth or BHI at around 10^3 CFU/ml (low inoculum) or 10^6 CFU/ml (high inoculum). For anaerobic cultures, we used Hungate tubes

Chapitre 5 : Le destin de *Bacillus weihenstephanensis* dans un bouillon de carotte : impact de la température et de l'oxygène

inoculated using 1 ml sterile syringes (BD Pastipak) (Guérin *et al.*, 2016). For cultures with oxygen, we used carrot broth in KIMAX tubes that were tyndallized in aerobic conditions, or carrot broth in Amsco flasks sterilized in anaerobic conditions, open to air and dispensed in sterile KIMAX tubes at time of inoculation. Phosphatidylcholine (PC) was added at 125 µg/ml (Sigma) in some tests. Tubes were incubated at 8 °C or 30 °C under shaking at 200 rpm.

Spore suspensions, used to inoculate some cultures at 10^3 CFU/ml or 10^6 CFU/ml, were obtained on Fortified Nutrient Agar plates (FNA) incubated 9 days at 30 °C. Spores were collected from agar surface using 5 ml of cold sterile water in two times (4 ml followed by 1 ml to collect the remaining spores from the agar plate) and a sterile L-shaped spreader. This suspension of spores was transferred into a 50 ml falcon tube (Dutscher) and centrifuged three times at 4 °C during 15 min, twice at 5, 500 g, and once at 2, 800 g (Thermo scientific, Multifuge X1R). After each centrifugation, the supernatant was discarded and the spores pellet vortexed in 25 ml cold sterile water. A last centrifugation was done at 1, 800 g in the same conditions but at the end spores were suspended with just 2 ml of cold sterile water, pasteurized in a water bath at 70 °C during 15 min, and placed immediately in ice. These spore suspensions containing $4.0 \cdot 10^8$ CFU/ml were stored at -20 °C.

The CFU were enumerated by sampling 100 µl of each cultures and plating serial dilutions on Luria Bertani agar plates (LB; Biokar) incubated at 30 °C overnight. All growth curves were performed in triplicate with three independent inocula.

Microscopy observations

Samples were observed using a phase contrast microscope (Olympus BX 50 instrument, Rungis, France) with a BX-FLA reflected light fluorescence attachment. Pictures were taken with a black and white cool SNAP EZ camera (Tucson, USA). Images were processed with Micromanager software, ImageJ and PMC Capture Pro software. Samples stained with Life/dead (Invitrogen) or Nile red (Sigma) were observed in epifluorescence microscopy, and pictures were taken separately with the corresponding filters and processed with PMC Capture Pro software (De Sarrau *et al.*, 2013b).

Cell viability

Live/dead staining was used to observe the proportion of live (green) and dead (red) cells. Three μl of component A and B mixture (50/50) were added to 1 ml of culture in carrot broth, vortexed, and incubated at room temperature in the dark during 15 min before observation in fluorescence microscopy with a blue filter (B excitation cube Wide band; U-MWB; exciter filter BP450-480), to observe both green and red cells, and with a green filter (G excitation cube Wide band; U-MWB; exciter filter BP510-550) to observe red cells. Pictures of each sample were taken alternatively in phase contrast and in fluorescence microscopy with the green filter. The proportion of viable and not viable cells was determined by cells enumeration on 5 different microscopy observations (total of cells: 632 cells).

Presence of cell lipid inclusions

Nile red coloration was used to observe the presence of lipid inclusions in *B. cereus* cells. Five μl of Nile red were added to 100 μl of cultures (30 °C aerobiosis), vortexed and incubated at 37 °C in the dark during 10 min. This suspension was centrifuged at 4, 000 g during 10 min, the supernatant was discarded and the cells pellet was then vortexed in 100 μl of phosphate buffer saline (PBS) with Tween 80 (ProLabo). This step was performed twice and cells were finally suspended in 100 μl of PBS for fluorescence microscopy using the green filter. Lipid droplets appeared in red. Pictures of each sample were taken alternatively in phase contrast and in fluorescence microscopy.

Statistical analysis

The results are expressed as the means of three independent biological replicates. A Student's T-test was used to compare mean values. The null hypothesis was rejected for $p < 0.05$.

Chapitre 5 : Le destin de *Bacillus weihenstephanensis* dans un bouillon de carotte : impact de la température et de l'oxygène

Results

When carrot broth was tyndallized in presence of air, there was an immediate death of *B. weihenstephanensis* cells upon inoculation. At time zero, we did not find any of the 10^3 CFU/ml inoculated in the broth (Fig 1A and Table 1). This effect was found with cultures inoculated just after tyndallization as well as with cultures inoculated in tubes that were stored in the dark at room temperature during 2 months. Moreover after tyndallization, KIMAX tubes still contained oxygen, between 8.45 mg/l at the top of the tube in the head space and 4.66 mg/l in the bottom of the tube in carrot broth. However, when tyndallization of carrot broth was done without oxygen and distributed after in sterile KIMAX tubes with air, we enumerated the expected 10^3 CFU/ml at time zero (Fig 1A and Table 1). We then tested inoculations with suspension of *B. weihenstephanensis* KBAB4 spores at 10^3 CFU/ml and 10^6 CFU/ml in carrot broth in KIMAX tubes tyndallized with oxygen (Table 1). We did not obtain the same result as with vegetative cell suspensions, and recovered 10^3 CFU/ml and 10^6 CFU/ml at time zero. When tubes inoculated with spores were incubated at 30 °C, numbers of CFU remained stable for 2 h before starting to increase (Fig 2).

Table 1. Extent of decline of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 vegetative cells upon inoculation in carrot broths. Inoculation was done at room temperature with a known number of cells or spores and surviving cells in the broth were counted after around 5 min. ND: No Decline; -: Not Tested. Limit of detection was 10 CFU/ml.

Tyndallization	Condition of inoculation	Initial inoculum concentration (CFU/ml)				
		Vegetative cells		Spores		
		10^3	10^6	10^3 with PC	10^3	10^6
With oxygen	Aerobiosis (KIMAX)	> - 10^2	> - 10^5	> - 10^2	ND	ND
Without oxygen	Aerobiosis (KIMAX)	ND	-	-	-	-
	Anaerobiosis (Hungate)	ND	-	ND	-	-

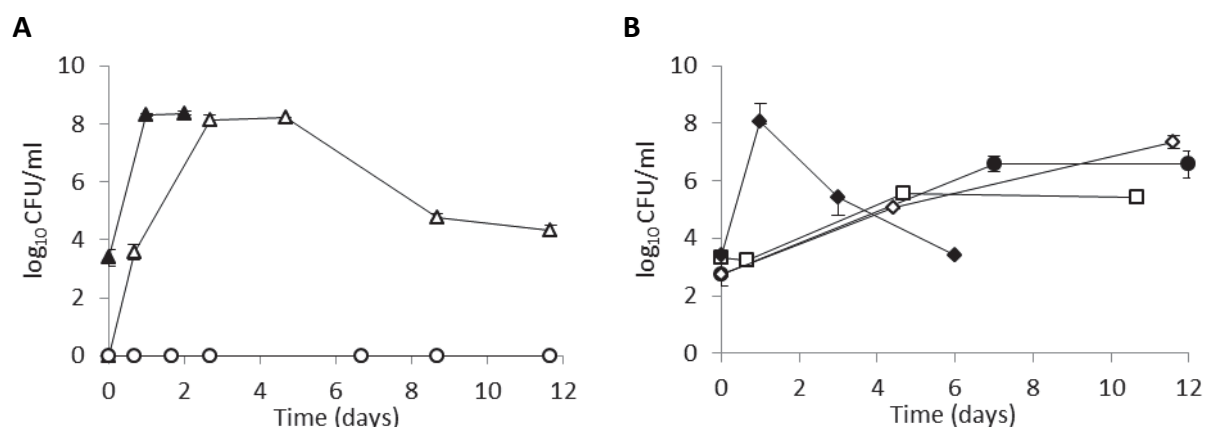


Figure 1. Growth of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 in carrot broth (preparation type 1) and in BHI in aerobiosis A) and in anaerobiosis B). Aerobic cultures at 30 °C in carrot broth tyndallized aerobically (Δ); aerobic cultures at 30 °C in carrot broth tyndallized anaerobically (▲); aerobic cultures realized at 8 °C in carrot broth tyndallized aerobically (○); anaerobic cultures at 30 °C in carrot broth tyndallized anaerobically (◆); anaerobic cultures at 8 °C in carrot broth tyndallized anaerobically (●); anaerobic cultures at 8 °C in carrot broth tyndallized anaerobically and supplemented with phosphatidylcholine at 125 μg/ml (□) and anaerobic cultures at 8 °C in BHI supplemented with phosphatidylcholine at 125 μg/ml (◇). Limit of detection was at 10 CFU/ml. Error bars indicate standard deviations between three biological replicates and can be smaller than symbols. KBAB4 did not grow in BHI under anaerobiosis at 8°C as shown in Guérin *et al.*, (2016)

No growth in aerobiosis of vegetative cells of *B. weihenstephanensis* was observed at 8 °C when inoculated in aerobically tyndallized broth (Fig 1A). In contrast vegetative cells were able to grow in carrot broth at 30 °C in aerobiosis with a maximal population (N_{max}) of 8.24 log₁₀ CFU/ml, whatever the conditions of tyndallisation (Fig 1A). In anaerobiosis at 30°C, growth up to 8 log₁₀ CFU/ml was rapidly followed by a decrease of KBAB4 population (Fig 1B). This was not the case at 8 °C, where growth in anaerobiosis up to 6.58 log₁₀ CFU/ml was followed by a plateau of at least 5 days (Fig 1B). Moreover, we added PC in carrot broth because De Sarrau *et al.*, (2013a) showed that adding PC improved capacity to grow without oxygen and at cold temperatures, by providing unsaturated fatty acids that the bacterium is not able to synthetize in these conditions (De Sarrau *et al.*, 2013a).

Chapitre 5 : Le destin de *Bacillus weihenstephanensis* dans un bouillon de carotte : impact de la température et de l'oxygène

The maximal population at 8 °C in anaerobiosis was not increased by the addition of phosphatidylcholine (PC) (125 µg/ml) to carrot broth ($p > 0,05$) (Fig 1B). For a comparison, in the same conditions in a rich laboratory medium (BHI) with PC, the maximal population was of at least 7.5 log₁₀ CFU/ml.

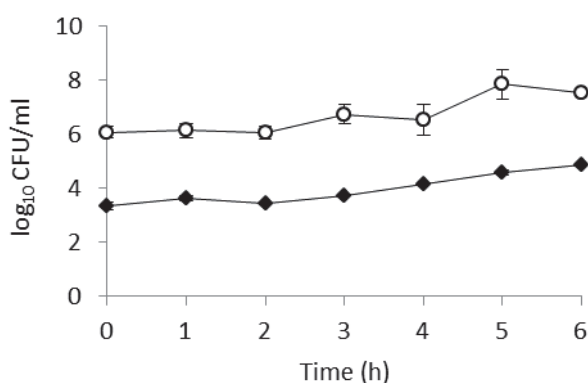


Figure 2. Growth of *B. weihenstephanensis* KBAB4 in carrot broth at 30 °C in aerobiosis and tyndallized with oxygen, with inoculation with spores at 10³ CFU/ml (○) and 10⁶ CFU/ml (◆). Error bars indicate standard deviations between three biological replicates and can be smaller than symbols.

Morphology of vegetative cells of *B. weihenstephanensis* KBAB4 changed with the different conditions of cultures (Fig 3). In cultures at 30 °C in aerobiosis with or without oxygen during tyndallization, vegetative cells were opaque, slightly swollen, with some inclusions (Fig 3A and B). Whenever growth was observed in anaerobiosis at 30 °C, there were lower cells density, they had shapes of swollen bacilli, and no inclusion were observed (Fig 3C white arrow). At 8 °C in anaerobiosis, bacilli were slender with no inclusions. Furthermore, adding PC did not change the morphology of cells cultivated at 8 °C in anaerobiosis (Fig 3D).

Chapitre 5 : Le destin de *Bacillus weihenstephanensis* dans un bouillon de carotte : impact de la température et de l'oxygène

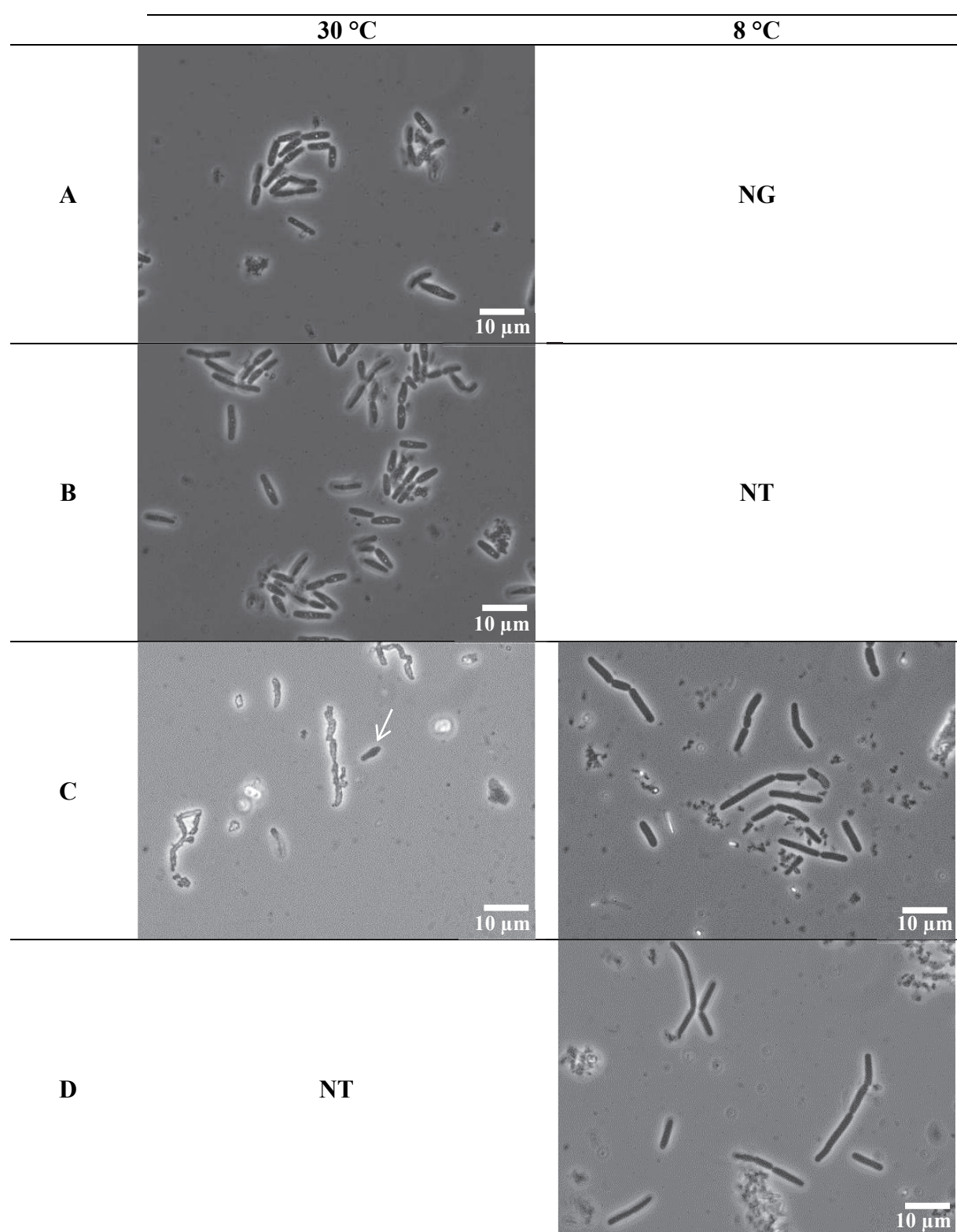


Figure 3. Phase contrast microscopic observation (X 100) of *B. weihenstephanensis* KBAB4 grown in carrot broth (preparation type 1) at 8°C and 30°C after. A) tyndallization with oxygen and aerobic growth 2 days; B) tyndallization without oxygen and aerobic growth 3

Chapitre 5 : Le destin de *Bacillus weihenstephanensis* dans un bouillon de carotte : impact de la température et de l'oxygène

days; C) tyndallization and growth under anaerobiosis 3 days at 30 °C and 13 days at 8 °C, white arrow showed the vegetative cell; D) Same conditions as C with Phosphatidylcholine (125 µg/ml) added to the carrot broth 13 days. NG: No growth; NT: No tested.

Nile red coloration of *B. weihenstephanensis* KBAB4 cells cultivated in carrot broth at 30 °C during 3 days in aerobiosis without oxygen during tyndallization is shown in (Fig 4A and B). On Nile red stained bacterial cells, inclusions appeared black in phase contrast microscopy (black arrow Fig 4A), and were not refractive, contrary to inclusions in cells not coloured with Nile red (Figure 3A and B). In fluorescence microscopy of Nile red strained cells, several inclusions appeared in each cell (Fig 4B, white arrow). In *B. weihenstephanensis* KBAB4 cultivated at 30 °C in aerobiosis in laboratory medium Brain Heart Infusion (BHI; Biokar), cells contained lipid inclusions but they were bigger and less numerous than in cells cultivated in carrot broth (Fig 4C and D). Thereafter, we realised a Live/dead coloration of *B. weihenstephanensis* KBAB4 cells cultivated in carrot broth in the same conditions to determine the proportion of viable and not viable cells in this culture after 3 days (Fig 4E and F). Dead cells were red in fluorescence microscopy (Fig 4F) with a proportion of $49 \% \pm 15 \%$ of total cells (Fig 4F). Lipid inclusions were still refractive in phase contrast microscopy after Live/Dead staining (white arrow Fig 4E).

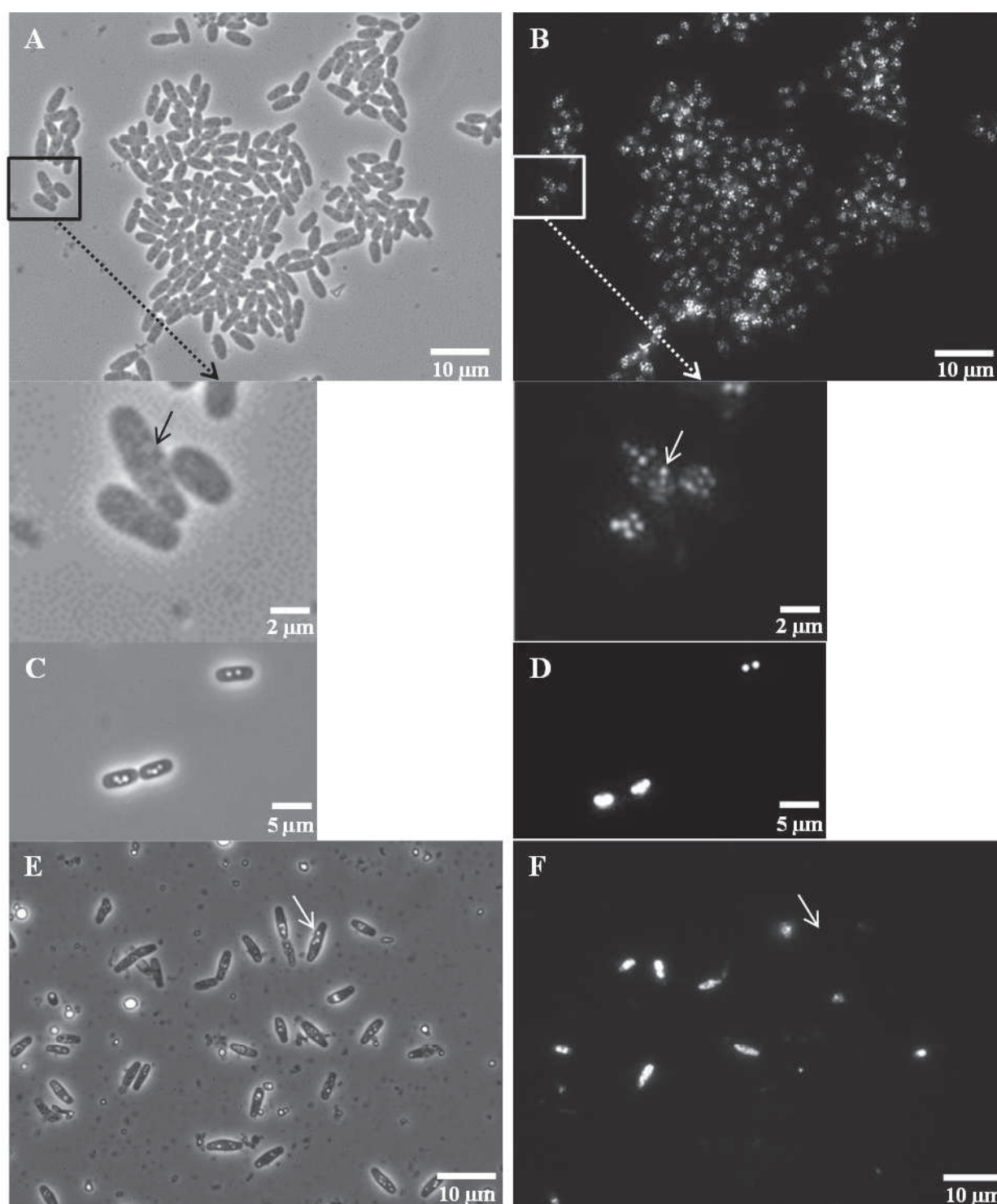


Figure 4. Phase contrast (A, C and E) and epifluorescence (B, D and F) microscopic observations (X 100) of *B. weihenstephanensis* KBAB4 cultivated aerobically for three days at 30 °C in carrot broth tyndallized without oxygen (A, B, E and F) or in BHI during two days

(C and D). Panels A, B, C and D correspond to Nile red coloration of lipid inclusions and E and F to Live/dead coloration. White and black arrow in observation A and B showed lipid inclusions and white arrow in observation E and F showed a viable cell. Only dead cells stained by propidium iodide appear in F.

Discussion

The presence of oxygen during tyndallization seemed to create lethal compounds for *B. weihenstephanensis* cells because immediately (e.g. within 5 min) upon inoculation, the vegetative cells were no longer recovered on the medium plates, even with the highest inoculum indicating at least a 10^5 -fold reduction of cultivable cells. However, as growth of *B. weihenstephanensis* resumed at 30 °C after inoculation of the carrot broth with 10^3 CFU/ml, representing 10^4 CFU in the 10 ml tube, some of these 10^4 CFU had not been killed at the inoculation in the broth, indicating that the lethal effect was necessarily of less than 10^4 -fold. Part of the inoculated cells, not recovered on the plate count medium, were presumably not killed and in a viable but not culturable (VBNC) state. Spores of *B. weihenstephanensis* (Noriega et al., 2010) KBAB4 were resistant to this lethal effect. As observed in other studies, the expected concentration of spores was found after inoculation of spores of *B. cereus* in tyndallized carrot broth (Valero et al., 2003; Valero et al., 2007; Valero et al., 2000). When vegetative cells were inoculated into carrot broth tyndallized without oxygen, we recovered all the inoculated vegetative cells, whatever the presence or absence of oxygen during inoculation, indicating that the lethal effect is generated upon contact with oxygen during tyndallization and not during inoculation.

B. weihenstephanensis KBAB4 was able to grow aerobically in carrot broth at 30 °C with a $N_{\max}$ around $8 \log_{10}$ CFU/ml. No difference was observed between growth kinetic and morphology of vegetative cells broth tyndallized with oxygen and without oxygen. The lethal effect of carrot broth tyndallized aerobically was therefore short-lived in the 30 °C cultures. This seems in contradiction with the observation that cells of *B. weihenstephanensis* were killed upon inoculation into a freshly tyndallized broth as well as into a broth stored 2 months at room temperature after tyndallization. The lethal effect was therefore stable in the tyndallized broth, which still contained oxygen, until inoculation. It is possible that the lethal

effect was inactivated while reacting with the bacterial cells after inoculation. In contrast, no growth was observed at 8 °C and in aerobic conditions in carrot broth tyndallized in presence of oxygen. The vegetative cells could presumably not recover at 8 °C from the lethal effect of the aerobic carrot broth during the inoculation. Lethal effect of carrots has previously been described (Babic *et al.*, 1994; Beuchat and Brackett, 1990; Degirmenci *et al.*, 2012; Nguyenthe and Lund, 1991, 1992; Noriega *et al.*, 2010) in fresh carrots. As observed in the present study, Nguyen-the and Lund (1991) found the antimicrobial effect of carrot short-lived and active only in presence of oxygen. However, Beuchat et Brackett (1990) found this antimicrobial effect inactivated in cooked carrot, but the impact of a milder heating as tyndallization is not known.

B. weihenstephanensis vegetative cells grown aerobically at 30 °C in carrot broth were slightly swollen and contained several lipid inclusions as indicated by the Nile red coloration. More inclusions were observed in these cells than in cells grown in BHI in the same conditions. The lipid inclusions might be parahydroxybutyrate granules (PHB) which have been described in cells of *B. thuringiensis*, a species of the *B. cereus* group as *B. weihenstephanensis* (Chen *et al.*, 2010). PHB frequently accumulate in bacterial cells upon stress including nutrient limitation and may help bacteria to cope with stress (Lopez *et al.*, 2012; Obruca *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2007). This may indicate some stressing conditions for *B. weihenstephanensis* in aerobic carrot broth at 30 °C. Nevertheless, there were around 49 % of dead cells after three days at 30 °C in aerobic carrot broth tyndallized without oxygen, as evidenced by Live/dead coloration. A similar percentage of dead cells (52 %) was observed after Live/dead coloration for another strain of *B. cereus* grown in LB medium (Pandiani *et al.*, 2010) and is presumably not specific to carrot broth.

Surprisingly, we observed *B. weihenstephanensis* growth at 8 °C in carrot broth without oxygen with a $N_{\max}$ of 6.6 log₁₀ CFU/ml after 7 days. Vegetative cells had regular shapes with no lipid inclusions, which could indicate that these vegetative cells were less stressed than those grown at 30 °C with oxygen. However, in *B. thuringiensis*, Spo0A is required for PHB accumulation (Chen *et al.*, 2010) and it is known that *B. cereus* sporulates poorly in anaerobic conditions (Abbas *et al.*, 2014a). It is therefore possible that anaerobiosis limit PHB production in species of the *B. cereus* group. We previously observed that this strain was not able to grow at 8 °C in anaerobiosis in BHI medium (Guérin *et al.*, 2016),

Chapitre 5 : Le destin de *Bacillus weihenstephanensis* dans un bouillon de carotte : impact de la température et de l'oxygène

which suggests that carrot broth was a better medium than BHI in the tested conditions. Although *B. weihenstephanensis* KBAB4 did not grow at 8 °C in anaerobiosis in BHI (Guérin *et al.*, 2016), addition of PC at 125 µg/ml to the medium led to growth of this strain with a $N_{\max}$ of 7.3 log₁₀ CFU/ml after 12 days. This was not the case here in carrot broth incubated at 8 °C in anaerobiosis, indicating that growth seemed limited to 6.58 log₁₀ CFU/ml by something else than absence of unsaturated fatty acids.

In conclusion, comparing our results to those of Guérin *et al.*, (2016) shows that at 8 °C in anaerobiosis, *B. weihenstephanensis* grew better in carrot broth than in BHI and that reciprocally, in aerobiosis, the bacterium grew better in BHI than in carrot broth. Oxygen seemed to have an opposite effect on vegetative cells of *B. weihenstephanensis* in carrot broth at low temperature compared to a rich laboratory medium as BHI. Interactions between the food matrix and environmental conditions during preparation and storage have marked influence on the fate of *B. weihenstephanensis*.

Acknowledgments

This study is part of the OPTIFEL project that received funding from the European Union's Seventh Framework Program for research, technological development and demonstration under grant agreement n° 311754. AG PhD grant is also from the EU Optifel project. We are grateful to Riantsoa Ratsimamanga.

References

- Abbas, A.A., Planchon, S., Jobin, M., Schmitt, P., 2014. Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*. Food Microbiol. 42, 122-131.
- Babic, I., Nguyenthe, C., Amiot, M.J., Aubert, S., 1994. Antimicrobial activity of shredded carrot extracts on food-borne bacteria and yeast. J. Appl. Bacteriol. 76, 135-141.
- Bennett, S.D., Walsh, K.A., Gould, L.H., 2013. Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*-United States, 1998-2008. Clin. Infect. Dis. 57, 425-433.
- Beuchat, L.R., Brackett, R.E., 1990. Inhibitory effects of raw carrots on *listeria-monocytogenes*. Appl. Env. Microbiol. 56, 1734-1742.
- Cadel Six, S., De Buyser, M.L., Vignaud, M.L., Dao, T.T., Messio, S., Pairaud, S., Hennekinne, J.A., Pihier, N., Brisabois, A., 2012. Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus*: Bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. BEH, 45-49.
- Cadel Six, S., Herbin, S., Vignaud, M.L., Chretien, R., Messio, S., Pairaud, S., Prigent, L., Hennekinne, J.A., Brisabois, A., 2014. Investigation d'une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) à *Bacillus cereus* producteurs d'entérotoxines. Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation 63, 20-23.
- Chen, H.J., Tsai, T.K., Pan, S.C., Lin, J.S., Tseng, C.L., Shaw, G.C., 2010. The master transcription factor Spo0A is required for poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) accumulation and expression of genes involved in PHB biosynthesis in *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol. Lett. 304, 74-81.
- Choma, C., Guinebretière, M.H., Carlin, F., Schmitt, P., Velge, P., Granum, P.E., Nguyen-The, C., 2000. Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. J. Appl. Microbiol. 88, 617-625.

Chapitre 5 : Le destin de *Bacillus weihenstephanensis* dans un bouillon de carotte : impact de la température et de l'oxygène

- Daelman, J., Membré, J.-M., Jacxsens, L., Vermeulen, A., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., 2013. A quantitative microbiological exposure assessment model for *Bacillus cereus* in REPFEDs. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 433-449.
- De Sarrau, B., Clavel, T., Bornard, I., Nguyen-the, C., 2013b. Low temperatures and fermentative metabolism limit peptidoglycan digestion of *Bacillus cereus*. Impact on colony forming unit counts. *Food Microbiology* 33, 213-220.
- De Sarrau, B., Clavel, T., Zwickel, N., Despres, J., Dupont, S., Beney, L., Tourdot-Marechal, R., Nguyen-the, C., 2013a. Unsaturated fatty acids from food and in the growth medium improve growth of *Bacillus cereus* under cold and anaerobic conditions. *Food Microbiology* 36, 113-122.
- Degirmenci, H., Karapinar, M., Karabiyikli, S., 2012. The survival of *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes* in black carrot (*Daucus carota*) juice. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 212-215.
- Del Torre, M., Della Corte, M., Stecchini, M.L., 2001. Prevalence and behaviour of *Bacillus cereus* in a REPFED of Italian origin. *Int. J. Food Microbiol.* 63, 199-207.
- EFSA, 2012. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA J.* 10, 2597.
- EFSA, 2013. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA J.* 11, 3129.
- EFSA, 2014. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA J.* 12, 3547.
- EFSA, 2015. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.* 13, 3991.

Chapitre 5 : Le destin de *Bacillus weihenstephanensis* dans un bouillon de carotte : impact de la température et de l'oxygène

- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Scherer, S., 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Molecular Nutrition & Food Research* 48, 479-487.
- Forghani, F., Kim, J.-B., Oh, D.-H., 2014. Enterotoxigenic Profiling of Emetic Toxin- and Enterotoxin-Producing *Bacillus cereus*, Isolated from Food, Environmental, and Clinical Samples by Multiplex PCR. *J. Food Sci.*, 2288-2293.
- Guérin, A., Dargaignaratz, C., Broussolle, V., Clavel, T., Nguyen-the, C., 2016. Combined effect of anaerobiosis, low pH and cold temperatures on the growth capacities of psychrotrophic *Bacillus cereus*. *Food Microbiol.* 59, 119-123.
- Guinebretière, M.-H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., De Vos, P., 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Env. Microbiol.* 10, 851-865.
- Guinebretiere, M.H., Velge, P., Couvert, O., Carlin, F., Debuyser, M.L., Nguyen-The, C., 2010. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *J Clin Microbiol* 48, 3388-3391.
- InVS, 2012. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives, Données de la déclaration obligatoire. Institut de veille sanitaire.
- InVS, 2013. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives, Données de la déclaration obligatoire. Institut de veille sanitaire.
- InVS, 2014. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives, Données de la déclaration obligatoire. Institut de veille sanitaire.
- Lopez, J.A., Naranjo, J.M., Higueta, J.C., Cubitto, M.A., Cardona, C.A., Villar, M.A., 2012. Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 17, 250-258.

Chapitre 5 : Le destin de *Bacillus weihenstephanensis* dans un bouillon de carotte : impact de la température et de l'oxygène

- Lund, T., De Buyser, M.-L., Granum, P.E., 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology* 38, 254-261.
- Luu-Thi, H., Khadka, D.B., Michiels, C.W., 2014. Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 189, 183-188.
- Nguyenthe, C., Lund, B.M., 1991. The lethal effect of carrot on listeria species. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 479-488.
- Nguyenthe, C., Lund, B.M., 1992. An investigation of the antibacterial effect of carrot on *listeria-monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 23-30.
- Noriega, E., Newman, J., Saggars, E., Robertson, J., Laca, A., Diaz, M., Brocklehurst, T.F., 2010. Antilisterial activity of carrots Effect of temperature and properties of different carrot fractions. *Food Research International* 43, 2425-2431.
- Obruca, S., Sedlacek, P., Mravec, F., Samek, O., Marova, I., 2016. Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Appl. Microbiol. Biot.* 100, 1365-1376.
- Pandiani, F., Brillard, J., Bornard, I., Michaud, C., Chamot, S., Nguyen-the, C., Broussolle, V., 2010. Differential involvement of the five RNA helicases in adaptation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 to low growth temperatures. *Appl Environ Microbiol* 76, 6692-6697.
- Samapundo, S., Everaert, H., Wandutu, J.N., Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Devlieghere, F., 2011. The influence of headspace and dissolved oxygen level on growth and haemolytic BL enterotoxin production of a psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* isolate on potato based ready-to-eat food products. *Food Microbiol.* 28, 298-304.
- 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. Env. Microbiol.* 72, 1569-1578.
- Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E., 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *Fems Microbiol. Rev.* 32, 579-606.
- Valero, M., Fernández, P.S., Salmerón, M.C., 2003. Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 71-79.
- 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 Microbiology* 19, 491-499.
- Valero, M., Hernández-Herrero, L.A., Giner, M.J., 2007. Survival, isolation and characterization of a psychrotrophic *Bacillus cereus* strain from a mayonnaise-based ready-to-eat vegetable salad. *Food Microbiology* 24, 671-677.
- Valero, M., Leontidis, S., Fernández, P.S., Martínez, A., Salmerón, M.C., 2000. Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5–30°C. *Food Microbiol.* 17, 605-612.
- Vilas-Boas, G., Sanchis, V., Lereclus, D., Lemos, M.V.F., Bourguet, D., 2002. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Env. Microbiol.* 68, 1414-1424.
- Wang, Q., Yu, H.M., Xia, Y.Z., Kang, Z., Qi, Q.S., 2009. Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application. *Microb. Cell Fact.* 8.
- Wu, D.D., He, J., Gong, Y.H., Chen, D.J., Zhu, X.L., Qiu, N., Sun, M., Li, M.S., Yu, Z.N., 2011. Proteomic analysis reveals the strategies of *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 for survival under long-term heat stress. *Proteomics* 11, 2580-2591.

Chapitre 5 : Le destin de *Bacillus weihenstephanensis* dans un bouillon de carotte : impact de la température et de l'oxygène

Zhao, Y.H., Li, H.M., Qin, L.F., Wang, H.H., Chen, G.Q., 2007. Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. FEMS Microbiol. Lett. 276, 34-41.

5.4. Complementary results

Influence of carrot broth preparation on *B. weihenstephanensis* KBAB4 cell morphology

Other preparations of carrot broth were tested with Nantaise carrots from Normandy, France.

In addition to the carrot broth presented in the previous article (carrot broth type 1), a second type of preparation consisted in washing carrots, peeling, grating, transferring them in a glass beaker with sterile water and heating in a microwave during 6 min at 450 W (Panasonic). Grated carrots were then transferred into a stomacher bag with filter and the subsequent steps were as described in the first type of preparation.

A third type of preparation consisted in washing, peeling carrots and extracting the juice with an extractor (Moulinex). The juice and the pulp were recovered, transferred into a sterile flask, diluted with phosphate buffer at pH 7.0 ± 0.2 , distributed into different types of tubes and flasks and treated as described in the first type of preparation.

In a fourth type of preparation, carrots were washed, peeled and cut in slices and cooked during 12 min with a pressure cooker (Nutricook, SEB). The slices of carrot were mixed as in the previous preparations with phosphate buffer pH 7.0 ± 0.2 and stomached (2 min), filtered and distributed in KIMAX and Hungate tubes. These tubes were sterilized by heating 120 °C during 20 min.

No growth was observed at 30 °C after inoculation of the carrot broth cooked with pressure cooker and sterilized with autoclave (carrot broth type 4). Few minutes (< 5 min) after inoculation with 10^3 CFU/ml of *B. weihenstephanensis* KBAB4, no surviving cells were found in the broth with a limit of detection of 10 CFU/ml. For the other three types of carrot broth preparations (with microwave, with water bath or with juice extractor), the inoculation was performed after tyndallization in aerobic conditions instead of autoclave sterilisation, and cultures were incubated at 30 °C during 72 h. The cells morphology differed among the three types of broths (Fig 5A, B and C). Cells of *B. weihenstephanensis* KBAB4 in carrot broth prepared with heating in water bath at 80 °C appeared in phase contrast microscopy as opaque, regular, rectangular bacilli typical (De Vos *et al.*, 2009) of vegetative cells of *B. weihenstephanensis*, among carrot debris (Fig 5A). In carrot broth prepared with juice

Chapitre 5 : Le destin de *Bacillus weihenstephanensis* dans un bouillon de carotte : impact de la température et de l'oxygène

extractor, vegetative cells of *B. weihenstephanensis* KBAB4 contained many inclusion bodies and were longer and more irregular than vegetative cells grown in the carrot broth prepared with water bath (Fig 5B). In the carrot broth prepared by heating in the microwave, only spores of *B. weihenstephanensis* KBAB4 were observed (Fig 5C).

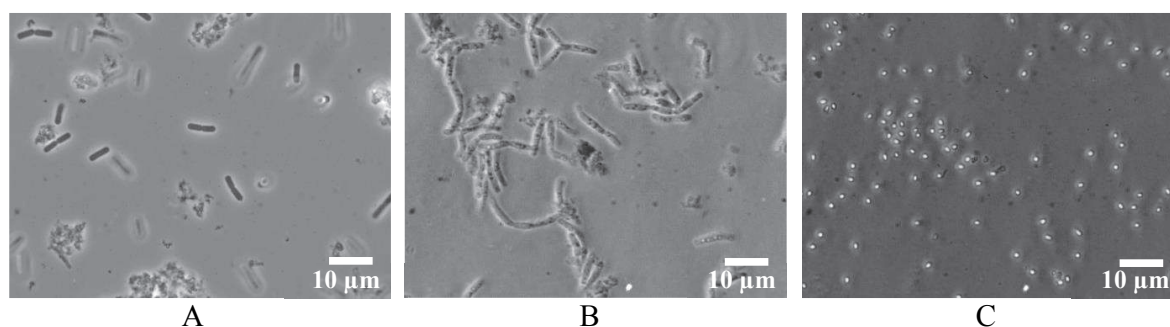


Figure 5. Phase contrast microscopic observations (X 100) of *B. weihenstephanensis* KBAB4 inoculated in different carrot broth preparations A) Grated carrot cooked without oxygen in a water bath at 80 °C during 1 h; B) Carrot broth prepared with Juice extractor; C) Grated carrot cooked in microwave during 6 min at 450W. In A, B and C, carrot materials were eventually mixed with phosphate buffer pH 7.0 and sterilized by tyndallization.

In this study, we observed that carrot broth preparation had an important influence on *B. weihenstephanensis* KBAB4 vegetative cells. Several factors were involved during these different types of preparations as the presence of oxygen, mode of heating, steps of heating versus destructuration of carrot tissue and sterilization temperature. Cells of *B. weihenstephanensis* KBAB4 grown in the tyndallized carrot broth preparations were very different with more inclusions and irregular shapes in some broths, or rapid sporulation. Carrot broth sterilized at 120 °C, 20 min (broth type 4), killed the vegetative cells inoculated and did not permit *B. weihenstephanensis* growth, whereas the bacterium grew in the three types of carrot broth sterilized by tyndallization at 80 °C. Grinding raw carrot or heating carrot in presence of air (broths type 2 and 3) to prepare the broth led to unusual cells morphology or to a rapid sporulation. The elongated and irregular cells, or the rapid sporulation and presumably lysis of the cells might indicate stressing conditions to the

Chapitre 5 : Le destin de *Bacillus weihenstephanensis* dans un bouillon de carotte : impact de la température et de l'oxygène

bacterium. For this reason, experiments described in the previous article were done with carrots prepared by heating in a water bath (carrot broth type 1).

Depending on broth preparation, molecules from carrots could react differently and become stressful or inhibitory for vegetative cells of *B. weihenstephanensis* KBAB4. Previous studies have shown that Maillard reaction in food products could create antibacterial molecule as mélanoïdin or aminoreductone for example (Rufian-Henares and de la Cueva, 2009; Rufian-Henares and Morales, 2007, 2008; Trang et al., 2013; Trang et al., 2009; Trang et al., 2011). Maillard reaction likely occurred during preparation of broth type 4. In tyndallized broths, exposure to air differentiate preparations 2 and 3 from preparation 1, during heating of carrot (preparation 2) or during grinding to extract juice (preparation 3). It is possible that oxidation products caused stress of *B. weihenstephanensis* cells.

5.5. Conclusion

En conclusion, en comparant avec les résultats obtenus dans l'article Guérin *et al.*, (2016) nous avons mis en évidence qu'à 8 °C en anaérobiose, *B. weihenstephanensis* KBAB4 se développait mieux dans un bouillon de carotte qu'en BHI, alors qu'en aérobiose, un effet létal tue tout ou partie des cellules de *B. weihenstephanensis* dans le bouillon de carotte et empêche sa croissance à 8 °C. L'oxygène et la température semblaient avoir un effet opposé sur les cellules végétatives de *B. weihenstephanensis* dans le bouillon de carotte comparé à un milieu riche de laboratoire comme le BHI. Cette étude montre que les interactions possibles entre la matrice de l'aliment et les conditions environnementales pendant la préparation des produits alimentaires ainsi que pendant leur stockage peuvent avoir une influence marquée sur *B. weihenstephanensis*.

Chapitre 6 :
La production de céréulide par *Bacillus weihenstephanensis* à différentes températures et pH

6. Chapitre 6 : La production de céréulide par

***Bacillus weihenstephanensis* à différentes températures et pH**

6.1. Introduction

Le céréulide correspond à la toxine émétique produite par certaines souches de *B. cereus* (Ehling-Schulz *et al.*, 2004; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Le céréulide est une toxine stable à la chaleur et à l'acide, c'est un dodécadepsipeptide cyclique avec une structure [D-O-Leu-D-Ala-O-Val-L-Val]₃ et une masse molaire égale à 1153 Da (Agata *et al.*, 1995; Teplova *et al.*, 2006). Il est synthétisé de façon non ribosomique par une synthase peptidique, la céréulide synthase, codée par un cluster de gènes (gène *ces*) (Ehling-Schulz *et al.*, 2005). Les gènes *ces* sont généralement localisés sur un méga-plasmide appelé pCER270 qui est proche du plasmide pXO1 de *Bacillus anthracis* (Ehling-Schulz *et al.*, 2015; Ehling-Schulz *et al.*, 2006a; Hoton *et al.*, 2005), mais chez de rares souches de *B. cereus*, ils sont localisés sur un plasmide de taille différente ou sur le chromosome (Mei *et al.*, 2014). Les effets néfastes du céréulide chez l'Homme ne sont pas complètement connus. Les principaux symptômes sont de sévères vomissements pouvant aller jusqu'à des déficiences hépatiques graves, voir des décès (Agata *et al.*, 1995; Dierick *et al.*, 2005; Ehling-Schulz *et al.*, 2004; Hoton *et al.*, 2005; Mahler *et al.*, 1997; Mikkola *et al.*, 1999; Naranjo *et al.*, 2011; Paananen *et al.*, 2002; Teplova *et al.*, 2006).

La majorité des souches de *B. cereus* productrices de céréulide sont des souches mésophiles qui appartiennent au groupe phylogénétique III avec un domaine de croissance compris entre 15 °C et 45 °C (Carlin *et al.*, 2006; Guinebretière *et al.*, 2008). Ces souches sont incapables de se développer et de produire du céréulide durant le stockage au froid de produits alimentaires. Cependant, certaines souches psychrotolérantes de *B. weihenstephanensis* appartenant au groupe phylogénétique VI du groupe *B. cereus sensu lato* (Guinebretière *et al.*, 2008; Guinebretiere *et al.*, 2010), ont été décrites comme capables de produire également du céréulide (Hoton *et al.*, 2009; Thorsen *et al.*, 2006). Ces souches représentent un risque important au niveau de la sécurité alimentaire pour les consommateurs, notamment elles se développent et produisent du céréulide durant l'étape de stockage au froid des produits alimentaires, car il est certain que cette toxine ne pourra être éliminée par un simple réchauffage du produit avant sa consommation. Par contre, la production de céréulide par ce type de souche à basse température est toujours débattue aujourd'hui. Une récente

étude a montré que la souche *B. weihenstephanensis* MC67 se développait à 8 °C et produisait environ 230 ppb de céréulide par poids de biomasse bactérienne après 9 jours (Rossvoll *et al.*, 2014). Cependant de précédentes études montrent qu'à 8 °C cette même souche produisait du céréulide à un niveau proche de la limite de détection sur du milieu BHI agar (Thorsen *et al.*, 2009a).

L'objectif de cette étude était de déterminer l'impact de la température de croissance et du pH sur la production de céréulide par *B. weihenstephanensis* MC67 et de *B. weihenstephanensis* BtB2-4 (Hoton *et al.*, 2009; Rossvoll *et al.*, 2014; Thorsen *et al.*, 2006). Ces deux souches émétiques sont distantes d'un point de vue phylogénétique et les gènes *ces* sont plasmidiques pour la souche MC67 et semblent chromosomique pour la souche BtB2-4 (Hoton *et al.*, 2009; Mei *et al.*, 2014).

6.2. Résultats et discussion

Les deux souches de *B. weihenstephanensis*, MC67 et BtB2-4, ont été cultivées sur boîtes de gélose (PCA ou TSA), de différents pH (5,4 à 7,0) et à différentes températures allant de 8 °C à 25 °C. La concentration bactérienne ainsi que la quantité de céréulide produite ont été déterminées au long de la croissance. Ces deux souches psychrotolérantes ont été capables de se développer dans toutes les conditions testées excepté à 8 °C à pH 5,6. De précédentes études ont montré que le céréulide était détecté pendant la phase stationnaire (Dommel *et al.*, 2011; Thorsen *et al.*, 2009a), c'est pourquoi la quantification de céréulide a été réalisée pour les échantillons prélevés à partir de la fin de la phase exponentielle de croissance (Rossvoll *et al.*, 2014). A ce stade de croissance le poids de biomasse par boîte était d'environ 65 ± 10 mg à 25 °C et de 35 ± 5 mg à des températures plus basses (entre 15 et 8 °C).

Influence de la température de croissance sur la production de céréulide

A pH 7 pour les deux souches étudiées, la phase stationnaire de croissance a été atteinte à partir de 9 à 10 jours à 8 °C avec des $N_{\max}$ entre 8,5 et 9,5 log₁₀ UFC/ml (Fig 1).

La limite de quantification du céréulide de la méthode d'analyse de dosage utilisée dans cette étude était de 0,7 ng/ml et la limite de détection de 0,1 ng/ml (Ronning *et al.*, 2015). Par rapport à celles-ci, nous avons considéré qu'il y avait une faible production de céréulide à 8 °C par *B. weihenstephanensis* MC67, mais non quantifiable, contrairement aux productions observées à des températures allant de 10 °C à 25 °C. La souche BtB2-4 produisait du céréulide à une concentration quantifiable à partir de 8 °C ainsi qu'aux autres températures testées. Pour les deux souches, la production de céréulide augmentait avec l'élévation des températures d'incubation. Par contre, la production de céréulide par BtB2-4 était toujours plus élevée que celle de MC67 dans toutes les conditions testées (Fig 1). De plus, les croissances des deux souches à 10 °C, pH 7,0 sur des boîtes de PCA et TSA étaient similaires avec une entrée en phase stationnaire de croissance après 7 jours d'incubations (Fig 1 et 2). La production de céréulide était similaire entre les deux milieux testés (Fig 1 et 2). La production de céréulide à 15 °C était similaire à celle observée à 10 °C (Fig 1). Par contre, à 25 °C la production de céréulide à pH 7,0 sur PCA était beaucoup plus élevée pour la souche BtB2-4 avec un maximum en fin de phase stationnaire (> 1000 ng/ml) (Fig 1). La même cinétique de production a été observée pour la souche MC67 mais à un niveau nettement inférieur, ne dépassant pas 13,20 ng/ml après 4 jours (Fig 1).

Dans cette étude, la phase de croissance correspondant au maximum de production de céréulide variait en fonction de la température de croissance. Pour la souche BtB2-4, entre 8 °C et 15 °C, le maximum de production de céréulide était en début de phase stationnaire de croissance et diminuait par la suite. A 25 °C, c'était l'inverse, la production de céréulide augmentait tout au long de la phase stationnaire de croissance (Fig 1).

Nos résultats avec la souche MC67 montrent une très faible production de céréulide à 8 °C, conformément à ceux de Thorsen *et al.*, (2009a). Par contre la souche BtB2-4 produisait du céréulide nettement au-dessus des limites de détection et quantification, montrant que la production de cette toxine est possible à 8 °C, en accord avec les conclusions de Rossvoll *et al.*, 2014.

Dans notre étude, la baisse de température de croissance réduisait la production de céréulide pour l'ensemble des souches de *B. weihenstephanensis* testées. Ceci était particulièrement visible pour la souche BtB2-4 qui produisait 1000 ng/ml de céréulide à 25 °C, 10 ng/ml à 15 °C ou 10 °C et 2 ng/ml à 8 °C. Une faible production de céréulide a été observée à 10 °C sur les deux milieux testés, bien que ces deux milieux diffèrent pour les concentrations en NaCl, glucose et peptones, composés qui sont connues pour influencer la production de céréulide (Dommel *et al.*, 2010; Dommel *et al.*, 2011).

Influence du pH sur la production de céréulide

Les croissances des deux souches sur des boîtes de PCA à pH 6,0 et 7,0 à 25 °C étaient similaires (Fig 1 et 3). A pH 5,4 les croissances étaient plus lentes (Fig 1 et 3). La production de céréulide à pH 6,0 augmentait pendant la phase stationnaire comme à pH 7,0 (Fig 1 et 3). A ces valeurs de pH, la production de céréulide par la souche BtB2-4 était plus élevée que pour la souche MC67. Le maximum de production de céréulide de la souche BtB2-4 à pH 6,0 était d'environ 400 ng/ml, plus faible qu'à pH 7,0. Par contre, la souche MC67 avait un maximum de production de 11 ng/ml à pH 6,0, ce qui n'était pas différent de la production qui a été obtenue à pH 7,0 (15 ng/ml) ($p > 0,05$) (Fig 1 et 3). Puis, quand le pH était réduit à 5,4, le maximum de production de céréulide était de 45,2 ng/ml pour BtB2-4 et 5,5 ng/ml pour MC67 (Fig 3).

Les conditions environnementales de croissance influencent la production de céréulide des souches de *B. weihenstephanensis*. La baisse de pH réduisait la production de céréulide, en particulier à pH 5,4 même si le maximum de la population bactérienne atteinte était le même qu'à pH 7,0 (environ 10^9 UFC/ml). La variation de production de céréulide en fonction du pH avait été montrée pour des souches mésophiles de *B. cereus*, dans des matrices alimentaires (Dommel *et al.*, 2010). Cependant, l'hypothèse émise était que la composition de la matrice alimentaire influencerait la production de céréulide en plus de l'effet du pH (Ehling-Schulz *et al.*, 2015). Nos résultats montrent que dans un même milieu de laboratoire, le pH influence la production de céréulide, même à des valeurs permettant la croissance de *B. weihenstephanensis*.

6.3. Cereulide production by *Bacillus weihenstephanensis* during growth at different temperatures and pH

Article en préparation

Cereulide production by *Bacillus weihenstephanensis* during growth at different temperatures and pH

Alizée Guérin¹, Helene Thorsen Rønning³, Claire Dargaignaratz¹, Thierry Clavel¹,

Véronique Broussolle¹, Jacques Mahillon², Per Einar Granum³ and Christophe Nguyen-the^{1*}

¹ UMR408 SQPOV « Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale », INRA, University of Avignon, 84000 Avignon, France

² Laboratory of Food and Environmental Microbiology, Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

³ Norwegian University of Life Sciences, NMBU School of Veterinary Science, Oslo, Norway

*Corresponding author. Mailing address: INRA, UMR408, site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9, France. Phone: +33 (0)4 32 72 25 21, Fax: +33 (0)4 32 72 24 92, Email: Christophe.nguyen-the@avignon.inra.fr

Abstract

Some strains of the psychrotolerant potentially foodborne pathogen *Bacillus weihenstephanensis* can produce the emetic toxin (cereulide) known from *Bacillus cereus*. This toxin is a heat- and acid-stable cyclic dodecadepsipeptide that causes food intoxication with vomiting symptoms. However, some severe clinical cases with lethal outcome have been described. If cereulide can be produced during refrigerated storage, it will not be inactivated by food reheating, representing an important risk of food intoxications for consumers of refrigerated foods. In this paper, we determined the capacity of the *B. weihenstephanensis* strains BtB2-4 and MC67 to grow and to produce cereulide at temperatures from 8 °C to 25 °C and at pH from 5.4 to 7.0. At 8 °C strain BtB2-4 produced céréulide whereas it was at the limit of detection for strain MC67. For BtB2-4, cereulide production increased 5-fold between 8 °C and 10-15 °C whereas it increased by more than 100-fold between 15 °C and 25 °C. Decreasing pH to 5.4 reduced cereulide production by strain BtB2-4 by at least 20-fold. However, cereulide produced at 10 °C pH 7.0 and 25 °C pH 5.4 were respectively similar to, and 4 times higher than, the lowest concentration measured in previous works in foods implicated in emetic poisoning. This shows how important it is to keep the temperature below at least 8 °C in the refrigerator at all time.

Keywords

Cereulide, *Bacillus weihenstephanensis*, pH, Low temperature

Introduction

Cereulide is the emetic toxin produced by some strains of the spore-forming pathogen *Bacillus cereus*, which is responsible for food poisoning when present in foods upon consumption (Ehling-Schulz *et al.*, 2004; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Cereulide is a heat- and acid-stable cyclic dodecadepsipeptide which structure is [D-O-Leu-D-Ala-O-Val-L-Val]₃ and molecular mass 1153 Da (Agata *et al.*, 1995; Teplova *et al.*, 2006). Cereulide is synthesized by a nonribosomal peptide synthase encoded by the cereulide synthase gene (*ces*) cluster (Ehling-Schulz *et al.*, 2005), located on a megaplasmid, named pCER270 and related to the toxin plasmid pXO1 of *Bacillus anthracis* (Ehling-Schulz *et al.*, 2015; Ehling-Schulz *et al.*, 2006a; Hoton *et al.*, 2005). The effects of cereulide on the human body have not been completely elucidated yet. In the duodenum, this toxin acts on the 5-HT₃ receptor and causes vomiting with a simulation of the afferent vagus nerve 0.5-6 h after the ingestion of contaminated food (Agata *et al.*, 1995; Ehling-Schulz *et al.*, 2004). Cereulide acts as a K⁺ ionophore with a mechanism of action similar to that of valinomycin. It interferes with oxidative phosphorylation on mitochondrial membranes (Hoton *et al.*, 2005; Mikkola *et al.*, 1999) (Paananen *et al.*, 2002; Teplova *et al.*, 2006). Cereulide is increasingly involved in severe clinical cases leading in some cases to death of the patient (Dierick *et al.*, 2005; Mahler *et al.*, 1997; Naranjo *et al.*, 2011).

The majority of the *B. cereus* strains producing cereulide are mesophilic (Carlin *et al.*, 2006) and belongs to phylogenetic group III, growing between 15 °C and 45 °C (Guinebretière *et al.*, 2008). These strains are not able to grow and produce cereulide during food cold storage. However, some psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* strains, belonging to *Bacillus cereus sensu lato* group and classified into the phylogenetic group VI (Guinebretière *et al.*, 2008; Guinebretiere *et al.*, 2010), were found able to produce cereulide (Hoton *et al.*, 2009; Thorsen *et al.*, 2006). These psychrotolerant cereulide-producing strains represent a potentially serious food safety risk for consumers of cooked-refrigerated foods. Indeed, if these strains grow and produce cereulide during food storage at low temperature, the emetic toxin will not be inactivated by food reheating before consumption. However, the production of cereulide at low temperatures by these psychrotolerant strains is still debated. For instance, a recent study showed that *B. weihenstephanensis* MC67 grew at 8 °C and produced around 230 ppb of cereulide per bacterial wet biomass after 9 days on PCA

(Rossvoll *et al.*, 2014). In contrast, a previous study showed that this strain produced cereulide at a level close to the limit of detection at 8 °C after 1, 2 or 3 weeks on BHI-agar (Thorsen *et al.*, 2009a). Furthermore, another cereulide-producing strain, *B. weihenstephanensis* M118, did not produce cereulide in cooked meat sausages stored at 8 °C (Thorsen *et al.*, 2009b). At higher temperatures, the quantity of cereulide produced varied according to the food products and seems to depend on the food pH. For example, a mesophilic emetic *B. cereus* strain produced 2.4 µg/g of cereulide in liver sausages at pH 6.2 and 1.0 µg/g in a quark dessert with vanilla flavour at pH 5.1 (Dommel *et al.*, 2010).

All studies on cereulide production by *B. weihenstephanensis* reported so far have been done using the psychrotolerant MC67 and MC118 strains, which are phylogenetically very close, both harbouring the *ces* genes on a similar plasmid (Mei *et al.*, 2014).

The goal of the present study was to determine the impact of growth temperature and pH on cereulide production by *B. weihenstephanensis* MC67 and another psychrotolerant *B. weihenstephanensis* BtB2-4 strain, (Hoton *et al.*, 2009; Rossvoll *et al.*, 2014; Thorsen *et al.*, 2006). Among the cereulide producing *B. weihenstephanensis*, these two strains are phylogenetically distant (Hoton *et al.*, 2009; Mei *et al.*, 2014).

Materials and methods

Strains

The cereulide-producing strains used in this study were *B. weihenstephanensis* MC67, isolated from soil in a sandy loam on the island of Møn, Denmark and *B. weihenstephanensis* BtB2-4 isolated from a forest soil (Hoton *et al.*, 2009; Thorsen *et al.*, 2006), as well as *B. weihenstephanensis* KBAB4 strain isolated from forest soil and used as a non cereulide-producing strain (Sorokin *et al.*, 2006; Vilas-Boas *et al.*, 2002) also belonging to group VI phylogenetic group.

Growth conditions

Growth conditions were adapted from Rossvoll *et al.*, (2014): briefly, the stock of cultures consisted in suspensions of exponential phase cells (OD_{600} of 0.5) in 30 % final concentration of glycerol, stored at -80°C . Frozen suspensions were streaked on to Plate Count Agar (PCA; Oxoid) and incubated at 30°C overnight. Three colonies were transferred to 10 ml Tryptic Soy Broth (TSB; Oxoid) in KIMAX tubes and cultured for 18 to 20 h at 20°C under shaking at 200 rpm. Cultures were then transferred at 4°C during 18-21 h for cold adaptation prior to growth (Rossvoll *et al.*, 2014).

Bacterial growth was performed on PCA plates and also on Tryptic Soy Agar plates at 10°C (TSA; Sigma-Aldrich). The pH of PCA plates was 7.0 ± 0.2 and was adjusted to 6.0, 5.6 or 5.4 with HCl 1N or 6N, when necessary.

Each PCA plate was inoculated with 100 μl of a 10^3 CFU/ml dilution of the inoculum stored at 4°C , which gave around 10^2 cells per plate. The agar plates were incubated at temperatures varying between 8°C and 25°C . For each tested condition, growths were performed three times with independently prepared inocula (i.e. biological triplicates). Plates were removed daily for the determination of viable cell counts. As 95 % of the cereulide is contained in the bacterial biomass (Thorsen *et al.*, 2009a), the cells were collected from the agar surface using 2 ml of sterile water and a sterile L-shaped spreader. An aliquot of 100 μl of each suspension was used and plated in serial dilutions on Luria Bertani plates (LB; Biokar), and then incubated at 30°C . The rest of the cell suspension was stored at -20°C for cereulide extraction.

Wet weight of the bacterial biomass collected in sterile water from plates not used for cereulide extraction but grown in the same condition, was determined after centrifugation (5,000 g, 5 min) of the suspension in pre-weighed 1.5 ml micro-tubes and elimination of the supernatant. The biomass was then re-suspended in 1 ml of sterile water to determine the number of CFU/ml.

Extraction of cereulide

For cereulide extraction (Ronning *et al.*, 2015), 1.4 ml of all samples were transferred into 2 ml non-skirted microtubes with O-ring seal cap (Dutscher) with 0.3 g of 0.1 mm silica spheres (MP Biomedical) and cells were disrupted during 45 s at 1500 bpm (beats per min) with Mini-GTM (SPEX®SAMPLEPREP). After centrifugation 3 min at 19,000 g, 1 ml of each sample supernatant was recovered in 10 ml glass tubes. The internal standard (10 ng), $^{13}\text{C}_6$ -cereulide (> 95% purity, 20 µg/ml in acetonitrile; Chiralix), and 1 ml of methanol LC-MS Grade (Fischer chemical) were added to each glass tube. All samples were vigorously shaken during 30 s and evaporated to dryness by heating at 80 °C under a flow of nitrogen. Then, 1 ml of methanol was added and all samples were vigorously shaken during 30 s and centrifuged 5 min at 5,000 g. The supernatant was recovered in a new glass tube before a second evaporation step at 80 °C under a nitrogen flow. When samples were fully evaporated, 100 µl of methanol/sterile water (3/1 vol/vol) were added to glass tubes which were immediately vortexed for 30 s. The 100 µl samples were spun down and transferred into 0.2 µm nylon Micro centrifuge filter (Sigma-Aldrich) and centrifuged 1 min at 10,000 g. Filtrates were then transferred into HPLC vials (Screw vials 8 mm amber glass 12*32 mm with label; Interchim) containing 0.1 ml micro insert (Sigma-Aldrich) and stored at -20 °C before analysis with LC-MS/MS.

Calibration curve

The calibration curve, needed to quantify the cereulide in the samples, was done by adding cereulide (cereulide of > 95% purity, 50 µg/ml in acetonitrile; Chiralix) (Biesta-Peters *et al.*, 2010) to the fresh cell biomass of the non-cereulide producer *B. weihenstephanensis* KBAB4, to final concentrations of 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 and 100.0 ng/ml (Ronning *et al.*, 2015). KBAB4 cells were grown on PCA plates at 30 °C overnight as described above. The cells were collected from the plates, disrupted and centrifuged as described above for the emetic strains. This supernatant (1 ml) was supplemented with cereulide and underwent the subsequent steps of the cereulide extraction protocol described above, including the addition of $^{13}\text{C}_6$ -cereulide as an internal standard. The 18 samples of KBAB4 biomass were divided on the six cereulide concentrations levels. Several controls were included to the analysis such as,

extracts of KBAB4 cells alone and extracts of KBAB4 cells with either cereulide at 10 ng/ml or $^{13}\text{C}_6$ -cereulide.

Quantification of cereulide by LC-MSMS

The LC-MS/MS analysis was performed according to Rønning *et al.*, (2015) using an Agilent 1200 SL LC-system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled with an Agilent G6460 MS/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (Rønning *et al.*, 2015).

Expression of results

Amount of cereulide was expressed as ng per ml of the bacterial suspension washed off the agar plate, the whole biomass from one agar plate (19.6 cm^2) corresponding to 2 ml.

Statistical analysis

The results were expressed as the means of three independent biological replicates. A Student's T-test was used to compare mean values. The null hypothesis was rejected for $p < 0.05$.

Results

B. weihenstephanensis BtB2-4 and MC67 strains were able to grow under all tested conditions (Fig 1, 2 and 3), except at 8 °C with a pH 5.6 (data not shown). Because in artificially inoculated food samples or media, cereulide production usually started at the end of the exponential phase (Dommel *et al.*, 2011; Rønning *et al.*, 2015; Thorsen *et al.*, 2009a), extraction of cereulide was carried out on samples corresponding to the stationary phase of cell growth (Rossvoll *et al.*, 2014). At this stage of growth, biomass from one plate grown at 25 °C weighted $65 \pm 10\text{ mg}$ and $35 \pm 5\text{ mg}$ at cold temperatures.

Influence of growth temperature on cereulide production

B. weihenstephanensis BtB2-4 and MC67 strains grew between 8 °C and 25 °C on PCA plates at pH 7.0. The stationary growth phase was reached after 9-10 days incubation at 8 °C with a maximal population (N_{max}) of 9.42 log₁₀ CFU/ml for BtB2-4 strain and 8.50 log₁₀ CFU/ml for MC67 strain (Fig 1). The time to reach the stationary phase decreased with the increase of incubation temperature (Fig 1).

Cereulide detection limit of the quantification method used in this study was previously determined as 0.7 ng/ml (Ronning *et al.*, 2015). Considering this threshold, the MC67 strain was considered to produce cereulide, but at a level close to the detection limit and below the quantification limit at 8 °C, but clearly produced emetic toxin between 10 °C and 25 °C. The BtB2-4 strain produced cereulide since 8 °C and at all tested temperatures. For both strains, the production of cereulide increased with increasing growth temperature. Furthermore, the BtB2-4 cereulide production was always higher than that of MC67 (Fig 1). At 8 °C, the maximal cereulide production (2.17 ng/ml) by BtB2-4 was reached at the beginning of stationary growth phase (7 days). While cereulide production was below the detection limit (0.16 ng/ml) for MC67 over the 11 days of experiment (Fig 1). Growth at 10 °C pH 7.0 of these two *B. weihenstephanensis* strains on PCA and TSA was similar, with an entry into stationary phase after 7 days (Fig 1 and 2). Maximal population of BtB2-4 cells on PCA plates and TSA plates were not significantly different ($p > 0.05$), 9.32 log₁₀ CFU/ml and 9.95 log₁₀ CFU/ml respectively. However, the maximal population for MC67 strain was 9.23 log₁₀ CFU/ml on PCA plates and 9.81 log₁₀ CFU/ml on TSA plates, this difference being statistically significant ($p < 0.05$) (Fig 1 and 2). The maximal cereulide production of the two strains on TSA plates at 10°C, *ie* 6.83 ng/ml for BtB2-4 and of 4.30 ng/ml for MC67 respectively, was not significantly different ($p > 0.05$) (Fig 2). While the cereulide production of BtB2-4 strain (9.01 ng/ml) was similar on TSA and on PCA plates ($p > 0.05$), the production of the MC67 strain, was more important on TSA plates (4.30 ng/ml) than on PCA plates at 7 days (0.85 ng/ml). However, cereulide production of that strain was similarly low on both TSA and PCA plates for other incubation times at 10°C (< 0.6 ng/ml) (Fig 1 and 2).

At 15 °C, the maximal cereulide concentration produced by BtB2-4 strain was not higher than at 10 °C on TCA plates (Fig 1). The MC67 strain produced between 0.74 ng/ml and 2.45 ng/ml cereulide with a maximal concentration obtained after 7 days (Fig 1). At

Chapitre 6 : La production de céréulide par *Bacillus weihenstephanensis* à différentes températures et pH

25 °C, the production of cereulide on PCA plates at pH 7.0 was high for the BtB2-4 strain with the maximal cereulide concentration ($> 1,000$ ng/ml) reached at the end of the stationary growth phase (Fig 1). The same kinetics of cereulide production was observed for the MC67 strain, with however a lower maximal of cereulide concentration, not exceeding 13.20 ng/ml after 4 days (Fig 1). Cereulide production increased during the stationary phase at 25 °C, whereas it was maximal at the onset of the stationary phase for the lower temperatures tested.

Chapitre 6 : La production de céréulide par *Bacillus weihenstephanensis* à différentes températures et pH

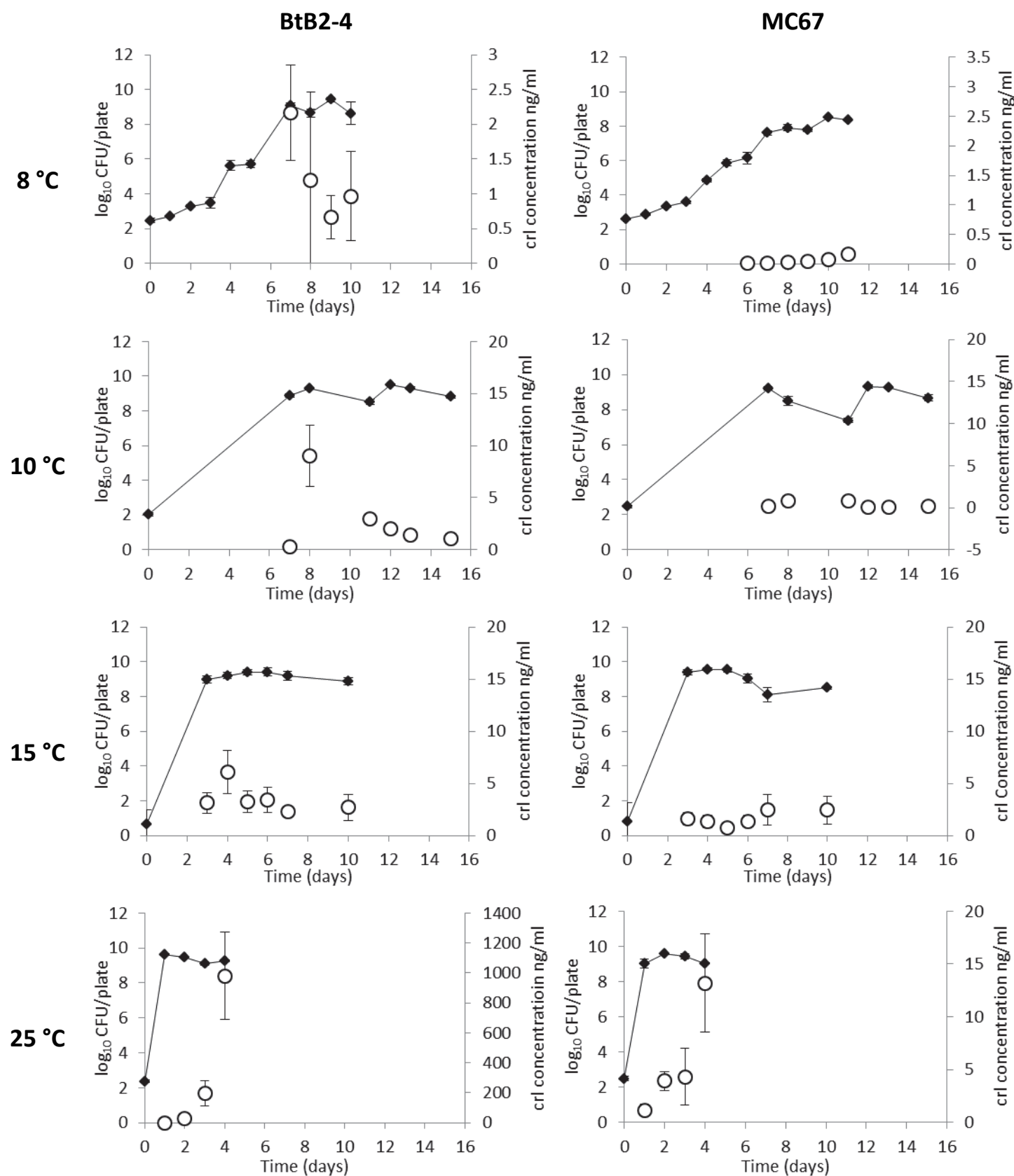


Figure 1. Growth curves of *Bacillus weihenstephanensis* BtB2-4 and MC67 ($\log_{10}$ CFU/plate) and the cereulide production (ng/ml) ($\circ$) at 8 °C, 10 °C, 15 °C and 25 °C on PCA plate at pH 7.0. Error bars indicate standard deviations and can be smaller than symbols. The whole bacterial biomass of one plate was washed off in 2 ml.

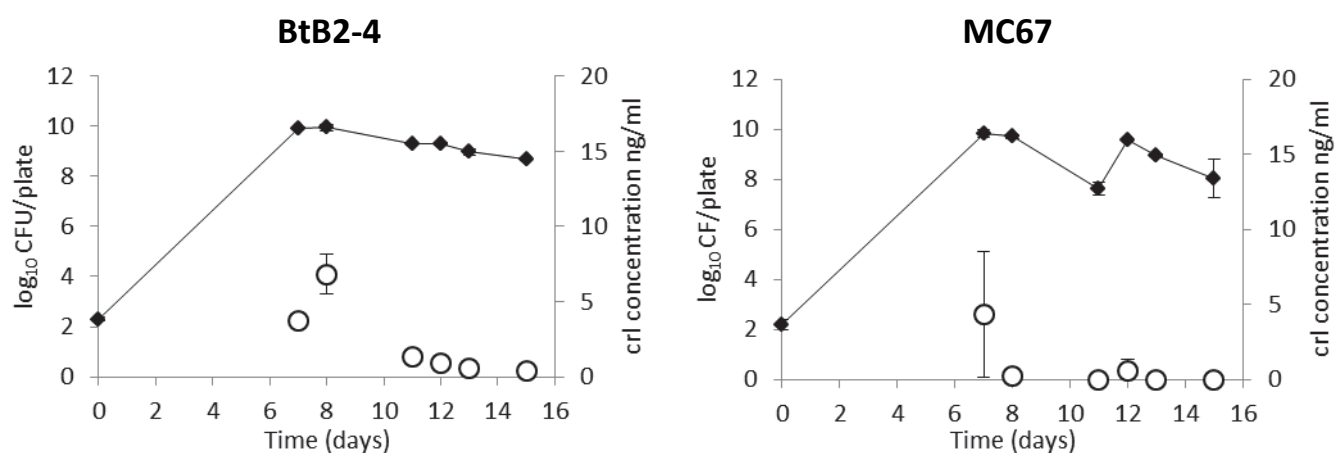


Figure 2. Growth curves of *B. weihenstephanensis* BtB2-4 and MC67 ($\log_{10}$ CFU/plate) and the cereulide production (ng/ml) ($\circ$) on TSA plate at pH 7.0 and at 10 °C. Error bars indicate standard deviations and can be smaller than symbols. The whole bacterial biomass of one plate was washed off in 2 ml.

Influence of pH on cereulide production

Growth of MC67 and BtB2-4 strains on PCA plates at pH 6.0 at 25 °C (Fig 3) was similar to those observed on PCA plates at pH 7.0 at 25°C (Fig 1). Growths of both strains on PCA plates at pH 5.4 were slower than those observed at pH 6.0 or 7.0 (Fig 1 and 3). Cereulide production increased during the stationary growth phase for both strains at pH 6.0 (Fig 3), as observed for pH 7.0 (Fig 1). At these pHs, BtB2-4 cereulide productions were more important than those of MC67 strain, as observed at pH 7.0 ($p < 0.05$). The maximal cereulide production of BtB2-4 strain at pH 6.0 and 25 °C was about 400 ng/ml, lower than the production at pH 7.0 (Fig 1 and 3), while the maximal cereulide production of MC67 strain at pH 6.0 (11 ng/ml) was not significantly different ($p > 0.05$) from that observed at

Chapitre 6 : La production de céréulide par *Bacillus weihenstephanensis* à différentes températures et pH

pH 7.0 (15 ng/ml) (Fig 1 and 3). When pH of PCA plates was reduced to 5.4, the maximal cereulide production of BtB2-4 strain was 45.2 ng/ml and 5.5 ng/ml for MC67 (Fig 3). It occurred after 3 days and declined thereafter. However, the BtB2-4 cereulide production at pH 5.4 at 25 °C was still significantly higher than that of MC67 at pH 7.0 at 25 °C ($p < 0.05$) (Fig 1 and 3).

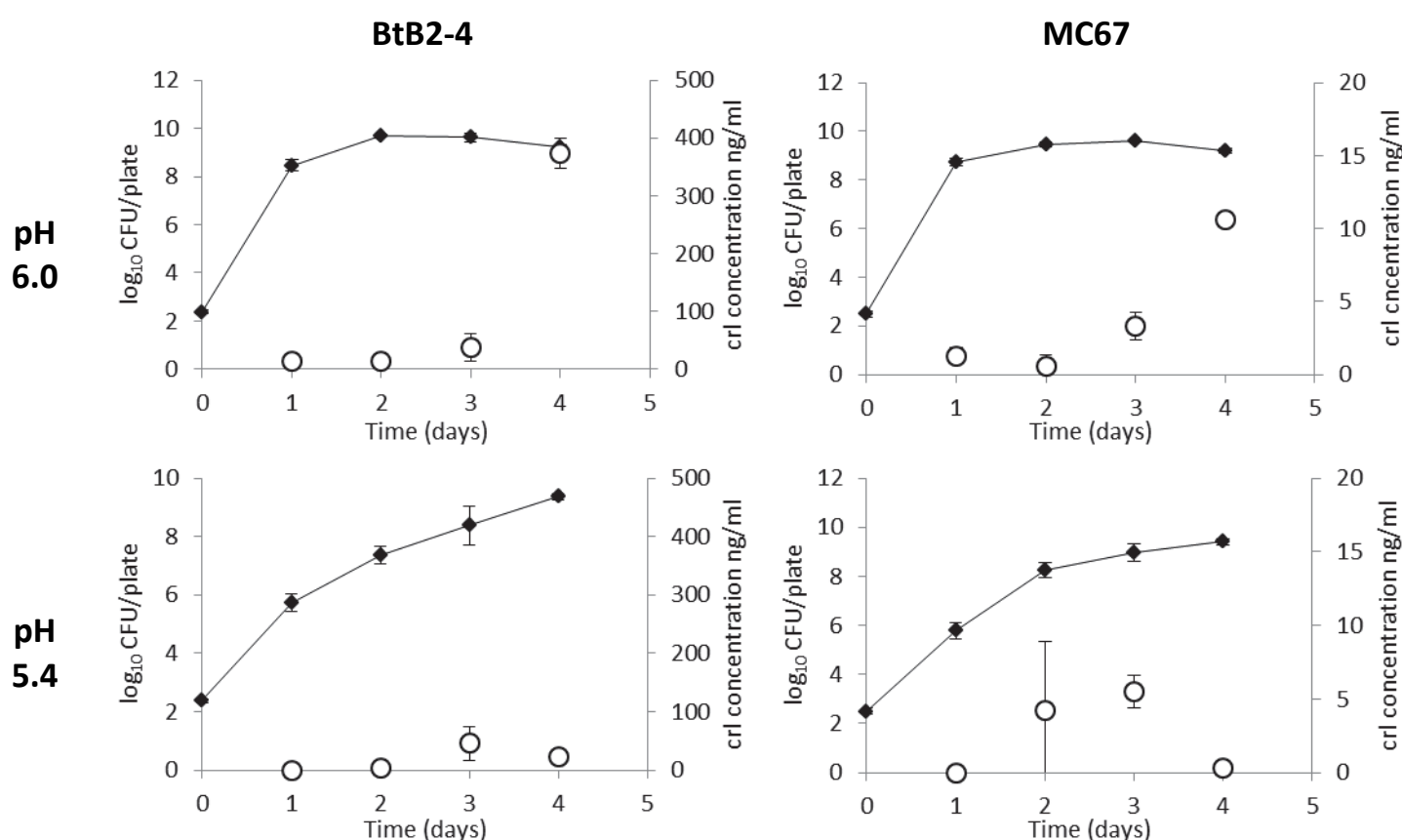


Figure 3. Growth curves of *B. weihenstephanensis* BtB2-4 and MC67 (log₁₀ CFU/plate) and the cereulide production (ng/ml) (○) on PCA plate at pH 6.0 or 5.4 at 25 °C. Error bars indicate standard deviations and can be smaller than symbols. The whole bacterial biomass of one plate was washed off in 2 ml.

Discussion

In our study, the growth phase corresponding to the maximal cereulide production varied, as expected, with the growth temperature. For *B. weihenstephanensis* BtB2-4, between 8 °C and 15 °C, the maximum cereulide production occurred at the beginning of the stationary growth phase and thereafter decreased. In contrast, at 25 °C, cereulide production increased during stationary growth phase. The kinetics was the same for *B. weihenstephanensis* MC67 at 25 °C but seemed to be different for the other temperatures.

When MC67 grew at 25 °C, the cereulide production did not exceed 13 ng/ml in the extract, corresponding to 22 ng/plate, which was low compared to previous results showing that MC67 produced up to 14 µg/cm² after 24 h at 25 °C (Thorsen *et al.*, 2009a). This may be due to differences in the protocols used for inoculum preparation and growth media as we used the protocol described by Rossvoll *et al.*, (2014). Thorsen *et al.*, (2009a) for *B. weihenstephanensis* and Dommels *et al.*, (2010) for mesophilic *B. cereus* showed an important influence of inoculum preparation on cereulide production. In particular, after a pre-incubation of the inoculated PCA plates at 8 °C during 2 or 3 weeks, the MC67 cereulide production at 25 °C was around 10,000 times lower (0.001 µg/cm²) than without pre-incubation (Thorsen *et al.*, 2009a). In the present study, the pre-incubation at 4 °C during 18-21 h before growth experiments could explain the low cereulide production. Expression of *ces* genes is activated by Spo0A and repressed by CodY, which linked cereulide production to the early stage of sporulation and to the nutritional and energy status of the cells (Ehling-Schulz *et al.*, 2015). Cold stress was shown to increase production of CodY in *Listeria monocytogenes* (Durack *et al.*, 2013). However, whether pre-incubation at cold temperature could influence CodY production in *B. weihenstephanensis* is not known. In any case, this possible effect of pre-incubation was strain dependent because in the same conditions, *B. weihenstephanensis* BtB2-4 produced much higher levels of cereulide than MC67. In MC67, the cereulide gene cluster is located on a plasmid and flanked by a composite transposon, which mobility was proved by transposition experiments (Mei *et al.*, 2014). Whether this peculiar genetic location of *ces* genes in MC67 might explain important variation in the expression of the cereulide synthase genes is not known.

Environmental conditions of growth influenced the amount of cereulide produced by *B. weihenstephanensis*. Lowering the medium pH reduced cereulide production, particularly

at pH 5.4, while *B. weihenstephanensis* reached a maximal population of around 10^9 CFU/plate similarly to pH 7.0. Cereulide production at various pH has been previously reported for mesophilic *B. cereus* strains in food matrices (Dommel *et al.*, 2010). These authors found higher cereulide production by *B. cereus* F4810/72 in béarnaise sauce at pH 5.8 (8.0 µg/g) than in cooked rice at pH 7.0 (1.8 µg/g) or also in camembert cheese at pH 7.9 (0.6 µg/g) (Dommel *et al.*, 2010). However, one could hypothesize that the food matrix may also have an influence on cereulide production interacting with the effect of pH (Ehling-Schulz *et al.*, 2015). Our results show that in the same laboratory medium, pH clearly influenced the cereulide production, even within values permitting *B. weihenstephanensis* growth. Similarly, addition of NaCl at growth permissive concentration (25 g/l) reduced cereulide production for mesophilic *B. cereus* strains (Dommel *et al.*, 2011).

In our study, lowering growth temperature markedly reduced cereulide production for both *B. weihenstephanensis* tested strains. This is particularly clear for strain BtB2-4 which produced 1000 ng/ml of cereulide at 25 °C, 10 ng/ml at 15 °C or 10 °C, and 2 ng/ml at 8 °C. The low cereulide production at low temperature (10 °C) was observed on the two tested growth media differing in their composition in NaCl, glucose and peptones known to influence cereulide production (Dommel *et al.*, 2010; Dommel *et al.*, 2011).

Storing foods at 4 °C prevents growth of *B. weihenstephanensis* (Guinebretière *et al.*, 2008). Yet, at cold temperatures allowing the growth of *B. weihenstephanensis*, it is important to assess if the amount of cereulide produced could cause food poisoning. It has been shown that 10 to 1280 ng/g of cereulide were present in 13 samples from foods identified as being the source of vomiting-type food poisoning due to cereulide produced by *B. cereus* (Agata *et al.*, 2002). According to this, and to the results of the present study, risk of emetic poisoning from food stored below 8 °C seemed very low. However, the amount of cereulide production by *B. weihenstephanensis* BtB2-4 at 10 °C-15 °C and 25 °C and pH 7.0, or at 25 °C and pH 5.7, could represent a risk for consumers if similar concentrations are found in food products. The present study and previous works show that the environmental conditions of growth (temperature, pH, oxygen, NaCl concentration), the inoculum history (temperature, sporulation), the food composition (proteins versus carbohydrates) and strain, strongly influence cereulide production by mesophilic *B. cereus* or psychrotolerant emetic *B. weihenstephanensis* (Dommel *et al.*, 2010; Dommel *et al.*, 2011; Ehling-Schulz *et al.*,

2015; Rossvoll *et al.*, 2014; Thorsen *et al.*, 2009a; Thorsen *et al.*, 2009b). Therefore, it is important to check cereulide production in food products, considering all these informations to define appropriate conditions for the tests and to develop preventative strategies.

Acknowledgments

This study is part of the OPTIFEL project that received funding from the European Union's Seventh Framework Program for research, technological development and demonstration under grant agreement n° 311754. AG PhD grant is also from the EU Optifel project.

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 - 19.
- Agata, N., Ohta, M., Yokoyama, K., 2002. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. Int J Food Microbiol 73, 23-27.
- Biesta-Peters, E.G., Reij, M.W., Blaauw, R.H., in't Veld, P.H., Rajkovic, A., Ehling-Schulz, M., Abee, T., 2010. Quantification of the Emetic Toxin Cereulide in Food Products by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Using Synthetic Cereulide as a Standard. Appl. Environ. Microb. 76, 7466-7472.
- Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., Salkinoja Salonen, M., Svensson, B., Nguyen-the, C., Ehling-Schulz, M., 2006. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. International Journal of Food Microbiology 109, 132-138.
- Dierick, K., Van Coillie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., Hoedemaekers, G., Fourie, L., Heyndrickx, M., Mahillon, J., 2005. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. J Clin Microbiol 43, 4277 - 4279.
- Dommel, M.K., Frenzel, E., Strasser, B., Blochinger, C., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., 2010. Identification of the Main Promoter Directing Cereulide Biosynthesis in Emetic *Bacillus cereus* and Its Application for Real-Time Monitoring of *ces* Gene Expression in Foods. Appl. Environ. Microb. 76, 1232-1240.
- Dommel, M.K., Lucking, G., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., 2011. Transcriptional kinetic analyses of cereulide synthetase genes with respect to growth, sporulation and emetic toxin production in *Bacillus cereus*. Food Microbiol 28, 284-290.
- Durack, J., Ross, T., Bowman, J.P., 2013. Characterisation of the Transcriptomes of Genetically Diverse *Listeria monocytogenes* Exposed to Hyperosmotic and Low

Temperature Conditions Reveal Global Stress-Adaptation Mechanisms. PLoS One 8.

Ehling-Schulz, M., Frenzel, E., Gohar, M., 2015. Food-bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. Front. Microbiol. 6:704.

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

Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Scherer, S., 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. Molecular Nutrition & Food Research 48, 479-487.

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

Guinebretière, M.-H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., De Vos, P., 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. Env. Microbiol. 10, 851-865.

Guinebretiere, M.H., Velge, P., Couvert, O., Carlin, F., Debuyser, M.L., Nguyen-The, C., 2010. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. J Clin Microbiol 48, 3388-3391.

Hoton, F., Andrup, L., Swiecicka, I., Mahillon, J., 2005. The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. Microbiology 151, 2121 - 2124.

Hoton, F., Fornelos, N., N'Guessan, E., Hu, X., Swiecicka, I., Dierick, K., Jaaskelainen, E., Salkinoja-Salonen, M., Mahillon, J., 2009. Family portrait of *Bacillus cereus* and

- Bacillus weihenstephanensis* cereulide-producing strains. Environ Microbiol Rep 1, 177 - 183.
- Mahler, H., Pasi, A., Kramer, J., Schulte, P., Scoging, A., Bar, W., Krahenbuhl, S., 1997. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. N Engl J Med 336, 1142 - 1148.
- Mei, X., Xu, K., Yang, L., Yuan, Z., Mahillon, J., Hu, X., 2014. The genetic diversity of cereulide biosynthesis gene cluster indicates a composite transposon Tnces in emetic *Bacillus weihenstephanensis*. BMC Microbiology 14, 149.
- Mikkola, R., Saris, N., Grigoriev, P., Andersson, M., Salkinoja-Salonen, M., 1999. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide - the emetic toxin of *B. cereus*. Eur J Biochem 263, 112 - 117.
- Naranjo, M., Denayer, S., Botteldoorn, N., Delbrassinne, L., Veys, J., Waegenaere, J., Sirtaine, N., Driesen, R., Sipido, K., Mahillon, J., Dierick, K., 2011. Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning. J Clin Microbiol 49, 4379 - 4381.
- Paananen, A., Mikkola, R., Sareneva, T., Matikainen, S., Hess, M., Andersson, M., Julkunen, I., Salkinoja-Salonen, M., Timonen, T., 2002. Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. Clin Exp Immunol 129, 420 - 428.
- Ronning, H.T., Asp, T.N., Granum, P.E., 2015. Determination and quantification of the emetic toxin cereulide from *Bacillus cereus* in pasta, rice and cream with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Additives & Contaminants: Part A 32, 911-921.
- Rossvoll, E., Ronning, H.T., Granum, P.E., Moretro, T., Hjerpekkjon, M.R., Langsrud, S., 2014. Toxin production and growth of pathogens subjected to temperature fluctuations simulating consumer handling of cold cuts. Int. J. Food Microbiol. 185, 82-92.

- 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. Env. Microbiol.* 72, 1569-1578.
- Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E., 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *Fems Microbiol. Rev.* 32, 579-606.
- Teplova, V.V., Mikkola, R., Tonshin, A.A., Saris, N.E.L., Salkinoja-Salonen, M.S., 2006. The higher toxicity of cereulide relative to valinomycin is due to its higher affinity for potassium at physiological plasma concentration. *Toxicol Appl Pharm* 210, 39-46.
- Thorsen, L., Budde, B.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, B.B., Koch, A.G., Klingberg, T.D., 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, 172-178.
- 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.
- Vilas-Boas, G., Sanchis, V., Lereclus, D., Lemos, M.V.F., Bourguet, D., 2002. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Env. Microbiol.* 68, 1414-1424.

6.4. Conclusion

Dans des études précédentes, il a été retrouvé entre 10 et 1280 ng/g de céréulide dans des échantillons de produits alimentaires identifiés comme étant des source d'intoxication alimentaire de type émétiques, typiquement causées par l'ingestion du céréulide produit par *B. cereus* (Agata *et al.*, 2002). En tenant compte de ces valeurs et de nos résultats, le risque d'intoxication via le céréulide dans des aliments stockés et maintenus à des températures de réfrigération (n'excédant pas 8 °C) semblait très faible. Cependant, la production de céréulide par *B. weihenstephanensis* se situe dès 10 °C à des concentrations similaires aux valeurs inférieures retrouvées dans les aliments ayant causé des symptômes émétiques, et pourrait représenter un risque pour le consommateur si les mêmes concentrations étaient retrouvées dans un produit alimentaire. Selon le même raisonnement, pour des produits non réfrigérés et acidifiés, notre étude montre que même à pH 5,4, la production de céréulide serait suffisante pour causer des symptômes émétiques.

**Chapitre 7 :
Thermo-résistance des cellules végétatives de *Bacillus cereus*
psychrotolerant**

7. Chapitre 7 : Thermo-résistance des cellules végétatives de *Bacillus cereus* psychrotolerant

7.1. Introduction

Les spores de souches psychrotolérantes de *B. cereus* peuvent résister à différents traitements thermiques qui peuvent s'appliquer à de multiples produits alimentaires pendant leur processus de conception (Luu-Thi *et al.*, 2014). Ces spores vont pouvoir germer et se développer pendant les étapes de transports et de stockage de ces produits à basses températures (Carlin *et al.*, 2013; Luu-Thi *et al.*, 2014). Des études ont démontré les capacités de plusieurs souches psychrotolérantes de *B. cereus* à se développer dans de multiples conditions environnementales comme des pH bas, la présence ou l'absence d'oxygène, dans des milieux de laboratoire ainsi que dans des produits alimentaires (Chapitre 4 et 5) (De Sarrau *et al.*, 2012; Guérin *et al.*, 2016; Samapundo *et al.*, 2011; Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2000).

Suite à cette étape de stockage au froid, il peut y avoir un nombre important de cellules végétatives de souches psychrotolérantes de *B. cereus*. Dans le Chapitre 3 nous avons pu voir que la souche KBAB4 était capable de se développer à 8 °C avec un maximum de population à 8 log₁₀ UFC/ml après 7 jours en présence d'oxygène. Sans oxygène à 10 °C une population maximale d'environ 6 log₁₀ UFC/ml est atteinte en 5 jours en milieu de laboratoire (BHI) (Guérin *et al.*, 2016). La souche INRA TZ415 fut aussi capable de croître à 8 °C dans de la purée de carotte à pH 5,4 ou encore dans un bouillon de courgettes à pH 6,5 (Choma *et al.*, 2000; Valero *et al.*, 2003). Dans des aliments préparés réfrigérés avec une durée de vie prolongée, emballés sous vide, la concentration de *B. cereus* peut atteindre 4 à 6 log₁₀ UFC/g avant que l'on puisse voir apparaître une détérioration du produit (Choma *et al.*, 2000). La capacité des souches psychrotolérantes de *B. cereus* à se développer dans des produits alimentaires variés pendant leur stockage à basses températures représente un risque pour le consommateur. Cependant, les plats réfrigérés sont souvent réchauffés avant leur consommation. Ce type de réchauffage n'endommagera pas des spores si elles sont présentes mais cela pourrait détruire les cellules végétatives. Par contre, il y a très peu d'informations concernant la thermo-résistance des cellules végétatives de *B. cereus*, alors qu'il y a plus

d'études sur la thermo-résistance des spores de *B. cereus* (Afchain *et al.*, 2008; Carlin *et al.*, 2010; Luu-Thi *et al.*, 2014). Seule une étude a décrit le temps pour trois réductions décimales (environ 9 min) à 44,5 °C de la population initiale de cellules végétative de *B. cereus* KBAB4 cultivées à 30 °C (den Besten *et al.*, 2010).

Dans le cadre de nos travaux et par rapport au projet OPTIFEL, il était important de vérifier la thermo-résistance de souches psychrotolérantes de *B. cereus* afin de savoir si elles pourraient être éliminées par l'étape de réchauffage du plat avant sa consommation. Le but de cette étude a donc été de documenter la thermo-résistance de ces cellules végétatives en déterminant le temps de la première réduction décimale à différentes températures de chauffage (δ), ainsi que leur valeur de z (augmentation de température de chauffage pour diviser δ par 10), pour les trois groupes phylogénétiques correspondant à des souches psychrotolérantes de *B. cereus*, groupe II, V et VI (Guinebretière *et al.*, 2008). Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus pour deux souches de *B. cereus* thermotolérantes appartenant au groupe phylogénétique VII (Guinebretière *et al.*, 2008).

7.2. Résultats et discussion

Thermo-résistance des cellules végétatives de *B. cereus* psychrotolérant appartenant à différents groupes phylogénétiques

Six souches psychrotolérantes appartenant à trois groupes phylogénétiques (Guinebretière *et al.*, 2008) ont été choisies pour cette étude :

- Groupe phylogénétique II : RIVM BC 938 et RIVM BC 485
- Groupe phylogénétique V : PHLS F2769/77 et INRA SB'
- Groupe phylogénétique VI : KBAB4 et ADRIA I21

Ces souches ont été cultivées en milieu riche de laboratoire (BHI) à une température de 30 °C, proche de leur température optimale de croissance. Suite à cela, elles ont été chauffées à des température allant de 40 °C, ce qui correspond environ à leur température limite de croissance (Carlin *et al.*, 2013), jusqu'à 60 °C afin d'atteindre une inactivation des cellules végétatives permettant d'obtenir une concentration bactérienne inférieure à la limite de détection (Fig 1). Pour toutes les souches testées les courbes de survie obtenues n'étaient

pas linéaires et toutes les valeurs du paramètre de courbure p^* étaient inférieures à 1, indiquant des courbes concaves (Tableau 1). Les p^* des souches psychrotolérantes appartenant aux trois groupes phylogénétiques n'étaient pas différents ($p > 0,05$). Les valeurs de δ étaient comprises entre 0,12 et 0,76 min pour les cellules des souches psychrotolérantes. Concernant les valeurs de z , elles n'étaient pas différentes ($p > 0,05$) entre les différents groupes phylogénétiques psychrotolérants et comprises entre 3,6 et 5,5 °C (Tableau 2). Les températures aux quelles $\delta=1$ ($T_{\delta=1}$) étaient comprises entre 45,6 °C et 50,0 °C pour ces souches psychrotolérantes (Tableau 2) et n'étaient pas significativement différentes ($p > 0,05$). Ainsi, bien que ces groupes phylogénétiques correspondent à des évolutions différentes de *B. cereus* vers ce caractère de psychrotolérance (Guinebretière *et al.*, 2008), nous pouvons considérer que leurs cellules végétatives ont des thermo-résistances identiques.

Thermo-résistance des cellules végétatives de *B. cereus* KBAB4 cultivées à basse température

Les cellules végétatives de *B. cereus* KBAB4 furent cultivées à 8 °C en milieux BHI. Les valeurs de δ qui ont été obtenues pour des cellules végétatives de KBAB4 cultivées à 8 °C étaient supérieures ($p > 0.05$) à celles obtenues pour des cellules cultivées à 30 °C (Fig 1 et 2). Cependant, la valeur de z était de 5,5 °C et était similaire à celles déterminées pour les souches psychrotolérantes de *B. cereus* cultivées à 30 °C (Tableau 2). Les conditions de croissances semblent donc influencer certains paramètres de la thermo-résistance des cellules végétatives. Une étude a montré que la thermo-résistance des cellules végétatives de KBAB4 cultivées à 12 °C était plus faible que celles des cellules cultivées à 30 °C (den Besten *et al.*, 2010). Ces résultats sont contraires à ceux que nous avons observés dans notre étude. Cette différence peut être due au fait que les cellules ayant subi ce traitement thermique étaient en phase stationnaire dans notre étude et en phase exponentielle de croissance dans l'étude de den Besten *et al.*, (2010). Plusieurs autres facteurs peuvent influencer la thermo-résistance des cellules végétatives, par exemple, la présence de 2,5 % de NaCl augmente la thermo-résistance de cellules végétatives de souches mésophiles de *B. cereus* cultivées à 30 °C mais cet effet n'a pas été significatif pour la souche psychrotolérante KBAB4 (den Besten *et al.*, 2010). Cependant à 12 °C quand cette souche était cultivée en présence de NaCl, sa thermo-résistance augmentait (den Besten *et al.*, 2010). Tous ces résultats tendent à montrer que

l'influence des conditions de croissances, comme la température, sur la thermo-résistance des cellules végétatives de *B. cereus* dépendent vraisemblablement des souches, de leur stade de croissance et du type de milieu.

Thermo-résistance des cellules végétatives de souches thermotolérantes de *B. cereus*

Les deux souches thermotolérantes de *B. cereus* choisies appartiennent au groupe phylogénétique VII, correspondant aux souches de *B. cereus* ayant le domaine de températures de croissance le plus élevé (Guinebretière *et al.*, 2008) : AFFSA 08 CEB 44 BAC et NVH 391-98. Ces souches ont aussi été cultivées à leur température optimale de croissance, 37 °C. Leur thermo-résistance a été déterminée et comparée à celles des souches psychrotolérantes de *B. cereus* appartenant aux groupes phylogénétiques II, V et VI (Fig 1). Les deux souches thermotolérantes présentaient des courbes de survie plus concaves ($p^* < 0.37$) que celles observées pour les souches psychrotolérantes mais il n'y avait pas pour autant une différence significative avec les souches du groupe phylogénétique II et V ($p > 0.05$). Ceci a été particulièrement visible pour les températures testées comprises entre 56 °C et 59 °C, avec la présence d'un nombre de cellules résistantes, qui ne pouvaient pas correspondre à des spores, car elles étaient détruites suite à 2 min à 60-68 °C (« HD » Tableau 1). Les valeurs de $T_{\delta=1}$ pour ces deux souches ont été significativement supérieures à celles des souches psychrotolérantes ($p < 0.05$). Par contre, ce n'a pas été le cas pour les valeurs de z qui étaient similaires à celles des souches psychrotolérantes ($p > 0.05$) (Tableau 2).

Les valeurs de z déterminées pour les cellules végétatives de *B. cereus* étaient faibles comparées à celles d'autres bactéries formant des spores ou non. Par exemple, les valeurs de z de souches de *Staphylococcus aureus* cultivées en TSB à 37 °C variaient entre 7,46 °C et 13,98 °C (Amado *et al.*, 2014). Les valeurs de z de *Listeria monocytogenes* (7 °C), des cellules végétatives de *Clostridium perfringens* (7,7 °C) et de *Campylobacter* thermophiles (environ 6,4 °C) étaient aussi supérieures aux valeurs de z des cellules végétatives de *B. cereus* de notre étude (Byrne *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2006; van Asselt and Zwietering, 2006).

Les valeurs de z des spores de *B. cereus* des différents groupes phylogénétiques ont été rapportées dans l'étude de Luu-Thi *et al.*, (2014) : 10,2 °C pour le groupe II ; 11,0 °C pour

le groupe V et 12 °C pour le groupe VI. Les valeurs de z des spores de *B. cereus* ne sont pas significativement différentes, comme pour les valeurs de z des cellules végétatives déterminées dans notre étude (Luu-Thi *et al.*, 2014).

Cette étude nous a permis de conclure qu'il ne semble pas avoir de différence entre la thermo-résistance des cellules végétatives de *B. cereus* appartenant à différents groupes phylogénétiques. Par contre les valeurs de z déterminées sont faibles comparées à celles d'autres bactéries.

7.3. Heat-resistance of psychrotolerant *Bacillus cereus* vegetative cells

Article accepté sous réserve de révision “Food Microbiology” (2016)

Heat-resistance of psychrotolerant *Bacillus cereus* vegetative cells

Alizée Guérin, Claire Dargaignaratz, Thierry Clavel,

Véronique Broussolle, Christophe Nguyen-the *

UMR408 SQPOV « Sécurité et Qualité des Produits d’Origine Végétale », INRA, University of Avignon, 84000 Avignon, France

*Corresponding author. Mailing address: INRA, UMR408, site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9, France. Phone: +33 (0)4 32 72 25 21, Fax: +33 (0)4 32 72 24 92, Email: Christophe.nguyen-the@avignon.inra.fr

Abstract

Psychrotolerant strains of the foodborne pathogen *Bacillus cereus* can multiply during the refrigerated storage of food products and can represent a risk if these cells are not eliminated during reheating of food product before consumption. We determined the heat-resistance of psychrotolerant *B. cereus* vegetative cells at different heating temperatures in laboratory medium and compared it with that of thermotolerant *B. cereus* vegetative cells. The z values of the vegetative cells of the three psychrotolerant phylogenetic groups of *B. cereus* varied between 3.47 °C and 5.45 °C and were not significantly different from those of thermotolerant *B. cereus* vegetative cells. The temperature at which δ value (time for the first decimal reduction) equal 1 min varied between 46 °C and 50 °C for psychrotolerant vegetative cells and it was around 54 °C for thermotolerant vegetative cells. Moreover, few seconds at 60 °C would be sufficient for a 6 log₁₀ CFU/ml reduction of psychrotolerant *B. cereus* vegetative cells. These data clearly showed that psychrotolerant *B. cereus* vegetative cells can be rapidly eliminated by a mild heat treatment such as food reheating.

Keywords

Heat-inactivation, Weibull distribution, decimal reduction, z value, phylogenetic groups

Introduction

Bacillus cereus is an endospore-forming and foodborne pathogen causing diarrheal or emetic food poisoning (Ehling-Schulz *et al.*, 2006b; Forghani *et al.*, 2014; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). This bacteria has been the second leading cause of foodborne outbreaks since 2012 in France (InVS, 2012, 2013, 2014) and is also an increasing cause of food outbreaks in the EU (EFSA, 2012, 2013, 2014, 2015). Furthermore, spores of *B. cereus* can contaminate various foodstuffs and food ingredients, such as food products containing vegetables or pulses (zucchini, carrots, split peas...), rice dishes, prepared meat dishes, Refrigerated Processed Food of Extended Durability (REFEDs) (Bennett *et al.*, 2013; Choma *et al.*, 2000; Daelman *et al.*, 2013; Del Torre *et al.*, 2001).

Spores of psychrotolerant *B. cereus* are able to resist heat-treatments applied during preparation of many food products, such as Refrigerated Processed Food of Extended Durability (REFEDs) (Luu-Thi *et al.*, 2014) and can grow during food transport and storage at cold temperatures (Carlin *et al.*, 2013; Luu-Thi *et al.*, 2014). The capacity of several psychrotolerant *B. cereus* strains to grow at cold temperatures in various conditions, such as low pH values, presence or absence of oxygen, in laboratory medium or in food products, was previously shown (Guérin *et al.*, 2016; Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2000).

Therefore, after refrigerated storage, foods may contain high numbers of vegetative cells of psychrotolerant *B. cereus* : for example at 8 °C, *B. cereus* KBAB4 was able to grow to around 8 log₁₀ CFU/ml after 7 days with oxygen and at 10 °C around 6 log₁₀ CFU/ml without oxygen after 5 days in BHI (Guérin *et al.*, 2016). Another psychrotolerant *B. cereus* strain INRA TZ415 was able to grow at 8 °C in zucchini broth at pH 6.5 and in carrot purée at pH 5.4 (Choma *et al.*, 2000; Valero *et al.*, 2003). In vacuum-packaged REFEDs stored at 10 °C, *B. cereus* reached 4 to 6 log₁₀ CFU/g before the appearance of spoilage (Choma *et al.*, 2000). The capacity of the psychrotolerant *B. cereus* to grow in various food products can represent a risk for consumers. However, refrigerated foods are often reheated just before consumption. Re-heating usually represents a mild heat-treatment, which does not damage spores, but may kill part of the vegetative cells. However, there is little information concerning the heat-resistance of *B. cereus* vegetative cells to assess if reheating treatments are sufficient to eliminate these bacterial cells. Most studies concern heat-resistance of *B. cereus* spores (Afchain *et al.*, 2008; Carlin *et al.*, 2010; Luu-Thi *et al.*, 2014). Only one

study gave the third decimal reduction time (around 9 min) at one temperature (44.5 °C) of vegetative cells from one psychrotolerant *B. cereus* strain (KBAB4) for cells cultivated at 30 °C (den Besten *et al.*, 2010).

Therefore, the goal of the present study was to document heat-resistance of psychrotolerant *B. cereus* vegetative cells, by determining the time for decimal reduction at different temperatures, as well as the *z* value, for the three psychrotolerant phylogenetic groups II, V and VI, of *B. cereus sensu lato* Group (Guinebretière *et al.* 2008). Results were then compared to those of two strains among the most thermotolerant phylogenetic group VII (Guinebretière *et al.*, 2008).

Materials and methods

Strains

Six psychrotolerant *Bacillus cereus* strains belonging to three different phylogenetic groups (II, V and VI) and two thermotolerant *B. cereus* strains belonging to the phylogenetic group VII were used in this work (Guinebretière *et al.*, 2008). Two strains in each group were chosen in order to have a representation of the intra-group genetic and phenotypic diversity. The strains RIVM BC 938 and RIVM BC 485 (group II), INRA SB' and PHLS F2769/77 (group V), ADRIA I21 (group VI) and NVH 391-98 (group VII) as described by (Guinebretière *et al.*, 2008) were used. The strain KBAB4 (group VI) isolated from forest soil (Lapidus *et al.*, 2008) and the strain AFFSA 08 CEB 44 BAC (group VII) isolated from cooked semolina during a food poisoning outbreak in France in 2008 (Guinebretiere *et al.*, 2013) were also used.

Growth conditions

The stock of cultures used during this study consisted in suspensions of exponential phase cells (OD_{600nm} of 0.5) in glycerol (30 % final concentration), stored at -80 °C. For all strains, 10 ml of Brain Heart Infusion (BHI; Biokar) at pH 7.4 ±0.2, were inoculated in KIMAX tubes with 100 µl of the frozen cultures and incubated at 30 °C for psychrotolerant

B. cereus strains and 37 °C for the two thermotolerant *B. cereus* strains, under shaking at 200 rpm. The growth varied from 15 h to 17 h, until vegetative cells reached a population of $10^7 - 10^8$ CFU/ml, corresponding to the stationary phase, at which vegetative cells are the most heat-resistant (den Besten *et al.*, 2006). In addition, *B. cereus* KBAB4 was cultivated in the same way but at 8 °C during 111 h to 113 h to reach the population of $10^7 - 10^8$ CFU/ml, as done for the cultures grown at 30 °C. Cultures were centrifuged at 5000 x g (Heraeus Multifuge X1R centrifuge, Thermo scientific) for 5 min at room temperature, and were suspended in 10 ml of sterile BHI.

Vegetative cell heat-treatment

Inactivation tests were carried out in duplicate using glass capillaries (ringcaps, Hirschmann 100-200 µl) (Luu-Thi *et al.*, 2014). For each time and temperature of heat-treatment, 100 µl of *B. cereus* vegetative cells suspensions were injected in capillaries which were sealed and maintained on ice until use. Capillaries were then incubated in a thermostatically controlled water bath (Polystat SS, Bioblock scientific) at different temperatures, from 40 °C to 68 °C, during different times between 0 and 15 min. At each sampling time, capillaries were removed and quickly cooled on ice to stop the effect of heat on *B. cereus* vegetative cells. Capillaries were sanitized with ethanol at 70 %, broken, and their contents diluted in sterile water to perform serial dilutions. Viable counts of vegetative cells were determined by plating 100 µl of three appropriate dilutions on Luria-Bertani agar (LB; Biokar), and incubating overnight at 30 °C. All conditions were performed in triplicate with three independent inocula.

Modelling of survival curves

For each heating temperature, survival curves were fitted with the model proposed by Mafart *et al.* (2002) (Mafart *et al.*, 2002) based on the Weibull distribution:

$$\log N = \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right)^{p^*}$$

Where N is the population size at time t (CFU/mL); N_0 is the initial population size (CFU/mL), δ is the first 10-fold reduction and p^* is the shape parameter. p value (p^*) depends on the shape of the survival curve; $p^* > 1$ for convex survival curves, $p^* = 1$ for linear survival curves and $p^* < 1$ for concave survival curves. A single p^* value was estimated for each strain. p^* and δ values were determined using the Microsoft® Excel 2010 solver function. z values, the increase in temperature needed for a 10-fold reduction of δ , were determined for each strain as the negative reciprocal of the regression line fitted to the curve $\log_{10} \delta$ versus temperature, using Microsoft® Excel.

To compare the heat-resistance of the different strains, the temperature at which $\delta = 1$ min, noted $T_{\delta=1}$ in °C (Luu-Thi *et al.*, 2014) was calculated. The impact of heating temperatures was assessed by the time for a 6 $\log_{10}$ reduction of viable cells, noted $t_{-6\log}(T)$ in min.

Statistical analysis

The results are expressed as the means of three independent biological replicates. A Student's T-test was used to compare mean values. The null hypothesis was rejected for $p < 0.05$.

Criteria to define population decline

δ values were not calculated for declines of less than 1 log CFU/ml within the 15 min of the experiment. They were noted as a low decline (LD in Table 1). Moreover, δ values were not determined when population was below the detection limit for the first sampling time. Such cases were noted high decline (HD in Table 1).

Results

Heat-resistance of psychrotolerant *B. cereus* vegetative cells from different genetic groups cultivated at their optimal temperature

Vegetative cells of the six psychrotolerant strains of *B. cereus* belonging to phylogenetic group II (RIVM BC 938, RIVM BC 485), group V (PHLS F2769/77, INRA SB') and group VI (KBAB4, ADRIA I21), cultivated at 30 °C, were heated at temperatures between 40 °C, corresponding approximately to the maximal growth temperature (Carlin *et al.*, 2013), and 60 °C, to inactivate vegetative cells until below the detection limit (Fig. 1). All tested strains showed non-linear survival curves with the shape parameter $p^* < 1$ (Table 1), δ values between 0.59 min and 4.59 min at 48 °C, and between 0.12 min and 0.76 min at 50 °C (Table 1).

For all heat temperatures tested, δ values of RIVM BC 938 and RIVM BC 485 were similar ($p > 0.05$), except at 50 °C ($p < 0.05$) (Table 1 and Fig. 1). The two strains of group V had significantly different δ values for all heat temperatures tested ($p < 0.05$), except at 53 °C ($p > 0.05$) (Fig.1 and Table 1). Vegetative cells of the two group VI strains had δ values significantly different at 48 °C and 50 °C ($p < 0.05$). Between strains of groups V and VI, the δ values at 48 °C and 50 °C of KBAB4 were not significantly different from those of INRA SB' ($p > 0.05$). Similarly, the δ values of ADRIA I21 and PHLS F2769/77 at the same temperatures were not significantly different ($p > 0.05$).

p^* values of the psychrotolerant phylogenetic groups were not significantly different ($p > 0.05$). The z values of all the psychrotolerant strains tested were between 3.5 °C and 5.5 °C and were not significantly different among phylogenetic groups ($p > 0.05$) (Table 2). Similarly, $T_{\delta=1}$, the temperature at which $\delta = 1$ min, of all the psychrotrophic strains was between 45.6 °C and 50.0 °C and there was no significant difference among groups ($p > 0.05$) (Table 2).

Chapitre 7 : Thermo-résistance des cellules végétatives de *Bacillus cereus* psychrotolerant

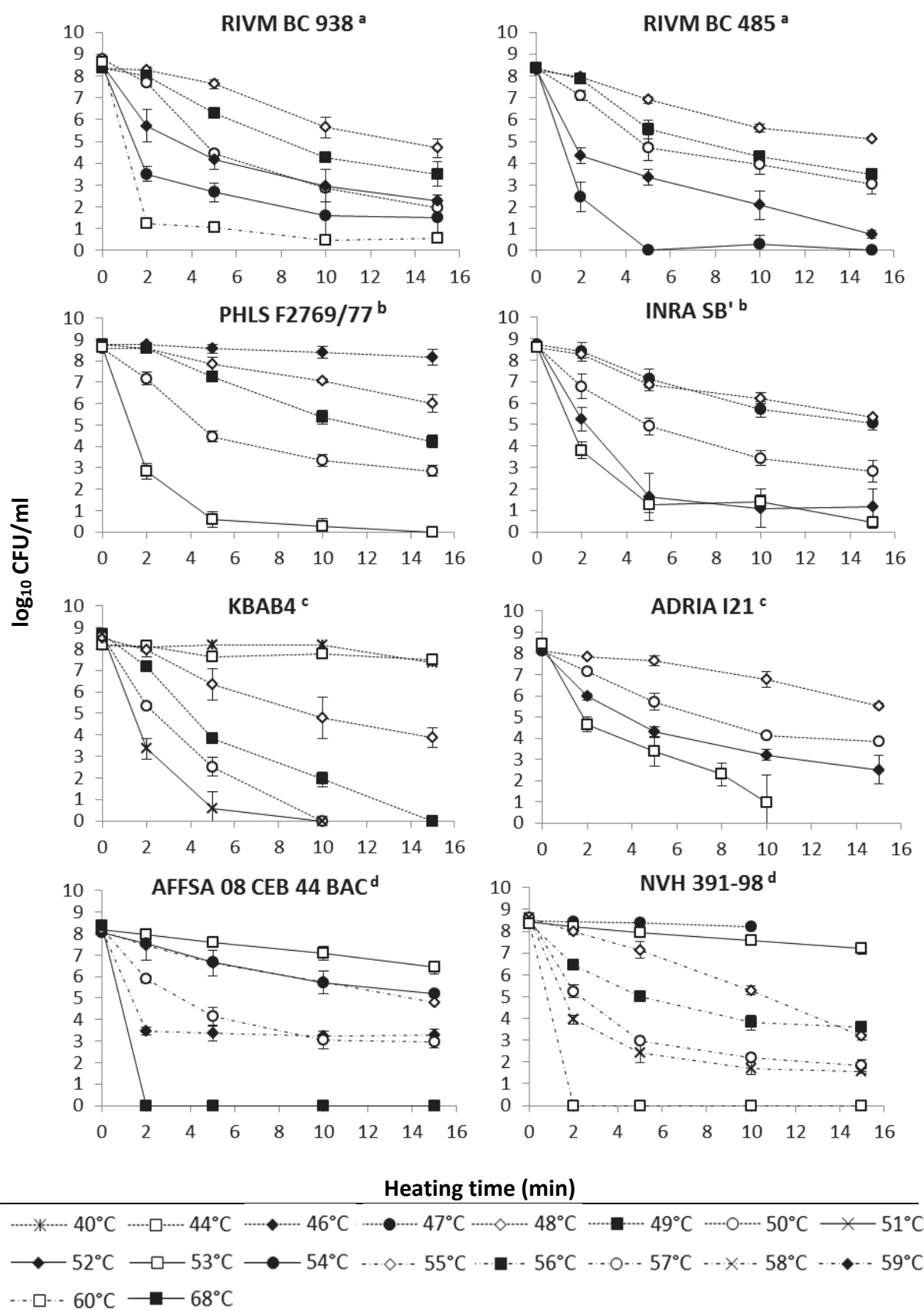


Figure 1. Heat inactivation kinetics of vegetative cells of six psychrotolerant (a: genetic group II; b: group V; c: group VI) cultivated at 30 °C and two thermotolerant *B. cereus* strains (d: group VII) cultivated at 37 °C, until the stationary growth phase for all strains. Error bars represent standard deviations between biological triplicates and can be smaller than symbols. Limit of detection of bacterial concentration was 1 log₁₀ CFU/ml.

Heat-resistance of psychrotolerant *B. cereus* KBAB4 vegetative cells cultivated at 8 °C

The δ values of KBAB4 were higher for vegetative cells cultivated at 8 °C compared to those cultivated at 30 °C (Fig 1 and Fig 2). For example, the δ values at 48 °C was 2.6 min for vegetative cells cultivated at 8 °C and 1.18 min for these cultivated at 30 °C ($p < 0.05$) and the δ value at 50 °C was 0.96 min for cells cultivated at 8 °C and 0.27 min for cells cultivated at 30 °C ($p < 0.05$) (Table 1). The z value of vegetative cells cultivated at 8 °C was 5.5 °C, within the range of z values for vegetative cells of psychrotolerant strains grown at 30 °C (Table 2). Moreover the time at which $\delta = 1$ min ($T_{\delta=1}$) was 50.1 °C.

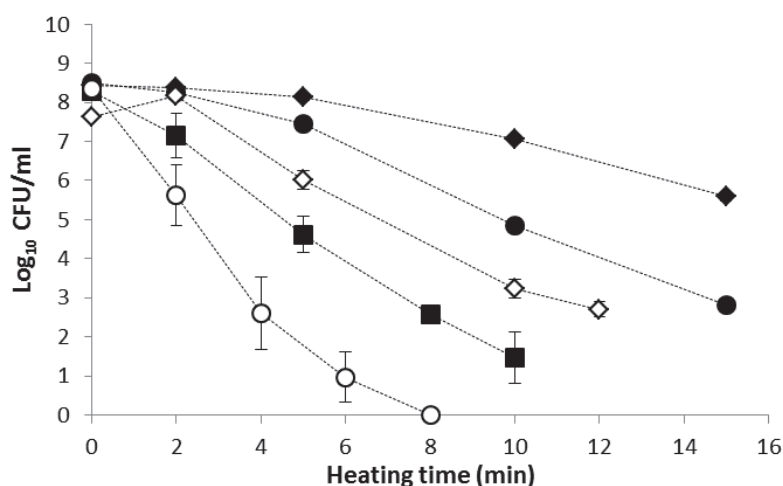


Figure 2. Heat inactivation kinetics of *B. cereus* KBAB4 vegetative cells cultivated at 8 °C until stationary growth phase. Symbols are similar to those of the Figure 1. Error bars represent standard deviations and can be smaller than symbols. Limit of detection of bacterial concentration was 1 log₁₀ CFU/ml.

Chapitre 7 : Thermo-résistance des cellules végétatives de *Bacillus cereus* psychrotolerant

Table 1. First decimal reduction time δ (min) of vegetative cells of *B. cereus* strains at different heating temperatures (Heat T) and values of the shape parameter (p^*) of the survival curve $\log_{10}N=f(t)$ determined for each strain. nt: Not Tested; LD: Low Decline; HD: High Decline

Groups and strains of <i>B. cereus</i>								
	II		V		VI		VII	
Heat T (°C)	RIVM BC 938	RIVM BC 485	PHLS F2769/77	INRA SB'	KBAB4	ADRIA I21	AFFSA 08 CEB 44 BAC	NVH 391- 98
40	nt	nt	nt	nt	LD	nt	nt	nt
44	nt	nt	nt	nt	LD	nt	nt	nt
46	nt	nt	15.76 $\pm$ 1.06	nt	nt	nt	nt	nt
47	nt	nt	nt	0.41 $\pm$ 0.07	nt	nt	nt	LD
48	1.15 $\pm$ 1.15	1.29 $\pm$ 0.06	4.59 $\pm$ 0.90	0.59 $\pm$ 0.08	1.18 $\pm$ 0.44	2.49 $\pm$ 0.29	nt	nt
49	0.39 $\pm$ 0.10	0.54 $\pm$ 0.06	1.09 $\pm$ 0.09	NT	0.42 $\pm$ 0.06	NT	nt	nt
50	0.19 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.11	0.76 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.03	0.27 $\pm$ 0.05	0.75 $\pm$ 0.04	nt	nt
51	nt	nt	nt	nt	0.15 $\pm$ 0.04	nt	nt	nt
52	0.12 $\pm$ 0.12	0.29 $\pm$ 0.04	nt	0.06 $\pm$ 0.02	nt	0.45 $\pm$ 0.10	nt	nt
53	nt	nt	0.23 $\pm$ 0.16	0.05 $\pm$ 0.01	nt	0.28 $\pm$ 0.09	5.20 $\pm$ 3.81	13.07 $\pm$ 1.52
54	0.08 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.02	nt	nt	nt	nt	0.62 $\pm$ 0.48	nt
55	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.32 $\pm$ 0.06	0.16 $\pm$ 0.03
56	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.15 $\pm$ 0.04
57	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.04 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01
58	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.05 $\pm$ 0.00
59	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.06 $\pm$ 0.02	nt
60	HD	nt	nt	nt	nt	nt	nt	HD
63	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
68	nt	nt	nt	nt	nt	nt	HD	nt
p^*	0.42	0.50	0.61	0.37	0.62	0.52	0.29	0.35

Heat-resistance of thermotolerant *B. cereus* vegetative cells cultivated at their optimal temperature

Two strains belonging to the most thermotolerant phylogenetic group (group VII) among *B. cereus sensus lato* group were tested for comparison with strains belonging to psychrotolerant groups II, V and VI. Vegetative cells cultivated at 37 °C were heat-treated at temperatures ranging from 47 °C to 68 °C (Fig 1). δ values of these two strains were respectively 5.2 and 13.07 min at 53 °C ($p < 0.05$) (Table 1). These two thermotolerant strains had more concave survival curves (p^* values < 0.37) than the psychrotolerant strains but p^* was not significantly different from phylogenetic group II and V strains ($p > 0.05$). This was particularly marked in the 56-59° C temperature range (Table 1) with the presence of a heat-resistant fraction of cells, which could not be spores, as they were killed in less than 2 min at 60-68 °C (“HD” in Table 1). $T_{\delta=1}$ of the group VII strains (53.8 °C and 54.5 °C respectively for AFFSA 08 CEB 44 BAC and NVH 391-98) were significantly higher than for the psychrotrophic groups ($p < 0.05$). z values of these two group VII strains (2.12 °C and 3.31 °C) were not significantly different from those of the psychrotolerant *B. cereus* groups ($p > 0.05$) (Table 2).

Table 2. z value (°C) and $T_{\delta=1}$ (°C) of *B. cereus* vegetative cells cultivated at optimal temperature (30 or 37 °C)

Type of <i>B. cereus</i>	Groups	Strains	Z (°C)	$T_{\delta=1}$ (°C)
Psychotrophic ^a	II	RIVM BC 938	5.0	46.9
		RIVM BC 485	5.0	48.3
	V	PHLS F2769/77	3.6	50.0
		INRA SB'	5.4	45.6
	VI	KBAB4	3.5	48.0
		ADRIA I21	5.5	49.9
Thermotolerant ^b	VII	AFFSA 08 CEB 44 BAC	3.3	53.8
		NVH 391-98	2.1	54.5

^a vegetative cells cultivated at 30 °C

^b vegetative cells cultivated at 37 °C

Discussion

In the present study, the heat-resistance of stationary phase vegetative cells was investigated because of higher resistance than exponential phase cells and would thus represent a higher microbial hazard in foods. In a previous study, exponential phase cells of KBAB4 strain grown at 30 °C, were heat-treated at 44.5 °C with three decimal reduction in approximately 9 min (den Besten *et al.*, 2010). In the present study, stationary phase cells of the same strain, grown at the same temperature, were indeed more heat-resistant, with no decline over 15 min at 44 °C (Table 1).

z values of psychrotolerant *B. cereus* vegetative cells, were not significantly different ($p > 0.05$) when considering the phylogenetic group. Although these groups correspond to independent evolutions of *B. cereus* towards psychrotolerance (Guinebretière *et al.*, 2008) they can be considered to have the same z values. z values of vegetative cells from the thermotolerant *B. cereus* group VII, the most genetically distant from all other *B. cereus* phylogenetic groups (Guinebretière *et al.*, 2008), were not significantly different from those of the psychrotolerant groups ($p > 0.05$), indicating that the same z value can presumably be applied to vegetative cells of all *B. cereus* groups.

$T_{\delta=1}$ values of vegetative cells from psychrotolerant *B. cereus* were lower than those from thermotolerant groups, in accordance with their maximal growth limits of respectively 40-41 °C (Carlin *et al.*, 2013; Guinebretière *et al.*, 2008), and 50 °C (Guinebretière *et al.*, 2008).

The z value of *B. cereus* vegetative cells (between 2.12 °C and 5.45 °C, Table 2) is low compared to those of other spore-forming bacteria and even to non-spore forming bacteria. For example, z values of *Salmonella enterica* cultivated in TSB and at 37 °C, varied from 7.71 °C to 11.19 °C and z values of *Staphylococcus aureus*, in TSB and at 37 °C, were between 7.46 °C and 13.98 °C (Amado *et al.*, 2014). The z values of *Listeria monocytogenes* (7.0 °C), *Clostridium perfringens* vegetative cells (7.7 °C), and thermophilic Campylobacters (around 6.4 °C) (Byrne *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2006; van Asselt and Zwietering, 2006) were also higher than z values of *B. cereus* vegetative cells.

The z values for spores of the different *B. cereus* phylogenetic groups have been reported by (Luu-Thi *et al.*, 2014): 10.2 °C for group II; 11.0 °C for group V and 12.0 °C for

group VI. Similarly to those of vegetative cells, z values of *B. cereus* spores were not significantly different among the phylogenetic groups of psychrotolerant strains (Luu-Thi *et al.*, 2014). These authors found that group VII spores had a lower z value than other groups (mean value of 5.7 °C compared to 8 °C to 12 °C for other groups), but our study showed that z values for group VII vegetative cells were not different from those of psychrotolerant groups.

Growth conditions influence the heat-resistance of vegetative cells: the heat-resistance of KBAB4 *B. cereus* vegetative cells grown 12 °C was lower than that of cells cultivated at 30 °C (den Besten *et al.*, 2010). This is in contrast with our results, since heat-resistance of KBAB4 vegetative cells cultivated at 8 °C was higher than that of cells grown at 30 °C. This difference may be due to the fact that we used stationary phase cells while (den Besten *et al.*, 2010) used exponential phase cells. The presence of 2.5 % NaCl increased heat-resistance of mesophilic *B. cereus* ATCC 14579 and ATCC 10987 vegetative cells cultivated at 30 °C, but this effect was not significant for the psychrotrophic KBAB4 strain (den Besten *et al.*, 2010). However, when vegetative cells of KBAB4 were cultivated with salt at 12 °C, their heat-resistance was increased (den Besten *et al.*, 2010). Considered all together, these results indicate that influence of growth conditions, such as temperature, on heat-resistance of *B. cereus* vegetative cells presumably depends on strains, on the physiological state of growth and on the growth medium.

We determined that, heating 36.55 min at 48 °C, 19 min at 50 °C, and a few seconds at 60 °C would be sufficient for a 6 log₁₀ CFU/ml reduction ($t_{-6\log}(T)$) of vegetative cells of the most heat-resistant among the six psychrotolerant strains tested. Reheating of food product before consumption could rapidly eliminate psychrotolerant *B. cereus* vegetative cells, if storage conditions had permitted their multiplication in the food products.

Acknowledgements

This study is part of the OPTIFEL project that received funding from the European Union's Seventh Framework Program for research, technological development and demonstration under grant agreement n° 311754. AG PhD grant is also from EU Optifel project.

References

- Afchain, A.L., Carlin, F., Nguyen-the, C., Albert, I., 2008. Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurised and chilled foods. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 165-173.
- Amado, I.R., Vázquez, J.A., Guerra, N.P., Pastrana, L., 2014. Thermal resistance of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from vegetable feed ingredients. *J. Sci. food Agr.* , n/a-n/a.
- Bennett, S.D., Walsh, K.A., Gould, L.H., 2013. Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*-United States, 1998-2008. *Clin. Infect. Dis.* 57, 425-433.
- Byrne, B., Dunne, G., Bolton, D.J., 2006. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. *Food Microbiol.* 23, 803-808.
- Carlin, F., Albagnac, C., Rida, A., Guinebretière, M.-H., Couvert, O., Nguyen-the, C., 2013. Variation of cardinal growth parameters and growth limits according to phylogenetic affiliation in the *Bacillus cereus* Group. Consequences for risk assessment. *Food Microbiol.* 33, 69-76.
- Carlin, F., Brillard, J., Broussolle, V., Clavel, T., Duport, C., Jobin, M., Guinebretiere, M.-H., Auger, S., Sorokine, A., Nguyen-The, C., 2010. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Res. Int.* 43, 1885-1894.
- Choma, C., Guinebretière, M.H., Carlin, F., Schmitt, P., Velge, P., Granum, P.E., Nguyen-The, C., 2000. Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *J. Appl. Microbiol.* 88, 617-625.
- Daelman, J., Membré, J.-M., Jacxsens, L., Vermeulen, A., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., 2013. A quantitative microbiological exposure assessment model for *Bacillus cereus* in REPFEDs. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 433-449.

- Del Torre, M., Della Corte, M., Stecchini, M.L., 2001. Prevalence and behaviour of *Bacillus cereus* in a REPFED of Italian origin. *Int. J. Food Microbiol.* 63, 199-207.
- den Besten, H.M.W., Mataragas, M., Moezelaar, R., Abee, T., Zwietering, M.H., 2006. Quantification of the effects of salt stress and physiological state on thermotolerance of *Bacillus cereus* ATCC 10987 and ATCC 14579. *Appl. Environ. Microb.* 72, 5884-5894.
- den Besten, H.M.W., van der Mark, E.-J., Hensen, L., Abee, T., Zwietering, M.H., 2010. Quantification of the Effect of Culturing Temperature on Salt-Induced Heat Resistance of *Bacillus* Species. *Appl. Environ. Microb.* 76, 4286-4292.
- EFSA, 2012. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA J.* 10, 2597.
- EFSA, 2013. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA J.* 11, 3129.
- EFSA, 2014. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA J.* 12, 3547.
- EFSA, 2015. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.* 13, 3991.
- Ehling-Schulz, M., Guinebretiere, M.H., Monthan, A., Berge, O., Fricker, M., Svensson, B., 2006. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 260, 232-240.
- Forghani, F., Kim, J.-B., Oh, D.-H., 2014. Enterotoxigenic Profiling of Emetic Toxin- and Enterotoxin-Producing *Bacillus cereus*, Isolated from Food, Environmental, and Clinical Samples by Multiplex PCR. *J. Food Sci.*, 2288-2293.

- Guérin, A., Dargaignaratz, C., Broussolle, V., Clavel, T., Nguyen-the, C., 2016. Combined effect of anaerobiosis, low pH and cold temperatures on the growth capacities of psychrotrophic *Bacillus cereus*. Food Microbiol. 59, 119-123.
- Guinebretiere, M.-H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M.-L., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P., Lereclus, D., 2013. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63, 31 - 40.
- Guinebretière, M.-H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., De Vos, P., 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. Env. Microbiol. 10, 851-865.
- INVS, 2012. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire 2012. Available at <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-declaration-obligatoire/Toxi-infections-alimentaires-collectives/Donnees-epidemiologiques> INVS.
- INVS, 2013. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire 2013. Available at <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-declaration-obligatoire/Toxi-infections-alimentaires-collectives/Donnees-epidemiologiques> INVS.
- INVS, 2014. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire 2014. Available at <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-declaration-obligatoire/Toxi-infections-alimentaires-collectives/Donnees-epidemiologiques> INVS.
- Lapidus, A., Goltsman, E., Auger, S., Galleron, N., Ségurens, B., Dossat, C., Land, M.L., Broussolle, V., Brillard, J., Guinebretiere, M.-H., Sanchis, V., Nguen-the, C., Lereclus, D., Richardson, P., Wincker, P., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Sorokin, A., 2008. Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. Chem-Biol. Interact. 171, 236-249.

- Luu-Thi, H., Khadka, D.B., Michiels, C.W., 2014. Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 189, 183-188.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I., 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int. J. Food Microbiol.* 72, 107-113.
- Nguyen, H.T.T., Corry, J.E.L., Miles, C.A., 2006. Heat Resistance and Mechanism of Heat Inactivation in Thermophilic Campylobacters. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 908-913.
- Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E., 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *Fems Microbiol. Rev.* 32, 579-606.
- Valero, M., Fernández, P.S., Salmerón, M.C., 2003. Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 71-79.
- Valero, M., Leontidis, S., Fernández, P.S., Martínez, A., Salmerón, M.C., 2000. Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5–30°C. *Food Microbiol.* 17, 605-612.
- van Asselt, E.D., Zwietering, M.H., 2006. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 107, 73-82.

7.1. Conclusion

Dans cette étude nous avons déterminé que chauffer 36,55 min à 48 °C, 19 min à 50 °C ou seulement quelques secondes à 60 °C est suffisant pour avoir une réduction de 6 log₁₀ UFC/ml de la concentration initiale de cellules végétatives de souches psychrotolérantes de *B. cereus*. Les résultats de cette étude montrent que le réchauffage d'un produit alimentaire avant sa consommation pourrait rapidement éliminer les cellules végétatives des *B. cereus* psychrotolerants si les conditions de stockage permettaient leur développement.

**Chapitre 8 :
Discussion et perspectives**

8. Chapitre 8 : Discussion et perspectives

8.1. Influence des facteurs environnementaux sur les capacités de croissance de souches psychrotolérantes de *Bacillus cereus*

La première partie des travaux de thèse a montré de quelle façon l'absence d'oxygène, la baisse du pH et de basses températures limitent la croissance de souches psychrotolérantes de *B. cereus* en milieu de laboratoire (Chapitre 4). L'absence d'oxygène va augmenter les valeurs limites pour la croissance du pH ($\text{pH}_{\min}$) et de la température ($T_{\min}$) (Guérin *et al.*, 2016). Le niveau maximum de population ($N_{\max}$) était réduit en absence d'oxygène comparé aux résultats obtenus en présence d'oxygène. Cet effet sur le $N_{\max}$ a aussi été remarqué par d'autres auteurs avec des cultures de souches mésophiles de *B. cereus* à de plus hautes températures en milieu de laboratoire, ainsi qu'avec des souches psychrotrophes dans des purées de légumes (De Sarrau *et al.*, 2012; Samapundo *et al.*, 2011) (Tableau 1A). Nous avons également constaté une réduction du $N_{\max}$ en anaérobiose dans du bouillon de carotte (Chapitre 5). Dans les conditions permettant la croissance, le $N_{\max}$ était aux alentours de 10^8 UFC/ml en aérobiose et de 10^6 UFC/ml en anaérobiose. Le taux de croissance était diminué par l'absence d'oxygène en milieu de laboratoire, mais seulement pour la souche *B. cereus* ADRIA I21, contrairement à la souche de *B. cereus* KBAB4 (Tableau 1A). Cette dernière semble donc mieux s'adapter à l'absence d'oxygène, bien que les deux souches appartiennent au même groupe phylogénétique. Le temps de latence augmentait pour les deux souches en absence d'oxygène, ce qui semble donc augmenter le temps d'adaptation aux basses températures avant la phase exponentielle de croissance (Guérin *et al.*, 2016).

Le métabolisme mis en place lors de la respiration anaérobie semble influencer négativement la production de biomasse par rapport à la respiration aérobie (Rosenfeld *et al.*, 2005; Zigha *et al.*, 2007). De Sarrau *et al.*, (2012) ont montré pour une souche mésophile que l'écart de biomasse entre les cultures en anaérobiose et en aérobiose augmente quand la température de croissance diminue. Cela est cohérent avec l'écart important observé dans notre étude entre les deux conditions, les croissances ayant été réalisées à basses températures. L'étude de l'effet combinée de l'anaérobiose et de basses températures sur le métabolisme de *B. cereus* par de Sarrau *et al.*, (2012) montre que *B. cereus* semble favoriser la synthèse d'ATP à l'oxydation de NADH en NAD^+ en privilégiant la synthèse d'acétate par rapport à l'éthanol. De plus, il a été observé que dans ces conditions le glucose présent dans le milieu n'était pas entièrement consommé. L'hypothèse émise dans cette étude était que la moindre

régénération de NADH inhiberait la synthèse de phosphoénolpyruvate à partir du glycéraldéhyde-3-P, étape consommatrice de NAD⁺, ce qui limitait la consommation de glucose (De Sarrau *et al.*, 2012), et pourrait réduire la production de biomasse.

Pour l'une des deux souches étudiées (KBAB4), nous avons pu remarquer que l'acidification du milieu jusqu'à un pH de 5,7 à 10 °C en anaérobiose, et jusqu'à un pH de 5,4 en aérobiose, n'influence pas la quantité de biomasse produite, ni le taux de croissance ni le temps de latence (Guérin *et al.*, 2016) (Tableau 1A et B). Cette baisse de pH ne semble donc pas influencer le métabolisme mis en place par *B. cereus*. Cependant ce phénomène semble souche dépendante, puisque pour l'autre souche les taux de croissance diminuent avec le pH. Il serait intéressant de déterminer par quels mécanismes *B. cereus* KBAB4 s'adapte aux conditions acides aux basses températures. Plusieurs études concernant les mécanismes mis en place lors de l'adaptation à basse température chez *B. cereus* ont été réalisés (Brillard and Broussolle, 2012; Brillard *et al.*, 2010; De Sarrau *et al.*, 2012) ainsi que sur l'influence de bas pH sur le métabolisme de *B. cereus* (Desriac *et al.*, 2013; Le Lay *et al.*, 2015; Senouci-Rezkallah *et al.*, 2011). Par contre, nous n'avons pas connaissance d'études concernant l'impact d'un stress froid combiné à celui d'une baisse de pH sur les mécanismes d'adaptation mis en place par *B. cereus*, et plus généralement chez d'autres espèces bactériennes.

Suite à un choc froid plusieurs mécanisme d'adaptation se mettent en place comme la synthèse de protéines du froid, « cold-shock protein » (Csp) (Graumann and Marahiel, 1996a; Graumann *et al.*, 1996b; Mayr *et al.*, 1996). Cinq Csp sont décrites chez *B. cereus*, dont les majeures sont Csp A et Csp B. Le rôle des Csp a été très peu décrit chez *B. cereus* mais chez d'autres bactéries comme *E. coli*, ces protéines agissent comme des chaperonnes des ARNm (Hunger *et al.*, 2006; Iost and Dreyfus, 2006). La production de ces Csp au froid est peut-être plus importante chez *B. cereus* KBAB4 que chez ADRIA I21 lorsque le pH diminue, ce qui expliquerait sa meilleure adaptation. Pendant une croissance à basse température il y a aussi une synthèse de désaturases d'acide gras (Des) qui engendrent des insaturations au niveau des acides gras déjà présents chez la bactérie, ce qui lui permet d'éviter la mise en place d'une néosynthèse d'acide gras qui demande beaucoup d'énergie, 8 molécules d'ATP pour un acide gras et 16 pour un phospholipide (Beranova *et al.*, 2010; De Sarrau *et al.*, 2012; Fujita *et al.*, 2007; Heath *et al.*, 2002). Ce mécanisme permet principalement de maintenir la fluidité de la membrane pour favoriser les échanges avec le milieu extérieur (Brillard and Broussolle, 2012; Hoffmann and Bremer, 2011). Ces mécanismes pourraient être mis en place de manière plus

importante chez la souche KBAB4, ou la baisse du pH n'influencerait peut-être pas ces mécanismes chez cette souche, tandis que ce serait le cas chez ADRIA I21. Il a été observé chez *E. coli* que le stress acide induit la synthèse d'acides gras tendant à rigidifier la membrane (Brown *et al.*, 1997). Si un mécanisme similaire existait chez *B. cereus*, les effets du froid et des bas pH sur la membrane seraient antagonistes. Il serait intéressant de rechercher si la meilleure adaptation de KBAB4 à l'association des deux stress repose sur un meilleur compromis au niveau de l'ajustement de la fluidité membranaire. Lors d'un stress acide le facteur sigma B (σ^B) semble être un facteur clef de la réponse à ce stress (Desriac *et al.*, 2013; van Schaik *et al.*, 2004). Ce facteur σ^B est impliqué dans différentes réponses aux stress, comme l'exposition au NaCl, à l'éthanol, H_2O_2 et à l'acide (Desriac *et al.*, 2013). Cependant il ne participerait pas à la réponse au stress à basse température chez *B. cereus* (Brillard and Broussolle, 2012). σ^B ne semble donc pas influencer l'adaptation au froid lorsque la bactérie subit un stress acide simultanément.

Des variations dans les mécanismes de réponse au stress acide, lorsque la bactérie est exposée aux basses températures, pourraient expliquer pourquoi la souche de *B. cereus* ADRIA I21 semble plus sensible à la baisse de pH au froid. En absence de stress, σ^B forme un complexe inactif avec le facteur anti-sigma Rsb W (van Schaik *et al.*, 2005). Un stress acide va engendrer la formation d'un nouveau complexe Rsb W-Rsb V qui va donc libérer le facteur σ^B qui va pouvoir permettre la transcription d'une trentaine de gènes de réponse au stress acide (de Been *et al.*, 2010; Desriac *et al.*, 2013; van Schaik and Abee, 2005a; van Schaik *et al.*, 2004a; van Schaik *et al.*, 2007; van Schaik *et al.*, 2004). Il n'existe pas de connaissances sur une éventuelle influence du froid sur la formation de ces complexes, ni sur la transcription et la traduction des gènes du régulon σ^B . En réponse à une baisse du pH du milieu, *B. cereus* met en place des systèmes de régulation du pH interne (Desriac *et al.*, 2013; Senouci-Rezkallah *et al.*, 2011), notamment l'arginine déiminase qui libère de l'ammoniac à partir de l'arginine. Il a été montré (Stelder *et al.*, 2015), pour une souche de *B. weihenstephanensis*, différente de celles que nous avons utilisées, que l'arginine déiminase n'était pas produite au froid (6°C). Selon Desriac *et al.* (2013) lors d'un stress acide, le métabolisme est réorienté vers des voies consommant des protons et permettant de maintenir un équilibre $NADH/NAD^+$. Or, de Sarrau *et al.* (2012) ont montré chez une souche de *B. cereus* mésophile que le froid en absence d'oxygène aurait un effet opposé, réduisant les voies consommant des protons.

Ces quelques exemples illustrent l'existence d'interactions potentielles entre adaptation au froid et adaptation aux pH acides, qu'il serait intéressant d'explorer chez les deux souches de *B. weihenstephanensis* KBAB4 et ADRIA-I21.

De précédentes études ont décrit les capacités de croissance de souches de *B. cereus* dans des milieux à base de légume (Choma *et al.*, 2000; De Sarrau *et al.*, 2013a; Samapundo *et al.*, 2011; Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2002; Valero *et al.*, 2007; Valero *et al.*, 2000). Nos résultats obtenus en absence d'oxygène en milieu de laboratoire coïncident avec ceux obtenus pour des souches psychrotrophes de *B. cereus* dans des purées de légume à des valeurs de pH allant de 6,15 à 6,3 (Tableau 1A). Il a été observé que le taux de croissance était environ de 0,03 h⁻¹, ce qui était similaire avec nos résultats de croissance de la souche ADRIA I21 qui avait un taux de croissance de 0,04 h⁻¹ à 8 °C pH 7,0 en BHI (Samapundo *et al.*, 2011). En présence d'oxygène, les taux de croissance que nous avons pu déterminer pour la souche KBAB4 étaient généralement plus élevés que ceux retrouvés dans les études précédentes conduites dans des conditions de températures et pH similaires, mais dans des milieux de cultures à base de légume (Benedict *et al.*, 1993; Jaquette and Beuchat, 1998; Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2000). Le taux de croissance semble donc être influencé par la composition du milieu de culture.

Par contre, en combinant nos résultats avec ceux précédemment publiés sur les effets combinés du pH et de la température, en présence ou en absence d'oxygène, il est possible de définir les zones limites de croissance de *B. cereus* pour ces deux facteurs (Tableau 1A et B). Les données des études présentées dans le Tableau 1B sont cohérentes entre elles, bien que provenant de souches appartenant à des groupes génétiques différents, de milieux de cultures et d'aliments différents (substrat de carotte ou de courgette). En présence d'oxygène le pH minimum de croissance à 25°C est de 4,75 et de 6,2 à 5°C. En absence d'oxygène peu de données sont disponibles, mais néanmoins le Tableau 1A montre une augmentation du pH min de croissance par rapport aux conditions aérobies (Tableau 1B).

En conclusion, ces premiers résultats ont mis en avant que la combinaison de basses températures, de bas pH et de l'absence d'oxygène pourrait aider au contrôle de la croissance de souches psychrotolérantes de *B. cereus*. L'anaérobiose (ex emballage sous vide) pourrait permettre l'inhibition de *B. cereus* pour des températures et pH plus élevés qu'en aérobiose (Fig 3).

A	Temperatures (°C)									
pH	7	8	10		12	15	20	30	37	
5.0			K							
5.3		K								
5.4			K	A						
5.5		K	K	A						
5.6			K							
5.7			K	A						
6.15	1									
6.30	1									
7.0		K	A	K	A					
7.2					2	2	2	2	2	

B	Temperatures (°C)											
pH	5	8		10		12	15	15.5	16	17.5	19	25
4.25												3
4.50												3
4.75												3
4.76												4
4.82										4		
5.00	5	3	5	3	K	3	5	3	5	5	3	3
5.10	5	5				5			5			
5.20	5	5				5			5			
5.25											6	
5.30	5	5	K	A	K	A	5		5			
5.40	5	5	K	A	K	A	5		5			
5.50	5	5	7	K	A	K	A	5	7	4	5	4
5.70				K	A							
6.00	6	7	K	A	6	7					6	4
6.20	3	3	3		3				3			3
6.25	6											
6.50		6	5	7	K	A	5	7	4	5	4	
7.00		K	A	K	A							
7.30	7	7										
7.40	7	7										

Figure 1. Données de la littérature scientifique et notre étude sur la croissance *Bacillus cereus* et l'absence de croissance en fonction de la température et du pH en anaérobiose (A) et en aérobiose (B). Case pointillée : aucune croissance ; Case grise : croissance ; Case quadrillée : croissance irrégulière ; Case blanche : non testé. Données de l'étude de Guérin *et al.*, (2016): souche KBAB4 (K) et souche ADRIA I21 (A). Données de la littérature scientifique: (Samapundo *et al.*, 2011) (1), (De Sarrau *et al.*, 2012) (2), (Valero *et al.*, 2000) (3), (Lanciotti *et al.*, 2001) (4), (Valero *et al.*, 2003) (5), (Benedict *et al.*, 1993) (6), and (Jaquette and Beuchat, 1998) (7). Aucune des études autres que Guérin *et al.*, (2016) n'a utilisée KBAB4 ou ADRIA I21. Les croissances ont été testées dans des produits alimentaires pour les études 1, 3 et 5, en BHI pour les études 4, 6 et 7 et dans du LB et milieux synthétiques pour l'étude 2.

8.2. Croissance de souches psychrotolérantes de *Bacillus cereus* dans un milieu aliment (bouillon de carotte)

Ces premiers résultats en milieux de laboratoire (BHI) nous ont amené à rechercher si dans ces mêmes conditions et avec la même souche de *B. cereus* nous retrouverions les mêmes résultats et conclusions dans un milieu à base de légumes. La carotte a été choisie en cohérence avec les produits développés dans le projet OPTIFEL. La carotte contient des glucides, des vitamines (vit C, B1, B2), des caroténoïdes et les principaux acides aminés que l'on retrouve dans le milieu de culture MOD qui permet la croissance de *B. cereus* (Abbas *et al.*, 2014b; Souci *et al.*, 2000). Différents facteurs pendant les modes de préparation testés semblent avoir un impact sur la physiologie des cellules végétatives inoculées par la suite, comme la présence d'oxygène, le mode de cuisson et de stérilisation. En fonction de ce mode de préparation, les molécules présentes dans la carotte semblent réagir différemment et devenir stressantes pour les cellules végétatives de *B. cereus* voire même inhibitrices, ou alors certains composés essentiels pour la croissance et survie de ces cellules sont détruits lors de ces processus de préparation. Un traitement thermique important sur des aliments peut produire des réactions de Maillard qui peuvent conduire à la production de molécules antimicrobiennes comme les mélanoidines (Rufian-Henares and Morales, 2007, 2008). Par exemple, il a été observé que les mélanoidines présentes dans le café à forte concentration avaient un effet bactéricide en éliminant les cations Mg^{2+} au niveau de la membrane cellulaire, ce qui occasionnait une perturbation de celle-ci avec une sortie des molécules intracellulaires (Hiramoto *et al.*, 2004; Rufian-Henares and de la Cueva, 2009; van Boekel *et al.*, 2010). L'aminoréductone est un second composé de la réaction de Maillard qui a aussi des effets antimicrobiens, par exemple sur *Staphylococcus aureus* ou encore *Helicobacter pylori* (Trang *et al.*, 2013; Trang *et al.*, 2009; Trang *et al.*, 2011). Dans le cas de la carotte, des traitements thermiques, comme un blanchiment vapeur ou l'appertisation, provoquent la formation de composés de la réaction de Maillard (Soria *et al.*, 2009; Wellner *et al.*, 2011). Ce genre de molécules pourrait donc être produit pendant l'étape de préparation du bouillon de carotte et donc avoir un effet néfaste sur les cellules végétatives de *B. cereus*.

De plus, la présence d'oxygène pendant le procédé de tyndallisation semble créer un effet létal pour les cellules végétatives de *B. cereus*. Ce phénomène a été observé lors d'un ensemencement à une concentration initiale de 10^3 UFC/ml ainsi qu'à une concentration de 10^6 UFC/ml. Par contre, une croissance est observée dans les jours suivants, ce qui pourrait

signifier qu'il y a un effet létal au départ et que les cellules survivantes sont trop peu nombreuses pour être détectées ou qu'une partie de l'effet létal correspond à des cellules viables non cultivables qui récupèrent ensuite la capacité à croître dans le milieu. Cependant ce phénomène n'a pas été retrouvé quand l'ensemencement se fait à partir d'une suspension de spores de *B. cereus* KBAB4. C'est le cas aussi dans les études réalisées par Valero *et al.*, qui ensemencent à chaque fois à partir de spores de *B. cereus* (Valero *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2007; Valero *et al.*, 2000). Cet effet létal restait stable durant un stockage des tubes dans le noir à température ambiante pendant environ 2 mois. Ce composé peut donc correspondre à une molécule détruite par la présence de bactéries ou les bactéries ont pu développer une résistance à cet effet ce qui expliquerait l'observation d'une croissance par la suite. Ce phénomène n'est cependant pas remarqué quand la tyndallisation est réalisée en absence d'oxygène dans le tube. Ceci nous indique que cet effet létal est généré par la présence d'oxygène pendant ce procédé de tyndallisation et pas au moment de l'inoculation des cellules végétatives. Des effets létaux sur différentes bactéries (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) ont été décrits dans de précédentes études, également à partir de carotte fraîche en présence d'oxygène (Babic *et al.*, 1994; Beuchat and Brackett, 1990; Degirmenci *et al.*, 2012; Nguyenthe and Lund, 1991, 1992; Noriega *et al.*, 2010). Cependant l'étude de Beuchat *et al.*, (1990) montrait que l'effet antimicrobien était annulé quand les carottes étaient cuites, mais l'impact d'un chauffage modéré comme dans notre étude (la tyndallisation), sur cet effet n'a pas été démontré.

Aucune croissance n'a été observée en condition d'aérobiose à 8 °C, par contre *B. weihenstephanensis* KBAB4 était capable de se développer à 8 °C jusqu'à atteindre une valeur de $N_{\max}$ d'environ 5,5 log₁₀ UFC/ml, dans du bouillon de carotte. L'ajout de PC comme source d'acides gras insaturés n'a pas engendré une augmentation de croissance en anaérobiose contrairement à ce que l'on a pu observer en BHI (Chapitre 5). L'étude de De Sarrau *et al.*, (2013a) a montré que la présence d'acide gras polyinsaturés à faible température de fusion dans les épinards, suffisaient à permettre l'adaptation de la membrane de *B. cereus* dans ce milieu épinard, permettant sa croissance à basse température et sans oxygène (De Sarrau *et al.*, 2013a). Dans la carotte, il y a déjà naturellement des phospholipides (phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol) (Souci *et al.*, 2000). Si une proportion suffisante de ces phospholipides contient des acides gras insaturés, cela expliquerait pourquoi l'ajout supplémentaire de PC

n'augmente pas la croissance puisque la fluidité de la membrane serait conservée grâce à ces phospholipides déjà présents initialement. La limitation de croissance dans le bouillon de carotte à 8°C en anaérobiose aurait donc une autre origine.

Les cellules issues de croissances en milieu carotte contiennent de multiples inclusions lipidiques comparées à ce que l'on peut observer en milieu BHI. Ces inclusions lipidiques pourraient correspondre à des granules de parahydrobutyrate (PHB) qui ont déjà été identifiés dans des cellules de *B. thurengiensis*, qui fait partie du groupe de *B. cereus* comme *B. weihenstephanensis* (Chen *et al.*, 2010). L'accumulation de PHB apparaît lors d'un stress, par exemple dû à la limitation en nutriments dans le milieu, et semble aider la bactérie à lutter contre ce stress (Lopez *et al.*, 2012; Obruca *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2007). Les inclusions lipidiques observées pourraient donc résulter d'un état de stress de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans les conditions d'aérobiose à 30 °C dans du bouillon de carotte. Mais en anaérobiose il y avait une croissance avec une morphologie typique (De Vos *et al.*, 2009) de cellules de *B. cereus* sans présence d'inclusions lipidiques. Les cellules végétatives de *B. cereus* KBAB4 seraient donc moins stressées dans ces conditions ou moins aptes à accumuler des réserves lipidiques. A l'appui de cette deuxième hypothèse, chez *B. thurengiensis*, Spo0A est nécessaire pour permettre l'accumulation de PHB (Chen *et al.*, 2010) et il a été montré que *B. cereus* sporulait très peu en condition d'anaérobiose (Abbas *et al.*, 2014a). Il est donc possible que l'anaérobiose limite la production de PHB chez *B. cereus*, par une action sur la sporulation et en particulier sur Spo0A, ce qui expliquerait pourquoi nous n'avons pas observé d'inclusion lipidique en anaérobiose.

Il a donc été mis en avant que le processus de préparation d'un produit alimentaire à base de légume pouvait influencer les capacités de croissance de souches psychrotolérantes de *B. cereus* par la suite. En particulier, cette étude a mis en évidence l'importance de l'impact de la présence d'oxygène pendant la tyndallisation sur les cellules végétatives de *B. cereus*. Globalement, la température et l'oxygène semblent avoir un effet opposé sur des cellules végétatives cultivées en bouillon de carotte et en milieu riche de laboratoire comme le BHI. Ceci nous amène à des conclusions autres que celles que nous avons pu émettre suite à l'étude en milieu de laboratoire comme par exemple, la présence d'oxygène pendant la conception d'un produit alimentaire à base de légume pourrait limiter le développement de cellules de *B. cereus*. Cette étude met en avant que l'interaction entre la matrice alimentaire et les

conditions environnementale pendant la préparation et le stockage des produits alimentaires influence le devenir des cellules de *B. cereus* potentiellement présentes.

La plupart des toxi-infections diarrhéiques à *B. cereus* sont le plus souvent associées à une population égale ou supérieure à 10^5 UFC/g d'aliments consommés. Cependant des toxi-infections ont été associées à des aliments contenant seulement 10^3 UFC/g (ANSES, 2011; Cadel Six *et al.*, 2012; Cadel Six *et al.*, 2014). Les valeurs de $N_{\max}$ déterminées dans notre étude restaient supérieures aux concentrations de *B. cereus* pouvant causer des TIACs. Par exemple, la souche psychrotolérante KBAB4 était capable de se développer sans oxygène à 10 °C, pH 5,7 avec un $N_{\max}$ de 5,45 $\log_{10}$ UFC/ml au bout d'environ 4 jours, et ADRIA I21 à 8 °C, pH 7 avec un $N_{\max}$ de 4,79 $\log_{10}$ UFC/ml au bout d'environ 4 jours également (Guérin *et al.*, 2016). Les concentrations atteintes peuvent donc représenter un risque pour le consommateur, d'autant que les DLC des produits sont souvent plus longues que 4 jours. Donc pour des questions de sécurité microbiologique il faut respecter des conditions de stockage des produits évitant de se placer dans le domaine de croissance des souches psychrotolérantes de *B. cereus* (Fig 3).

8.3. Capacités de production de céréulide par des souches psychrotolérantes de *Bacillus weihenstephanensis*

Nous avons par la suite cherché à déterminer la capacité de production de céréulide par deux souches psychrotolérantes de *B. cereus* appartenant au groupe phylogénétique VI afin de savoir si elles pouvaient représenter un risque lors de la conservation et le stockage des nouveaux produits alimentaires OPTIFEL (Chapitre 6). Nous avons pu observer que la production de céréulide diminuait avec la baisse de température mais qu'il y avait toujours une production à 8 °C, en particulier pour la souche BtB2-4 qui a une production de céréulide aux alentours de 1000 ng/ml à 25 °C, 10 ng/ml entre 10 °C et 15 °C et 2 ng/ml à 8 °C. Nous avons aussi montré que la baisse de pH influençait de manière négative la production de céréulide. Auparavant l'influence du pH de différentes matrices alimentaires avait été montré chez les souches émétiques mésophiles de *B. cereus* (Dommel *et al.*, 2010; Messelhausser *et al.*, 2010). Plusieurs études ont montré l'importance d'autres facteurs environnementaux comme la température, de la disponibilité en oxygène, la source de carbone, sur la formation de céréulide (Dommel *et al.*, 2010; Dommel *et al.*, 2011; Ehling-Schulz *et al.*, 2015; Finlay *et al.*, 2000; Jaaskelainen *et al.*, 2004; Messelhausser *et al.*, 2010; Rossvoll *et al.*, 2014; Thorsen

et al., 2009a; Thorsen *et al.*, 2009b). Les effets de la concentration en NaCl, ainsi que ceux de matrices alimentaires, sur la production de céréulide, sont corrélés aux niveaux d'expression des gènes assurant la synthèse du céréulide (gènes *ces*). Leur expression est associée aux premières étapes du processus de sporulation et dépend de la transcription précoce, sigma A (σ^A) dépendante, de *spo0A*. Le principal promoteur du groupe des gènes *ces* est lui aussi σ^A dépendant. En outre, les gènes *ces* sont aussi réprimés par le facteur de régulation CodY (Ehling-Schulz *et al.*, 2015; Sonenshein, 2005). Néanmoins, ces connaissances sur la régulation de l'expression des gènes *ces* ne suffisent pas à expliquer l'effet des facteurs environnementaux sur la production de céréulide. En particulier, il n'est pas connu si le froid ou les pH acides modifient l'expression des gènes *ces* et si oui, selon quelle voie de régulation. Dans le cas de *L. monocytogenes* le froid induirait l'opéron CodY (Durack *et al.*, 2013) mais cela n'a pas été décrit chez *B. cereus*. Il serait pourtant important de comprendre les mécanismes par lesquels le froid influence la production de céréulide, car nos résultats, combinés à ceux de la littérature, font ressortir une forte incertitude sur cet effet. Dans notre étude, nous avons utilisé deux souches de *B. weihenstephanensis* dont une, La souche MC67, qui avait été déjà étudiée dans plusieurs articles scientifiques. Nous avons trouvé une production de céréulide beaucoup plus faible à 8°C pour cette souche que Rossvoll *et al.*, (2014) alors que nous avons utilisé le même protocole de préparation de l'inoculum et de culture. En outre, il a été montré dans des études précédentes, que l'incubation au froid de l'inoculum avait un impact sur la production de céréulide. Une pré-incubation à basse température comme 8 °C pendant plusieurs semaines diminue la production de céréulide à 25 °C par la suite, par comparaison avec une culture à 25 °C en absence de pré-incubation au froid (Thorsen *et al.*, 2009a).

Concernant la faible production de céréulide à 8°C par la MC67 dans notre étude, certains points diffèrent dans le protocole d'extraction par rapport à Rossvoll *et al.*, (2014). *B. cereus* produit du céréulide de manière intracellulaire et ceci nécessite donc une étape de broyage des cellules, ce que nous avons effectué avec l'aide d'un Mini-G. La quantité moindre de céréulide retrouvée pour la MC67 par rapport à l'étude de Rossvoll *et al.*, (2014) pourrait être due à un broyage insuffisant n'ayant pas cassé les cellules. Cependant les quantités de céréulide retrouvées pour la souche BtB2-4 ayant subi le même traitement étaient supérieures, de plusieurs facteurs de 10, à celles de la souche MC67 (Chapitre 6), indiquant une bonne efficacité du broyage. Pour la suite du protocole, après le broyage, les contrôles

positifs et négatifs et la bonne qualité des courbes de calibration (coefficient de corrélation : 0.997), montrent que le céréulide présent dans les échantillons, a bien été extrait.

Nous avons observé que la production de céréulide par ces deux souches émétiques du même groupe phylogénétique n'était pas la même. La production de la souche BtB2-4 est plus élevée que celle de la souche MC67 dans toutes les conditions testées. Ces souches ont été choisies pour cette étude car le mégaplasme où est localisé le cluster de gènes *ces* n'a pas été retrouvé dans la souche BtB2-4, le support génétique de ce cluster n'est donc sans doute le même pour ces deux souches (Hoton *et al.*, 2009). Ce qui pourrait expliquer en partie la différence de production de céréulide de celle-ci. Chez la souche BtB2-4, le cluster de gènes *ces* semble être entouré de gènes chromosomique ce qui nous amène à penser qu'il serait sûrement sur le chromosome (Mei *et al.*, 2014). En outre, chez plusieurs souches émétiques, il a été mis en avant la présence d'éléments génétiques mobiles à proximité du cluster de gènes *ces*. En particulier, chez la souche MC67, le groupe des gènes *ces* ferait partie d'un transposon, dont la capacité de transférer des gènes a été démontrée (Ehling-Schulz *et al.*, 2015; Mei *et al.*, 2014).

Par rapport aux travaux de Agata *et al.*, (2002), où la quantité la plus faible de céréulide retrouvée dans des aliments ayant provoqué des symptômes émétiques était de 0.01 µg/g, le risque de toxiinfection par des aliments stockés à basse température (inférieure ou égale à 8 °C) semble faible (2 ng/ml produit par *B. weihenstephanensis* BtB2-4, Chapitre 6). Les conditions environnementales de croissance de ces souches, la préparation de l'inoculum, la composition de l'aliment, les souches présentes, influencent la production de céréulide par les souches mésophiles et psychrotolérantes de *B. cereus* (Chapitre 6) (Ehling-Schulz *et al.*, 2015). Il est donc important de prendre en compte la composition, les conditions de préparation et de stockage du produit alimentaire analysé afin de pouvoir définir le risque potentiel de contamination par ce type de souche et leur capacité de production de céréulide. Concernant les produits OPTIFEL, il semble donc nécessaire de conserver ces produits à basse température (< 8 °C). Un conditionnement des aliments sans oxygène peut être un moyen de contrôle supplémentaire, en cas de remontée de température par exemple, car la production de céréulide requière la présence d'oxygène (Fig 3) (Ehling-Schulz *et al.*, 2015; Finlay *et al.*, 2000; Jaaskelainen *et al.*, 2004). De plus, même si elles sont rares dans les aliments et l'environnement, des souches émétiques de *B. cereus* ont déjà été retrouvées dans

des aliments à base de carotte par exemple (Altayar and Sutherland, 2006; Flores-Urban et al., 2014).

8.4. Thermo-résistance des cellules végétatives de souches psychrotolérantes de *Bacillus cereus*

Dans l'optique où des souches psychrotolérantes de *B. cereus* se seraient développées pendant le stockage au froid des produits alimentaires, dans des conditions ne permettant pas la production du céréulide, toxine thermorésistante, il nous a semblé important de vérifier si un simple chauffage des plats avant leur consommation pouvait éliminer les cellules végétatives présentes (Chapitre 7). Plusieurs études ont été réalisées sur la thermo-résistance des spores de *B. cereus* (Afchain et al., 2008; Carlin et al., 2010; Luu-Thi et al., 2014) mais très peu concernant les cellules végétatives. Dans cette étude, nous avons choisi un panel de souches psychrotolérantes de *B. cereus* appartenant à différents groupes phylogénétiques (II, V, VI). En comparant les valeurs de z obtenues pour chacune des souches testées, aucune différence significative n'a été démontrée ce qui était le cas aussi pour les spores de souches psychrotolérantes de différents groupes phylogénétiques (Luu-Thi et al., 2014). Il ne semble donc pas y avoir de différence de sensibilité à la température des cellules végétatives entre les groupes phylogénétiques (Chapitre 7). De plus, la valeur de z obtenue pour deux souches appartenant au groupe le plus génétiquement éloigné des précédents (VII) n'était pas significativement différente de celles retrouvées pour les souches psychrotolérantes. Cependant la température nécessaire pour que δ soit égal à 1 min ($T_{\delta=1}$) est logiquement plus faible pour les souches psychrotolérantes que pour les thermotolérantes. Les valeurs de z obtenues dans cette études (entre 2,12 °C et 5,45 °C) sont faibles comparées à celles des cellules végétatives d'autres bactéries. Par exemple, les cellules végétatives de la bactérie sporulante *Clostridium perfringens* ont une valeur de z égale à 7,7 °C, pour *Listeria monocytogenes* le z est de 7,0 °C et pour *Campylobacter* z est égal à 6,4 °C (Byrne et al., 2006; Nguyen et al., 2006; van Asselt and Zwietering, 2006). Les conditions environnementales et de croissance peuvent influencer la thermo-résistance des souches de *B. cereus* (den Besten et al., 2010). Il a été mis en évidence dans notre étude que des cellules végétatives cultivées à 8 °C étaient légèrement plus thermorésistantes que celles ayant été cultivées à 30 °C. La thermo-résistance des cellules végétatives dépend des conditions de croissance, comme la température, la concentration de NaCl, et sans doute du type de milieu

de croissance. Elle va donc pouvoir varier en fonction du type d'aliment, des conditions de stockage de celui-ci et des souches pouvant se développer dans ces conditions. Dans notre étude nous avons pu conclure que quelques secondes à 60 °C suffiraient à avoir une diminution de 6 log₁₀ UFC/ml de la population bactérienne initialement présente. En France, en restauration collective, comme les hôpitaux et maisons de retraite, les plats doivent être réchauffés de manière à passer de 10 °C à 63 °C, de manière homogène dans le produit alimentaire, en moins d'une heure, et maintenus à plus de 63 °C avant le service (Legifrance.gouv.fr ; galateepro.agriculture.gouv.fr). En milieu hospitalier, le plus souvent les plats sont réchauffés à l'aide de fours à chaleur tournante, évitant le réchauffage par microonde qui produit une augmentation de la température du plat hétérogène (Nott *et al.*, 2000). Ceci nous a permis de conclure que s'il y avait une croissance d'une souche de *B. cereus* durant le stockage au froid, le réchauffage de l'aliment avant la consommation, dans les conditions de la restauration collective, suffirait à éliminer les cellules végétatives de *B. cereus* présentes (Chapitre 7) (Fig 3). Toutefois, les modalités de réchauffages à domicile dépendent des préférences des consommateurs et des équipements utilisés. Dans une étude sur des adultes entre 30 et 40 ans, environ la moitié des sujets préféraient leurs plats à une température inférieure à 60 °C (Kim *et al.*, 2015), température qui pourrait être inférieure chez les personnes âgées. En outre, en cas de réchauffage par microonde les hétérogénéités de température peuvent conduire à une moindre réduction des microorganismes présents, par comparaison avec un réchauffage au bain-marie (Hamoud-Agha *et al.*, 2013) (Fig 2).

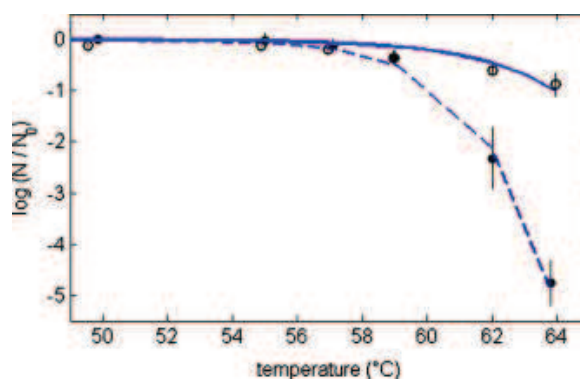
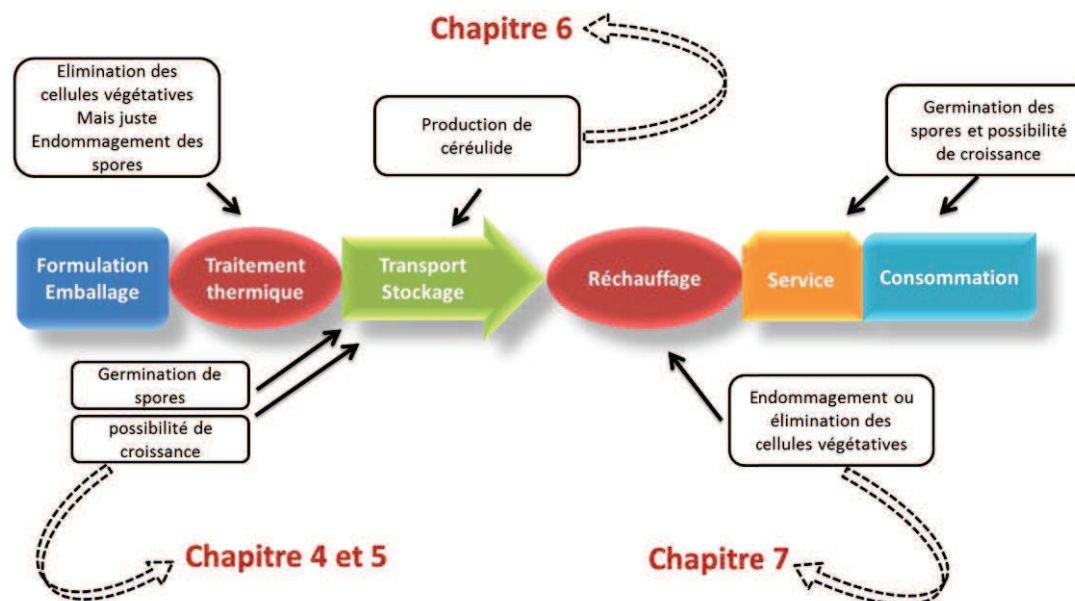


Figure 2 : Ajustement de la réduction, via un modèle d'inactivation avec des données expérimentales, par réchauffage d'un aliment en microonde (○, ligne pleine) (Geeraerd *et al.*, 2000) et en bain marie (●, ligne pointillée) (Hamoud-Agha *et al.*, 2013)



Résultats importants obtenus lors de cette étude :

Chapitre 4 et 5 :

- Si il y a une croissance de *B. cereus*, celle-ci est rapide et représente un risque par rapport aux DLC des produits alimentaires. **L'aliment doit être conservé dans des conditions hors du domaine de croissance.**
- Une température $< 8^{\circ}\text{C}$ et un $\text{pH} \leq 5,4$ en présence d'oxygène, ou une température $\leq 10^{\circ}\text{C}$ et un $\text{pH} < 5,7$ en absence d'oxygène, ou une température $< 8^{\circ}\text{C}$ si le $\text{pH} \leq 7,0$, **limitent la croissance de *B. cereus*.**
- Mais la composition ou la préparation de l'aliment modifient ces limites.

Chapitre 6:

- Une température $< 10^{\circ}\text{C}$ ou un $\text{pH} \leq 5,4$ limitent la production de céréulide par des souches psychrotolérantes de *B. cereus*.
- **Si celui-ci est produite pendant cette étape de stockage au froid il ne pourra pas être éliminé lors des étapes suivantes.**

Chapitre 7:

- La croissance de *B. cereus* durant la conservation au froid est à éviter, mais si une certaine croissance survient, les cellules végétatives seront éliminées par l'étape de réchauffage du plat. Par exemple 36 min à 48°C , 19 min à 50°C , quelques secondes à 60°C permettent une réduction de 6 log10 UFC/ml. **La norme en établissement collectif: passage du produit alimentaire de 4°C à 63°C en moins d'une heure, est donc suffisante.**

Figure 3. Bilan des conditions d'environnement à prendre en compte lors de la vie du produit afin de limiter le risque de toxiiinfection par *Bacillus cereus*

8.5. Conclusion sur les comportements possibles de *Bacillus cereus* pendant la vie d'un produit alimentaire

L'intégralité de ces travaux illustre l'importance de connaître les capacités de croissance et de production de toxine de la bactérie pathogène *B. cereus* tout au long de la vie du produit alimentaire, jusqu'à sa consommation sous forme de produit fini (Fig. 3). Les premières études en milieu de laboratoire ont permis de définir des zones de croissance pour des souches capables de croître à basse température, dans différentes conditions environnementales combinées (température, anaérobiose, pH), ce qui aurait été difficile dans un aliment. Par la suite nous avons pu constater que dans un aliment le comportement de la bactérie diffère par rapport à celui observé en milieu de laboratoire. La composition de l'aliment ainsi que son mode de préparation sont donc importants à prendre en compte pour comprendre le comportement possible de *B. cereus*. Ainsi, les conclusions tirées à partir d'études en milieux de laboratoire ne sont pas forcément applicables à des milieux biologiques souvent complexes comme les aliments préparés. Puis nous avons réalisé une étude permettant d'appréhender la possibilité de production de la toxine émétique à basse température. Ceci permet d'apporter des informations sur le risque potentiel de production de cette toxine lors d'un stockage au froid de produits alimentaires, toxine qui ne pourra être détruite avant la consommation de l'aliment, compte tenu de sa stabilité. Par contre la destruction des cellules végétatives de *B. cereus* par le simple réchauffage du produit avant sa consommation fut un point important à vérifier.

**Chapitre 9 :
Références bibliographiques**

9. Chapitre 9 : Références bibliographiques

- Abbas, A.A., Planchon, S., Jobin, M., Schmitt, P., 2014a. Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*. Food Microbiol. 42, 122-131.
- Abbas, A.A., Planchon, S., Jobin, M., Schmitt, P., 2014b. A new chemically defined medium for the growth and sporulation of *Bacillus cereus* strains in anaerobiosis. J. Microbiol. Meth. 105, 54-58.
- Abee, T., Wouters, J.A., 1999. Microbial stress response in minimal processing. Int. J. Food Microbiol. 50, 65-91.
- Afchain, A.L., Carlin, F., Nguyen-the, C., Albert, I., 2008. Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurised and chilled foods. Int. J. Food Microbiol. 128, 165-173.
- AFSSA, 2009. Avis de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments sur l'évaluation des besoins nutritionnels chez les personnes âgées fragiles ou atteintes de certaines pathologies afin de définir des références nutritionnelles permettant d'adapter leur prise en charge nutritionnelle.
- 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 - 19.
- 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.
- Amado, I.R., Vázquez, J.A., Guerra, N.P., Pastrana, L., 2014. Thermal resistance of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from vegetable feed ingredients. J. Sci. food Agr., 2274-2281.
- ANSES, 2011. *Bacillus cereus*. Anses, Agence nationale de sécurité sanitaire alimentaire, environnement, travail - fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments.
- ANSES, 2016. les toxi-infection alimentaires collectives (TIAC).

- Babic, I., Nguyenthe, C., Amiot, M.J., Aubert, S., 1994. Antimicrobial activity of shredded carrot extracts on food-borne bacteria and yeast. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 135-141.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., McClure, P., 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiol.* 10, 43-59.
- Beecher, D.J., Macmillan, J.D., 1990. A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 58, 2220-2227.
- Beecher, D.J., Macmillan, J.D., 1991. Characterization of the components of hemolysin-bl from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 59, 1778-1784.
- Benedict, R.C., Partridge, T., Wells, D., Buchanan, R.L., 1993. *Bacillus cereus*: aerobic growth kinetics. *J. Food Prot.* 56, 211-214.
- Bennett, S.D., Walsh, K.A., Gould, L.H., 2013. Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*-United States, 1998-2008. *Clin. Infect. Dis.* 57, 425-433.
- Beranova, J., Mansilla, M.C., de Mendoza, D., Elhottova, D., Konopasek, I., 2010. Differences in Cold Adaptation of *Bacillus subtilis* under Anaerobic and Aerobic Conditions. *J. Bacteriol.* 192, 4164-4171.
- Beuchat, L.R., Brackett, R.E., 1990. Inhibitory effects of raw carrots on *listeria-monocytogenes*. *Appl. Env. Microbiol.* 56, 1734-1742.
- Biesta-Peters, E.G., Reij, M.W., Blaauw, R.H., in't Veld, P.H., Rajkovic, A., Ehling-Schulz, M., Abee, T., 2010. Quantification of the Emetic Toxin Cereulide in Food Products by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Using Synthetic Cereulide as a Standard. *Appl. Environ. Microb.* 76, 7466-7472.
- Blanchet, D., Le Gallo, F., 2013. Baby-boom et allongement de la durée de vie: quelles contributions au vieillissement? Insee Analyses n° 12.
- Brillard, J., Broussolle, V., 2012. Mechanisms Involved in Low-temperature Adaptation in *Bacillus cereus*. Caister Academic Press, Wymondham.
- Brillard, J., Jehanno, I., Dargaignaratz, C., Barbosa, I., Ginies, C., Carlin, F., Fedhila, S., Nguyen-the, C., Broussolle, V., Sanchis, V., 2010. Identification of *Bacillus cereus* genes specifically expressed during growth at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* 76, 2562-2573.
- Broussolle, V., Pandiani, F., Haddad, N., Michaud, C., Carlin, F., Nguyen-the, C., Brillard, J., 2010. Insertional mutagenesis reveals genes involved in *Bacillus cereus* ATCC 14579 growth at low temperature. *FEMS Microbiol Lett* 306, 177-183.

- Brown, J.L., Ross, T., McMeekin, T.A., Nichols, P.D., 1997. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *Int. J. Food Microbiol.* 37, 163-173.
- Browne, N., Dowds, B.C.A., 2002. Acid stress in the food pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* 92, 404-414.
- Byrne, B., Dunne, G., Bolton, D.J., 2006. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. *Food Microbiol.* 23, 803-808.
- Cadel Six, S., De Buyser, M.L., Vignaud, M.L., Dao, T.T., Messio, S., Pairaud, S., Hennekinne, J.A., Pihier, N., Brisabois, A., 2012. Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus*: Bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. *BEH*, 45-49.
- Cadel Six, S., Herbin, S., Vignaud, M.L., Chretien, R., Messio, S., Pairaud, S., Prigent, L., Hennekinne, J.A., Brisabois, A., 2014. Investigation d'une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) à *Bacillus cereus* producteurs d'entérotoxines. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* 63, 20-23.
- Carlin, F., Albagnac, C., Rida, A., Guinebretière, M.-H., Couvert, O., Nguyen-the, C., 2013. Variation of cardinal growth parameters and growth limits according to phylogenetic affiliation in the *Bacillus cereus* Group. Consequences for risk assessment. *Food Microbiol.* 33, 69-76.
- Carlin, F., Brillard, J., Broussolle, V., Clavel, T., Duport, C., Jobin, M., Guinebretiere, M.-H., Auger, S., Sorokine, A., Nguyen-The, C., 2010. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Res. Int.* 43, 1885-1894.
- Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., Salkinoja Salonen, M., 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., Girardin, H., Peck, M.W., Stringer, S.C., Barker, G.C., Martinez, A., Fernandez, A., Fernandez, P., Waites, W.M., Movahedi, S., van Leusden, F., Nauta, M., Moezelaar, R., Del Torre, M., Litman, S., 2000. Research on factors allowing a risk assessment of spore-forming pathogenic bacteria in cooked chilled foods

- containing vegetables: a FAIR collaborative project. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 117-135.
- Chen, H.J., Tsai, T.K., Pan, S.C., Lin, J.S., Tseng, C.L., Shaw, G.C., 2010. The master transcription factor Spo0A is required for poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) accumulation and expression of genes involved in PHB biosynthesis in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 304, 74-81.
- Choma, C., Guinebretière, M.H., Carlin, F., Schmitt, P., Velge, P., Granum, P.E., Nguyen-The, C., 2000. Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *J. Appl. Microbiol.* 88, 617-625.
- Clark, F.E., 1937. The Relation of *Bacillus siamensis* and Similar Pathogenic Spore-forming Bacteria to *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* 33 435-443.
- Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C., Schmitt, P., 2004. Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J. Appl. Microbiol.* 97, 214-219.
- CNA, 2005. Avis sur les besoins alimentaires des personnes âgées et leur contraintes spécifiques. Conseil National de l'Alimentation n°53.
- Daelman, J., Membré, J.-M., Jacxsens, L., Vermeulen, A., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., 2013. A quantitative microbiological exposure assessment model for *Bacillus cereus* in REPFEDs. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 433-449.
- Daguet, F., 1996. La parenthèse du baby-boom. Insee Première n°479.
- de Been, M., Tempelaars, M.H., van Schaik, W., Moezelaar, R., Siezen, R.J., Abee, T., 2010. A novel hybrid kinase is essential for regulating the sigma B-mediated stress response of *Bacillus cereus*. *Environ. Microbiol.* 12, 730-744.
- De Buyser, M.L., Guinebretière, M.H., Aujames, M., Schiaulini, M.A., Théry-Chamard, B., Langlois, R., Galita, C., Pariente Khayat, A., Dao, T.T., 2008. Investigation d'une TIAC en maison de retraite : un cocktail de *Bacillus cereus*. *ANSES-Bulletin Épidémiologique*.
- De Sarrau, B., Clavel, T., Bornard, I., Nguyen-the, C., 2013b. Low temperatures and fermentative metabolism limit peptidoglycan digestion of *Bacillus cereus*. Impact on colony forming unit counts. *Food Microbiol.* 33, 213-220.

- De Sarrau, B., Clavel, T., Clerte, C., Carlin, F., Ginies, C., Nguyen-The, C., 2012. Influence of anaerobiosis and low temperature on *Bacillus cereus* growth, metabolism, and membrane properties. *Appl. Env. Microbiol.* 78, 1715-1723.
- De Sarrau, B., Clavel, T., Zwickel, N., Despres, J., Dupont, S., Beney, L., Tourdot-Marechal, R., Nguyen-the, C., 2013a. Unsaturated fatty acids from food and in the growth medium improve growth of *Bacillus cereus* under cold and anaerobic conditions. *Food Microbiol.* 36, 113-122.
- De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W.B., 2009. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* - second edition. Bergey's manual trust 3.
- Degirmenci, H., Karapinar, M., Karabiyikli, S., 2012. The survival of *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes* in black carrot (*Daucus carota*) juice. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 212-215.
- Del Torre, M., Della Corte, M., Stecchini, M.L., 2001. Prevalence and behaviour of *Bacillus cereus* in a REPFED of Italian origin. *Int. J. Food Microbiol.* 63, 199-207.
- Delmas, G., Jourdan da Silva, N., Pihier, N., Weill, F.X., Vaillant, V., Valk, H., 2010. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. *BEH* 31-32.
- den Besten, H.M.W., Mataragas, M., Moezelaar, R., Abee, T., Zwietering, M.H., 2006. Quantification of the effects of salt stress and physiological state on thermotolerance of *Bacillus cereus* ATCC 10987 and ATCC 14579. *Appl. Environ. Microb.* 72, 5884-5894.
- den Besten, H.M.W., van der Mark, E.-J., Hensen, L., Abee, T., Zwietering, M.H., 2010. Quantification of the Effect of Culturing Temperature on Salt-Induced Heat Resistance of *Bacillus* Species. *Appl. Environ. Microb.* 76, 4286-4292.
- Desriac, N., Broussolle, V., Postollec, F., Mathot, A.G., Sohier, D., Coroller, L., Leguerinel, I., 2013. *Bacillus cereus* cell response upon exposure to acid environment: toward the identification of potential biomarkers. *Front Microbiol* 4.
- Dierick, K., Van Coillie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., Hoedemaekers, G., Fourie, L., Heyndrickx, M., Mahillon, J., 2005. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J Clin Microbiol* 43, 4277 - 4279.

- Divert, C., Laghmaoui, R., Crema, C., Issanchou, S., Wymelbeke, V.V., Sulmont-Rossé, C., 2015. Improving meal context in nursing homes. Impact of four strategies on food intake and meal pleasure. *Appetite* 84, 139-147.
- Dommel, M.K., Frenzel, E., Strasser, B., Blochinger, C., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., 2010. Identification of the Main Promoter Directing Cereulide Biosynthesis in Emetic *Bacillus cereus* and Its Application for Real-Time Monitoring of ces Gene Expression in Foods. *Appl. Environ. Microb.* 76, 1232-1240.
- Dommel, M.K., Lucking, G., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., 2011. Transcriptional kinetic analyses of cereulide synthetase genes with respect to growth, sporulation and emetic toxin production in *Bacillus cereus*. *Food Microbiol* 28, 284-290.
- Dromigny, E., 2008. *Bacillus cereus*. Lavoisier.
- Durack, J., Ross, T., Bowman, J.P., 2013. Characterisation of the Transcriptomes of Genetically Diverse *Listeria monocytogenes* Exposed to Hyperosmotic and Low Temperature Conditions Reveal Global Stress-Adaptation Mechanisms. *PLoS One* 8.
- EFSA, 2011. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA J.* 9, 2090.
- EFSA, 2012. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA J.* 10, 2597.
- EFSA, 2013. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA J.* 11, 3129.
- EFSA, 2014. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA J.* 12, 3547.
- EFSA, 2015. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.* 13, 3991.
- EFSA, 2015b. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA J.* 13, 4329.

- EFSA, 2016. Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp.* including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. EFSA J. 14, 4524.
- Ehling-Schulz, M., Frenzel, E., Gohar, M., 2015. Food-bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. Front. Microbiol. 6:704.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Grallert, H., Rieck, P., Wagner, M., Scherer, S., 2006a. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: Structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXOI. BMC Microbiology 6:20.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Scherer, S., 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. Molecular Nutrition & Food Research 48, 479-487.
- Ehling-Schulz, M., Guinebretiere, M.H., Monthan, A., Berge, O., Fricker, M., Svensson, B., 2006b. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. 260, 232-240.
- Ehling-Schulz, M., Vukov, N., Schulz, A., Shaheen, R., Andersson, M., Martlbauer, E., Scherer, S., 2005. Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microb. 71, 105-113.
- Fernández, A., Collado, J., Cunha, L.M., Ocio, M.J., Martínez, A., 2002. Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. Int. J. Food Microbiol. 77, 147-153.
- Finlay, W.J.J., Logan, N.A., Sutherland, A.D., 2000. *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. Lett. Appl. Microbiol. 31, 385-389.
- Flores-Urban, K.A., Natividad-Bonifacio, I., Vazquez-Quinones, C.R., Vazquez-Salinas, C., Quinones-Ramirez, E.I., 2014. Detection of Toxigenic *Bacillus cereus* Strains Isolated from Vegetables in Mexico City. J. Food Protect. 77, 2144-2147.
- Forghani, F., Kim, J.-B., Oh, D.-H., 2014. Enterotoxigenic Profiling of Emetic Toxin- and Enterotoxin-Producing *Bacillus cereus*, Isolated from Food, Environmental, and Clinical Samples by Multiplex PCR. J. Food Sci., 2288-2293.
- Frankland, G.C., Frankland, P.F., 1887. Studies on Some New Micro-Organisms Obtained from Air Royal Society 178, 257-287.

- Fujita, Y., Matsuoka, H., Hirooka, K., 2007. Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Mol. Microbiol.* 66, 829-839.
- Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., Van Impe, J.F., 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 59, 185-209.
- Granum, P.E., Brynestad, S., Kramer, J.M., 1993. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int. J. Food Microbiol.* 17, 269-279.
- Granum, P.E., Tomas, J.M., Alouf, J.E., 1995. A survey of bacterial toxins involved in food poisoning: a suggestion for bacterial food poisoning toxin nomenclature. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 129-144.
- Graumann, P., Marahiel, M.A., 1996a. Some like it cold: Response of microorganisms to cold shock. *Arch. Microbiol.* 166, 293-300.
- Graumann, P., Schroder, K., Schmid, R., Marahiel, M.A., 1996b. Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 178, 4611-4619.
- Guérin, A., Dargaignaratz, C., Broussolle, V., Clavel, T., Nguyen-the, C., 2016. Combined effect of anaerobiosis, low pH and cold temperatures on the growth capacities of psychrotrophic *Bacillus cereus*. *Food Microbiol.* 59, 119-123.
- Guinebretiere, M.-H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M.-L., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P., Lereclus, D., 2013. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 31 - 40.
- Guinebretiere, M.H., Girardin, H., Dargaignaratz, C., Carlin, F., Nguyen-The, C., 2003a. Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini puree processing line. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 223-232.
- Guinebretiere, M.H., Nguyen-The, C., 2003b. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. *Fems Microbiology Ecology* 43, 207-215.
- Guinebretière, M.H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., De Vos, P.,

2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Env. Microbiol.* 10, 851-865.
- Guinebretiere, M.H., Velge, P., Couvert, O., Carlin, F., Debuyser, M.L., Nguyen-The, C., 2010. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *J Clin Microbiol* 48, 3388-3391.
- Hamoud-Agha, M.M., Curet, S., Simonin, H., Boillereaux, L., 2013. Microwave inactivation of *Escherichia coli* K12 CIP 54.117 in a gel medium: Experimental and numerical study. *J. Food Eng.* 116, 315-323.
- Hauge, S., 1950. Food Poisoning caused by *Bacillus cereus*. A Preliminary Report". *Nordisk Hygienisk Tidskrift* 6, 189-206.
- Heath, R.J., Jackowski, S., Rock, C.O., 2002. Chapter 3 Fatty acid and phospholipid metabolism in prokaryotes, *New Comprehensive Biochemistry*. Elsevier, pp. 55-92.
- Hiramoto, S., Itoh, K., Shizuuchi, S., Kawachi, Y., Morishita, Y., Nagase, M., Suzuki, Y., Nobuta, Y., Sudou, Y., Nakamura, O., Kagaya, I., Goshima, H., Kodama, Y., Icatro, F.C., Koizumi, W., Saigenji, K., Miura, S., Sugiyama, T., Kimura, N., 2004. Melanoidin, a food protein-derived advanced maillard reaction product, suppresses *Helicobacter pylori* in vitro and in vivo. *Helicobacter* 9, 429-435.
- Hoffmann, T., Bremer, E., 2011. Protection of *Bacillus subtilis* against Cold Stress via Compatible-Solute Acquisition. *Journal of Bacteriology* 193, 1552-1562.
- Hoton, F., Andrup, L., Swiecicka, I., Mahillon, J., 2005. The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiology* 151, 2121 - 2124.
- Hoton, F., Fornelos, N., N'Guessan, E., Hu, X., Swiecicka, I., Dierick, K., Jaaskelainen, E., Salkinoja-Salonen, M., Mahillon, J., 2009. Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* cereulide-producing strains. *Environ Microbiol Rep* 1, 177 - 183.
- Hunger, K., Beckering, C.L., Wiegeshoff, F., Graumann, P.L., Marahiel, M.A., 2006. Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 188, 240-248.
- Ined, https://www.ined.fr/fr/tout-savoir-population/graphiques-cartes/population_graphiques/.
- Insee, 2011. Tableaux de l'économie française - Population par âge. insee TEF.

- InVS, 2012. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives, Données de la déclaration obligatoire. Institut de veille sanitaire.
- InVS, 2013. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives, Données de la déclaration obligatoire. Institut de veille sanitaire.
- InVS, 2014. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives, Données de la déclaration obligatoire. Institut de veille sanitaire.
- Iost, I., Dreyfus, M., 2006. DEAD-box RNA helicases in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 34, 4189-4197.
- Jaaskelainen, E.L., Haggblom, M.M., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S., 2004. Atmospheric oxygen and other conditions affecting the production of cereulide by *Bacillus cereus* in food. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 75-83.
- Jaquette, C.B., Beuchat, L.R., 1998. Combined effects of pH, nisin, and temperature on growth and survival of psychrotrophic *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.* 61, 563-570.
- Kim, J.W., Samant, S.S., Seo, Y., Seo, H.S., 2015. Variation in saltiness perception of soup with respect to soup serving temperature and consumer dietary habits. *Appetite* 84, 73-78.
- Lanciotti, R., Sinigaglia, M., Gardini, F., Vannini, L., Guerzoni, M.E., 2001. Growth/no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in model systems based on water activity, pH, temperature and ethanol concentration. *Food Microbiol.* 18, 659-668.
- Lapidus, A., Goltsman, E., Auger, S., Galleron, N., Séguens, B., Dossat, C., Land, M.L., Broussolle, V., Brillard, J., Guinebretiere, M.H., Sanchis, V., Nguen-the, C., Lereclus, D., Richardson, P., Wincker, P., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Sorokin, A., 2008. Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chem-Biol. Interact.* 171, 236-249.
- Le Bras, H., 2011. La mondialisation de la recherche - L'évolution de la fécondité en France de 1945 à 2010. Collège de France <http://books.openedition.org/cdf/1544?lang=fr>.
- Le Lay, J., Bahloul, H., Serino, S., Jobin, M., Schmitt, P., 2015. Reducing activity, glucose metabolism and acid tolerance response of *Bacillus cereus* grown at various pH and oxydo-reduction potential levels. *Food Microbiology* 46, 314-321.
- Lechner, S., 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 1373-1382.

- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K.P., Pruss, B.M., Kaplan, T., Wiessner-Gunkel, E., Stewart, G., Scherer, S., 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. System. Bacteriol.* 48, 1373-1382.
- Lee, P.K., Buswell, J.A., Shinagawa, K., 1995. Distribution of toxigenic *Bacillus cereus* in rice samples marketed in Hong-kong. *World J. Microbiol. Biotech.* 11, 696-698.
- Lopez, J.A., Naranjo, J.M., Higueta, J.C., Cubitto, M.A., Cardona, C.A., Villar, M.A., 2012. Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 17, 250-258.
- Lund, T., De Buyser, M.-L., Granum, P.E., 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.* 38, 254-261.
- Lund, T., Granum, P.E., 1996. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiol. Lett.* 141, 151-156.
- Lund, T., Granum, P.E., 1997. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology-Uk* 143, 3329-3336.
- Luu-Thi, H., Khadka, D.B., Michiels, C.W., 2014. Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 189, 183-188.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I., 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int. J. Food Microbiol.* 72, 107-113.
- Mahler, H., Pasi, A., Kramer, J., Schulte, P., Scoging, A., Bar, W., Krahenbuhl, S., 1997. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *N Engl J Med* 336, 1142 - 1148.
- Maladie, L.A., 2010. La iatrogénie médicamenteuse. <http://www.ameli.fr/assures/prevention-sante/la-iatrogenie-medicamenteuse.php>.
- Margulis, L., Jorgensen, J.Z., Dolan, S., Kolchinsky, R., Rainey, F.A., Lo, S.C., 1998. The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 1236-1241.

- Mayr, B., Kaplan, T., Lechner, S., Scherer, S., 1996. Identification and purification of a family of dimeric major cold shock protein homologs from the psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201. *Journal of Bacteriology* 178, 2916-2925.
- Mei, X., Xu, K., Yang, L., Yuan, Z., Mahillon, J., Hu, X., 2014. The genetic diversity of cereulide biosynthesis gene cluster indicates a composite transposon Tn_{ces} in emetic *Bacillus weihenstephanensis*. *BMC Microbiology* 14, 149.
- Melling, J., Capel, B.J., Turnbull, P.C.B., Gilbert, R.J., 1976. Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*. *J. Clin. Pathol.* 29, 938-940.
- Membre, J.M., Amezcuita, A., Bassett, J., Giavedoni, P., Blackburn, C.D., Gorris, L.G.M., 2006. A probabilistic modeling approach in thermal inactivation: Estimation of postprocess *Bacillus cereus* spore prevalence and concentration. *J. Food Prot.* 69, 118-129.
- Messelhauser, U., Kampf, P., Fricker, M., Ehling-Schulz, M., Zucker, R., Wagner, B., Busch, U., Holler, C., 2010. Prevalence of Emetic *Bacillus cereus* in Different Ice Creams in Bavaria. *J. Food Protect.* 73, 395-399.
- Mikkola, R., Saris, N., Grigoriev, P., Andersson, M., Salkinoja-Salonen, M., 1999. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide - the emetic toxin of *B. cereus*. *Eur J Biochem* 263, 112 - 117.
- Ministère de l'agriculture, d.l.a.e.d.l.f., Recueil d'actions pour l'amélioration de l'alimentation en établissements hébergeant des personnes âgées.
- Mortimer, P.R., McCann, G., 1974. Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. *Lancet* 1, 1043-1045.
- Naranjo, M., Denayer, S., Botteldoorn, N., Delbrassinne, L., Veys, J., Waegenaere, J., Sirtaine, N., Driesen, R., Sipido, K., Mahillon, J., Dierick, K., 2011. Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning. *J Clin Microbiol* 49, 4379 - 4381.
- Nguyen, H.T.T., Corry, J.E.L., Miles, C.A., 2006. Heat resistance and mechanism of heat inactivation in thermophilic *campylobacters*. *Appl. Environ. Microb.* 72, 908-913.
- Nguyenthe, C., Lund, B.M., 1991. The lethal effect of carrot on listeria species. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 479-488.
- Nguyenthe, C., Lund, B.M., 1992. An investigation of the antibacterial effect of carrot on *listeria-monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 23-30.

- Noriega, E., Newman, J., Saggars, E., Robertson, J., Laca, A., Diaz, M., Brocklehurst, T.F., 2010. Antilisterial activity of carrots Effect of temperature and properties of different carrot fractions. *Food Res. Int.* 43, 2425-2431.
- Nortje, G.L., Vorster, S.M., Greebe, R.P., Steyn, P.L., 1999. Occurrence of *Bacillus cereus* and *Yersinia enterocolitica* in South African retail meats. *Food Microbiol.* 16, 213-217.
- Nott, K.P., Hall, L.D., Bows, J.R., Hale, M., Patrick, M.L., 2000. MRI phase mapping of temperature distributions induced in food by microwave heating. *Magn. Reson. Imaging* 18, 69-79.
- Obruca, S., Sedlacek, P., Mravec, F., Samek, O., Marova, I., 2016. Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Appl. Microbiol. Biot.* 100, 1365-1376.
- Olmez, H.K., Aran, N., 2005. Modeling the growth kinetics of *Bacillus cereus* as a function of temperature, pH, sodium lactate and sodium chloride concentrations. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 135-143.
- OMS, Vieillissement et qualité de vie - Faits marquants sur le vieillissement. Organisation mondiale de la Santé.
- ONU, Questions thématiques - Personnes âgées.
<http://www.un.org/fr/globalissues/ageing/index.shtml>.
- ONU, 2013. ONU: la population mondiale devrait atteindre 9,6 milliards en 2050. Centre d'actualités de l'ONU.
- Paananen, A., Mikkola, R., Sareneva, T., Matikainen, S., Hess, M., Andersson, M., Julkunen, I., Salkinoja-Salonen, M., Timonen, T., 2002. Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Clin Exp Immunol* 129, 420 - 428.
- Pandiani, F., Brillard, J., Bornard, I., Michaud, C., Chamot, S., Nguyen-the, C., Broussolle, V., 2010. Differential involvement of the five RNA helicases in adaptation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 to low growth temperatures. *Appl Environ Microbiol* 76, 6692-6697.
- Pitchayawasin, S., Kuse, M., Koga, K., Isobe, M., Agata, N., Ohta, M., 2003. Complexation of cyclic dodecadepsipeptide, Cereulide with ammonium salts. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 3507-3512.

- Planchon, S., Dargaignaratz, C., Levy, C., Ginies, C., Broussolle, V., Carlin, F., 2011. Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 degrees C and 30 degrees C display variations in their properties. *Food Microbiol.* 28, 291-297.
- Pujol, L., Kan-King-Yu, D., Le Marc, Y., Johnston, M.D., Rama-Heuzard, F., Guillou, S., McClure, P., Membre, J.M., 2012. Establishing Equivalence for Microbial-Growth-Inhibitory Effects ("Iso-Hurdle Rules") by Analyzing Disparate *Listeria monocytogenes* Data with a Gamma-Type Predictive Model. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1069-1080.
- Robert-Bobée, I., 2006. Projection de la population pour la France métropolitaine à l'horizon 2050. Insee Première n° 1089.
- Ronning, H.T., Asp, T.N., Granum, P.E., 2015. Determination and quantification of the emetic toxin cereulide from *Bacillus cereus* in pasta, rice and cream with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A* 32, 911-921.
- Rosenfeld, E., Duport, C., Zigha, A., Schmitt, P., 2005. Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. *Canadian Journal of Microbiology* 51, 149-158.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P., 1995. Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 610-616.
- Rossvoll, E., Ronning, H.T., Granum, P.E., Moretro, T., Hjerpekkjon, M.R., Langsrud, S., 2014. Toxin production and growth of pathogens subjected to temperature fluctuations simulating consumer handling of cold cuts. *Int. J. Food Microbiol.* 185, 82-92.
- Rufian-Henares, J.A., de la Cueva, S.P., 2009. Antimicrobial Activity of Coffee Melanoidins- A Study of Their Metal-Chelating Properties. *J. Agr. Food Chem.* 57, 432-438.
- Rufian-Henares, J.A., Morales, F.J., 2007. Antimicrobial activity of melanoidins. *J. Food Quality* 30, 160-168.
- Rufian-Henares, J.A., Morales, F.J., 2008. Antimicrobial activity of melanoidins against *Escherichia coli* is mediated by a membrane-damage mechanism. *J. Agr. Food Chem.* 56, 2357-2362.
- Samapundo, S., Everaert, H., Wandutu, J.N., Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Devlieghere, F., 2011. The influence of headspace and dissolved oxygen level on growth and

- haemolytic BL enterotoxin production of a psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* isolate on potato based ready-to-eat food products. Food Microbiol. 28, 298-304.
- Senouci-Rezkallah, K., Schmitt, P., Jobin, M.P., 2011. Amino acids improve acid tolerance and internal pH maintenance in *Bacillus cereus* ATCC14579 strain. Food Microbiol. 28, 364-372.
- Shinagawa, K., Ueno, Y., Hu, D.L., Ueda, S., Sugii, S., 1996. Mouse lethal activity of a HEp-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. Journal of Veterinary Medical Science 58, 1027-1029.
- Soares, C.M., Kabuki, D.Y., Kuaye, A.Y., 2012. Growth of enterotoxin producing *Bacillus cereus* in meat substrate at 10°C and 30°C. Braz. J. Microbiol. 43, 1401-1405.
- Sonenshein, A.L., 2005. CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 8, 203-207.
- Soria, A.C., Olano, A., Frias, J., Penas, E., Villamiel, M., 2009. 2-Furoylmethyl amino acids, hydroxymethylfurfural, carbohydrates and beta-carotene as quality markers of dehydrated carrots. J. Sci. Food Agr. 89, 267-273.
- 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. Env. Microbiol. 72, 1569-1578.
- Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H., 2000. La composition des aliments-tableaux des valeurs nutritives. Medpharma scientific publishers stuttgart 6^{ème} édition revue et complétée, 660-667.
- Stelder, S.K., Mahmud, S.A., Dekker, H.L., de Koning, L.J., Brul, S., de Koster, C.G., 2015. Temperature Dependence of the Proteome Profile of the Psychrotolerant Pathogenic Food Spoiler *Bacillus weihenstephanensis* Type Strain WSBC 10204. J. Proteom. Res. 14, 2169-2176.
- Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E., 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. Fems Microbiol. Rev. 32, 579-606.

- Sutherland, J.P., Aherne, A., Beaumont, A.L., 1996. Preparation and validation of a growth model for *Bacillus cereus*: the effects of temperature, pH, sodium chloride and carbon dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 359-372.
- Taylor, A.J., Gilbert, R.J., 1975. *Bacillus cereus* food poisoning - provisional serotyping scheme. *J. Med. Microbiol.* 8, 543-550.
- Teplova, V.V., Mikkola, R., Tonshin, A.A., Saris, N.E.L., Salkinoja-Salonen, M.S., 2006. The higher toxicity of cereulide relative to valinomycin is due to its higher affinity for potassium at physiological plasma concentration. *Toxicol Appl Pharm* 210, 39-46.
- Tétart, G., Torny, D., 2009. Ça tue parfois mais ce n'est pas dangereux. *S.A.C Revue d'anthropologie des connaissances* 3.
- Thorsen, L., Budde, B.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, B.B., Koch, A.G., Klingberg, T.D., 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, 172-178.
- 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.
- Trang, V.T., Son, V.H., Thanh, L.X., Sarter, S., Shimamura, T., Uked, H., Takeuchi, H., 2013. Functional Properties of Maillard Reaction Products in Food: Antimicrobial Activity of Aminoreductone against Pathogenic Bacteria. *Food Sci. Technol. Res.* 19, 833-841.
- Trang, V.T., Takeuchi, H., Kudo, H., Aoki, A., Katsuno, S., Shimamura, T., Sugiura, T., Ukeda, H., 2009. Antimicrobial Activity of Aminoreductone against *Helicobacter pylori*. *J. Agr. Food Chem.* 57, 11343-11348.
- Trang, V.T., Takeuchi, H., Kudo, H., Katsuno, S., Shimamura, T., Kashiwagi, T., Son, V.H., Sugiura, T., Ukeda, H., 2011. In Vitro Antimicrobial Activity of Aminoreductone against the Pathogenic Bacteria Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Agr. Food Chem.* 59, 8953-8960.

- Valero, M., Fernández, P.S., Salmerón, M.C., 2003. Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 71-79.
- 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.
- Valero, M., Hernández-Herrero, L.A., Giner, M.J., 2007. Survival, isolation and characterization of a psychrotrophic *Bacillus cereus* strain from a mayonnaise-based ready-to-eat vegetable salad. *Food Microbiol.* 24, 671-677.
- Valero, M., Leontidis, S., Fernández, P.S., Martínez, A., Salmerón, M.C., 2000. Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5–30°C. *Food Microbiol.* 17, 605-612.
- van Asselt, E.D., Zwietering, M.H., 2006. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 107, 73-82.
- van Boekel, M., Fogliano, V., Pellegrini, N., Stanton, C., Scholz, G., Lalljie, S., Somoza, V., Knorr, D., Jasti, P.R., Eisenbrand, G., 2010. A review on the beneficial aspects of food processing. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 1215-1247.
- van Schaik, W., Abee, T., 2005a. The role of sigma(B) in the stress response of Gram-positive bacteria - targets for food preservation and safety. *Current Opinion in Biotechnology* 16, 218-224.
- van Schaik, W., Tempelaars, M.H., Wouters, J.A., de Vos, W.M., Abee, T., 2004a. The alternative sigma factor sigma(B) of *Bacillus cereus*: Response to stress and role in heat adaptation. *Journal of Bacteriology* 186, 316-325.
- van Schaik, W., Tempelaars, M.H., Zwietering, M.H., de Vos, W.M., Abee, T., 2005. Analysis of the role of RsbV, RsbW, and RsbY in regulating sigma(B) activity in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* 187, 5846-5851.
- van Schaik, W., van der Voort, M., Molenaar, D., Moezelaar, R., de Vos, W.M., Abee, T., 2007. Identification of the sigma(B) regulon of *Bacillus cereus* and conservation of sigma(B)-regulated genes in low-GC-content gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* 189, 4384-4390.

- van Schaik, W., Zwietering, M.H., de Vos, W.M., Abee, T., 2004. Identification of sigma(B)-dependent genes in *Bacillus cereus* by proteome and in vitro transcription analysis. *Journal of Bacteriology* 186, 4100-4109.
- Vilas-Boas, G., Sanchis, V., Lereclus, D., Lemos, M.V.F., Bourguet, D., 2002. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Env. Microbiol.* 68, 1414-1424.
- Wang, Q., Yu, H.M., Xia, Y.Z., Kang, Z., Qi, Q.S., 2009. Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application. *Microb. Cell Fact.* 8.
- Wellner, A., Huettl, C., Henle, T., 2011. Formation of Maillard Reaction Products during Heat Treatment of Carrots. *J. Agri. Food Chem.* 59, 7992-7998.
- Wells-Bennik, M.H.J., Eijlander, R.T., den Besten, H.M.W., Berendsen, E.M., Warda, A.K., Krawczyk, A.O., Groot, M.N.N., Xiao, Y.H., Zwietering, M.H., Kuipers, O.P., Abee, T., 2016. Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth, in: Doyle, M.P., Klaenhammer, T.R. (Eds.), *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 7. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 457-482.
- Wong, H.C., Chang, M.H., Fan, J.Y., 1988. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy-products. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 699-702.
- Wu, D.D., He, J., Gong, Y.H., Chen, D.J., Zhu, X.L., Qiu, N., Sun, M., Li, M.S., Yu, Z.N., 2011. Proteomic analysis reveals the strategies of *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 for survival under long-term heat stress. *Proteomics* 11, 2580-2591.
- Zhao, Y.H., Li, H.M., Qin, L.F., Wang, H.H., Chen, G.Q., 2007. Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 276, 34-41.
- Zigha, A., Rosenfeld, E., Schmitt, P., Duport, C., 2007. The redox regulator *fnr* is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. *Journal of Bacteriology* 189, 2813-2824.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Vantriet, K., 1990. Modeling of the bacterial-growth curve. *Appl. Environ. Microb.* 56, 1875-1881.

**Chapitre 10 :
Valorisations des travaux**

10. Chapitre 10 : Valorisations des travaux

10.1. Publication acceptée

1. Alizée Guérin, Claire Dargaignaratz, Véronique Broussolle, Thierry Clavel and Christophe Nguyen-the. **Combined effect of anaerobiosis, low pH and cold temperatures on the growth capacities of psychrotrophic *Bacillus cereus***. Food Microbiology 2016, 59, 119-123.

10.2. Publications soumises et en preparations

1. Alizée Guérin, Claire Dargaignaratz, Véronique Broussolle, Thierry Clavel and Christophe Nguyen-the. **The fate of *Bacillus weihenstephanensis* in carrot broth: impact of temperature and oxygen**. En preparation
2. Alizée Guérin, Helene Thorsen Rønning, Claire Dargaignaratz, Thierry Clavel, Véronique Broussolle, Jacques Mahillon, Per Einar Granum and Christophe Nguyen-the. **Cereulide production by *Bacillus weihenstephanensis* during growth at different temperatures and pH**. En preparation
3. Alizée Guérin, Claire Dargaignaratz, Thierry Clavel, Véronique Broussolle, Christophe Nguyen-the. **Heat-resistance of psychrotolerant *Bacillus cereus* vegetative cells**. Publication acceptée sous réserve de révision dans Food Microbiology

10.3. Communications orales

1. Alizée Guérin, Véronique Broussolle, Thierry Clavel and Christophe Nguyen-the. **Impact of temperature, pH and oxygen on fate of *Bacillus cereus* vegetative cells. Consequences on the safety of the new food products for elderly**. OPTIFEL Meeting WP4 – Task 4.3 Microbial safety. (2014), Hämeenlinna, Finlande.
2. Alizée Guérin, Véronique Broussolle, Thierry Clavel and Christophe Nguyen-the. **Impact of temperature, pH and oxygen on fate of *Bacillus cereus* vegetative**

- cells. **Consequences on the safety of the new food products for elderly.** OPTIFEL Meeting WP4 – Task 4.3 Microbial safety. (2015), Paris, France.
3. Alizée Guérin, Véronique Broussolle, Thierry Clavel and Christophe Nguyen-the. **The combined effect of cold temperature, anaerobiosis, and low pH on the behavior of *Bacillus cereus* strains Group VI (*Bacillus Weihenstephanensis*).** Colloque Bactéries Sporulantes Pathogènes ou d'Intérêt Technologique (BSPIT). (2015), Paris, France.
 4. Alizée Guérin, Véronique Broussolle, Thierry Clavel and Christophe Nguyen-the. **Impact of temperature, pH and oxygen on fate of *Bacillus cereus* vegetative cells. Consequences on the safety of the new food products for elderly.** OPTIFEL Meeting WP4 – Task 4.3 Microbial safety. (2016), Monells, Espagne.
 5. Alizée Guérin, Véronique Broussolle, Thierry Clavel and Christophe Nguyen-the. **Behaviour of psychrotrophic *Bacillus cereus* during the life cycle of food products for elderly people.** International Association for Food Protection (IAFP) European symposium on food safety. (2016), Athènes, Grèce.
 6. Alizée Guérin, Véronique Broussolle, Thierry Clavel and Christophe Nguyen-the. **Behaviour of psychrotrophic *Bacillus cereus* during the life cycle of food products for elderly people.** Journée de l'école doctorale GAIA filière APAB. (2016), Montpellier, France.

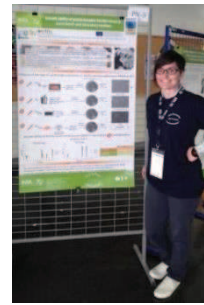
10.4. Posters

1. Alizée Guérin, Claire Dargaignaratz, Véronique Broussolle, Thierry Clavel and Christophe Nguyen-the. **Impact of temperature, pH and oxygen on fate of *Bacillus cereus* vegetative cells. Consequences on the safety of the new food products for elderly.** Food Micro. (2014), Nantes, France.
2. Alizée Guérin, Claire Dargaignaratz, Véronique Broussolle, Thierry Clavel and Christophe Nguyen-the. **Impact of temperature, pH and oxygen on fate of *Bacillus cereus* vegetative cells. Consequences on the safety of the new food**

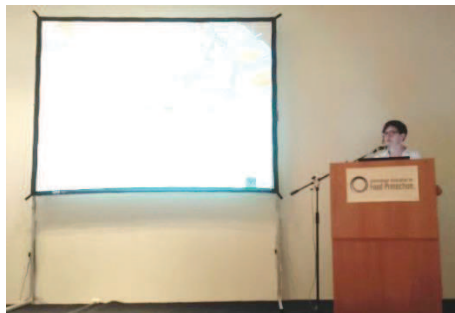
- products for elderly.** Journée de l'école doctorale SP-SA. (2015), Montpellier, France.
3. Alizée Guérin, Claire Dargaignaratz, Véronique Broussolle, Thierry Clavel and Christophe Nguyen-the. **Growth ability of psychrotrophic *Bacillus cereus* in carrot broth and laboratory medium.** Fruit and Veg Processing. (2016), Avignon, France.
 4. Alizée Guérin, Claire Dargaignaratz, Véronique Broussolle, Thierry Clavel and Christophe Nguyen-the. **Heat-resistance of psychrotolerant *Bacillus cereus* vegetative cells.** Food Micro. (2016), Dublin, Irlande.



BSPIT (2015) Paris



Fruit & Veg (2015) Avignon



IAFP (2016) Athènes



Food Micro (2016) Dublin



Title :

Behavior of the pathogenic bacterium *Bacillus cereus* in ready for use food - Impact of the physico-chemical conditions

Abstract :

Elderlies are often victims of undernutrition which can lead to multiple health damages. Prevention of this state of undernutrition is one of the main concerns of health authorities. With this objective, the OPTIFEL project designed new optimized foodstuffs, to improve foods for elderlies, by taking into account their needs and wishes, while preserving their safety. *Bacillus cereus* is a spore-forming bacterial pathogen able to grow in various conditions as low temperature, absence of oxygen, low pH and in different types of food. It is one of the main causes of foodborne outbreaks, particularly in socio-medical institutions. The aim of this work was to determine the behavior of *B. cereus* at different steps of the life of the food product. Cold storage can allow multiplication of psychrotolerant *B. cereus* strains that can represent a risk of infection for consumers. Anaerobic conditions reduce the adaptation capacity of *B. cereus* at low temperature and low pH. The composition and the preparation of the food product also influence the behavior of *B. cereus*, as we showed with carrot broth in which oxygen created a lethal effect for the bacterium. Certain psychrotolerant *B. cereus* strains are able to produce an emetic toxin named cereulide. We showed that this production starts at 8 °C and can reach at 10 °C concentrations sufficient to cause intoxications. If this toxin is produced in food, it would not be destroyed during the food preparation. In contrast, vegetative cells of *B. cereus* are very heat-sensitive and those who would have been able to develop could be destroyed by a reheating of the food product before its consumption. This work allowed the identification of important parameters to limit the risk of foodborne disease by *B. cereus*.

Keywords :

Bacillus cereus, cold, oxygen, pH, carrot, cereulide, heat-resistance

Titre :

Comportement de la bactérie pathogène *Bacillus cereus* dans des aliments prêts à l'emploi - Impact des conditions physico-chimiques

Résumé :

Les personnes âgées sont souvent victimes de dénutrition pouvant conduire à de multiples dégradations de la santé. La prévention de cet état de dénutrition est une des principales préoccupations des autorités de santé. C'est dans cet objectif que le projet OPTIFEL a conçu de nouveaux produits alimentaires optimisés, afin d'améliorer l'alimentation des personnes âgées, en tenant compte de leurs besoins et souhaits, tout en préservant leur sécurité sanitaire. *Bacillus cereus* est une bactérie pathogène sporulée capable de se développer dans des conditions variables comme le froid, l'absence d'oxygène, des bas pH ainsi que des matrices alimentaires diverses. Elle est l'une des principales causes de Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC) surtout en Institut Médico-Sociaux (IMS). Ce travail de thèse avait donc pour objectif de déterminer le comportement de *B. cereus* à différentes étapes de la vie d'un produit alimentaire. La conservation au froid peut permettre la multiplication de souches psychrotolérantes de *B. cereus* qui peuvent alors représenter un risque d'infection pour le consommateur. Les conditions anaérobies réduisent la capacité d'adaptation de *B. cereus* au froid et aux bas pH. La composition de l'aliment et sa préparation influence également le comportement de *B. cereus*, comme nous l'avons constaté avec un bouillon de carotte dans lequel la présence d'oxygène crée un effet létal pour la bactérie. Certaines souches psychrotolérantes de *B. cereus* sont capables de produire de la toxine émétique appelée céréulide. Nous avons montré que cette production peut se faire à partir de 8°C et atteindre des concentrations pouvant causer des intoxications à partir de 10°C. S'il est produit dans l'aliment, le céréulide ne serait pas détruit lors de la préparation de l'aliment. Par contre les cellules végétatives de *B. cereus* sont très thermosensibles et celles qui auraient pu se développer pourront être détruites par un réchauffage du produit avant sa consommation. Ce travail a permis de définir les paramètres importants pour limiter le risque d'infection alimentaire par *B. cereus*.

Mots clefs :

Bacillus cereus, froid, oxygène, pH, carotte, céréulide, thermo-résistance