

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة باجي مختار - عنابة



Badji Mokhtar – Annaba
University

Université Badji Mokhtar
Annaba

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THESE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de
DOCTORAT EN SCIENCES

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

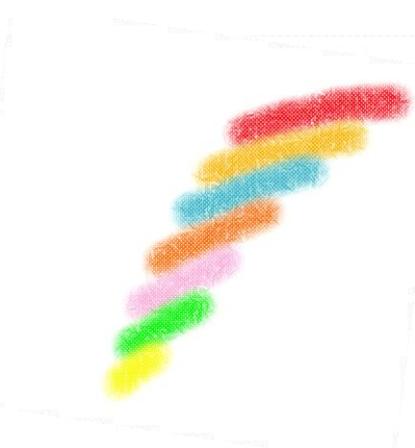
*Les bactéries du « groupe Bacillus cereus »
dans les conserves à pH peu acide (petits pois) :
détection, caractérisation par méthode
probabiliste numérisée, moléculaire
et antibiorésistance*

Présentée par : M^{me} GUECH FAFFANI épouse LAMARI

Évaluée par le Jury

Président	M ^r DJERIBI RIAD	Pr	Univ. Badji Mokhtar-ANNABA
Rapporteur	M ^{me} GACEMI KIRANE DJAMILA	Pr	Univ. Badji Mokhtar-ANNABA
Examineur	M ^r BENOURETH DJAMEL EDDINE	Pr	Univ. 08 Mai 1945 - GUELMA
Examineur	M ^r HOUHAMDI MOUSSA	Pr	Univ. 08 Mai 1945 - GUELMA

Année 2014-2015



DEDICACES

A ceux qui me sont chers...

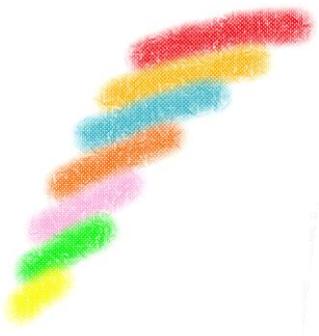
A mes défunts parents

A ceux qui m'ont quittée très tôt :

Mon beau frère M^r M.Souici et Tonton MD.Aissat

Merci pour tout ce que vous aviez fait pour moi !!!!

Que DIEU ait votre âme et que le Paradis soit votre demeure éternelle.



REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail qui a été réalisé au laboratoire de Microbiologie de l'Institut de Biochimie à l'Université d'Annaba et à l'Institut Pasteur de Lille (Caractérisation moléculaire), je tiens à remercier le professeur Nelly Cochet, Professeur à L'UTC de Compiègne, pour l'intérêt qu'elle a porté pour la thématique de ma thèse ainsi que M^{me} Frédérique DE MATOS pour son aide précieuse pour la réalisation du séquençage de ma souche.

Toute ma reconnaissance va à M^{me} D.Kirane Gacemi, Professeur à l'Université d'Annaba. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude, pour m'avoir inlassablement encouragée, soutenue moralement et aidée tout au long de la réalisation de mon travail. Pour cela, je la remercie sincèrement et lui exprime tout mon respect.

Je remercie vivement M^r R.Djéribi, Professeur à l'Université d'Annaba pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de soutenance. Je remercie également M^{me} B.Djaghri, Professeur à L'E.N.S.S.M.AL d'Alger, M^r DE.Benouareth, Professeur à l'Université de Guelma pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à mon travail en acceptant la lourde charge d'examineurs.

Un remerciement spécial est aussi adressé à M^r et Mme D.MESLATI Professeurs à l'Université d'Annaba (Département d'Informatique) pour leur extrême gentillesse, leur disponibilité et leur abnégation.

Toute ma sympathie va à l'équipe technique du laboratoire de Microbiologie, en particulier M^{me} S.HACHELFI, qui a toujours répondu à mes appels. Qu'elle trouve ici l'expression de toute mon estime.

Merci à tous de m'avoir soutenue jusqu'à l'aboutissement de cette thèse, j'espère être là pour vous comme vous l'aviez été pour moi.

Je fais partie des personnes qui croient mordicus qu'il n'y a de force, ni de puissance que par DIEU le tout puissant. Cela étant, je commence par le remercier d'avoir eu la bonté de m'entourer de personnes formidables dans le moment le douloureux de ma vie.

C'est par une haute gratitude et reconnaissance, que j'adresse à travers cette thèse mes vifs remerciements à tous ceux qui, de près ou de loin m'ont aidée à vaincre ma maladie. Je cite d'abord ma petite sœur, ma grande fille et mon amie M^{me} GACEMI KIRANE Djamilia et les Professeurs A.Bendib, chef de service sénologie (CPMC Mustapha Bacha - Alger) et A. Kadi, Ex Recteur de l'Université Badji Mokhtar et chef du service urologie du CHU d'Annaba.

Toute ma famille, sans oublier mes deux petits cœurs Ines et Adel (Tata Vani) ainsi que leur douce et tendre maman Ghano, son époux Tarik et sa belle famille. Merci Sonia pour ta gentillesse, ta sympathie et ta sagesse. Je ne peux oublier ceux qui m'ont aussi tendu la main à Alger et Blida. Je commencerai, par le Docteur N.Benachenhou, le Docteur A.Boughazi, le Docteur MD.Birem (mon neveu et fils), le Docteur M.Moussaoui, Président de l'Association EL BADR ainsi que les anges gardiens de Dar El Ihssene dont mon frère Réda, ma sœur Salima et la respectable Madame A. Berkani.

Merci Docteur F. Abbassi pour votre accueil très chaleureux et votre humanité, au sein du service de Radiothérapie de la clinique saint Jean de Melun - France.

Mme F. Boulares, vous êtes une vraie amie, disons une sœur et vous le serez toujours !

Ma reconnaissance, va à ceux qui ont particulièrement assuré le soutien affectif de ce travail doctoral. Par là, je remercie toute ma famille pour son irremplaçable et inconditionnel soutien. Cette thèse est un peu la leur.

Les mots me manquent pour remercier à sa juste valeur, mon époux pour sa patience et son soutien psychologique indéfectible au travers des aléas de ma vie.

Merci à mes grands garçons et à mes sœurs d'avoir toujours été à mes côtés.

Merci à toutes mes nièces et tous mes neveux.

Résumé

La conservation des aliments est un combat constant contre les micro-organismes d'altération et/ou les pathogènes de l'Homme. Ces bactéries sont à haut potentiel de résistance, parmi elles, certaines sont responsables d'intoxications alimentaires.

L'objectif de notre travail est de vérifier la qualité hygiénique et marchande de dix lots constitués, chacun, de cinq boîtes de conserves de petits pois importés, normales et identiques entre elles.

Toutes ces boîtes ont subi, dans un premier temps, un test de stabilité suivi d'un contrôle de stérilité. Ce dernier a été complété par une analyse microbiologique classique pour la mise en culture de tous les types morphologiques observés au cours du contrôle de stabilité. L'observation d'une microflore très abondante et variée sans modifications apparentes du produit, a caractérisé le test de stabilité.

Les résultats de ce contrôle, ajoutés à ceux de la mise en culture et de la confirmation de la sporulation, nous ont orientés vers le profil des *Bacillus*. Une microflore peuplée, en partie, d'espèces plus ou moins toxigènes, a été mise en évidence grâce à une identification biochimique par API 20E en utilisant une méthode probabiliste numérisée et une recherche de tests complémentaires tels que la lécithinase, la caséinase et l'amylase.

Parmi les espèces caractérisées figurent principalement *B. cereus* (42,50%) sous trois profils différents, *B. megaterium* (30,40%), *B. mycoides* (10,73%), *B. sphaericus* (7,24%), *B. pumilus* (4,60%) et *Brevibacillus brevis* (4,53%).

Les trois profils de *B. cereus* obtenus précédemment ont été confirmés par une identification complémentaire par API 50CHB, en utilisant également une méthode probabiliste numérisée. Le séquençage de l'ADNr 16S d'un des profils biochimiques obtenus par API 20E et API 50CHB a montré une affiliation au groupe *B. cereus* avec un pourcentage de similarité de 99%.

Le niveau moyen de contamination des boîtes de conserves à l'étude par les bactéries du groupe *B. cereus* dont *Bacillus cereus* est de $2,7 \cdot 10^4$ UFC par gramme de produit. Ce taux est voisin du seuil requis pour l'apparition du risque de toxi-infection alimentaire.

Les isolats du groupe *Bacillus cereus* confirmé par méthode moléculaire ont montré une multirésistance, à des degrés variables, vis-à-vis de la plupart des antibiotiques utilisés tels que la pénicilline, l'ampicilline, la colistine, le triméthoprime, l'amoxicilline, la clindamycine, l'érythromycine et la tétracycline.

Mots clés : Conserves végétales, petits pois, bactéries sporulées, identification probabiliste numérisée, identification moléculaire, prévalence, antibiorésistance.

Abstract

Food preservation is a constant battle against weathering microorganisms and/or human pathogens. These bacteria are high resistance potential, among them, some are responsible for food poisoning.

The aim of our work is to check the hygienic and marketable quality of ten packs, each composed of five normal and identical cans of imported peas. These cans were submitted, in a first step, to a stability test followed by a sterility control. The latter was supplemented by a conventional microbiological analysis for the cultivation of all morphological types observed during the stability control. The observation of a very large and varied microflora without apparent changes to the product, characterized the stability test.

The results of this control, added to those of the cultivation and sporulation confirmation, directed us to the profile of *Bacillus*. A microflora partially populated by more or less toxigenic species, has been shown through biochemical identification by API 20E using a digitized probabilistic method and a search for additional tests such as lecithinase, caseinase and amylase.

Among the characterized species, we can find mainly *B. cereus* (42.50%) under three different profiles, *B. megaterium* (30.40%), *B. mycoides* (10.73%), *B. sphaericus* (7.24%) *B. pumilus* (4.60%) and *Brevibacillus brevis* (4.53%).

The three profiles of *B. cereus* obtained previously were confirmed by an additional identification with API 50CHB, also using a digitized probabilistic method. 16S rDNA sequencing of one of the biochemical profiles obtained with API 20E and API 50CHB showed *B. cereus* group membership with a similarity percentage of 99%.

The contamination average level of cans under consideration by the bacteria of *B. cereus* group including *Bacillus cereus* is $2,7 \cdot 10^4$ CFU per gram of product. This rate is close to the required threshold for the food poisoning risk occurrence.

Isolates of *Bacillus cereus* group confirmed by molecular method showed, at variable degrees, a multi-resistance towards the majority of used antibiotics such as penicillin, ampicillin, colistin, trimethoprim, amoxicillin, clindamycin, erythromycin and tetracycline.

Keywords : Canned vegetables, peas, spore-forming bacteria, digitized probabilistic identification, molecular identification, prevalence, antibiotic resistance.

ملخص

حفظ الأغذية هو معركة مستمرة ضد الكائنات المجهرية المتسببة في التلف و/أو الكائنات الممرضة للإنسان. هذه البكتيريا لها قدرة عالية على المقاومة، وبعضها مسؤولة عن التسمم الغذائي.

الهدف من عملنا هو التحقق من النوعية الصحية و التسويقية لعشر مجموعات تتألف كل منها من خمس علب عادية و متشابهة فيما بينها من البازلاء المعلبة المستوردة. جميع هذه العلب تعرضت، كخطوة اولي، الي اختبار الاستقرار تلاه اختبار العقم. واستكمل هذا الأخير بتحليل ميكروبيولوجي تقليدي لزرع جميع الأنواع المورفولوجية التي لوحظت في اختبار الاستقرار. تميز هذا الأخير بظهور نباتات دقيقة وفيرة و متنوعة دون تغيرات واضحة للمنتج.

نتائج هذا الفحص إضافة الي تلك المتعلقة بالزرع و تأكيد التبوغ وجهتنا بصفة عامة نحو مظهر العصيات *Bacillus*. وقد برزت ميكروفلورا مأهولة جزئيا بأنواع سامة من خلال التحديد البيوكيميائي بواسطة API 20E باستخدام الطريقة الاحتمالية العددية والبحث عن اختبارات إضافية مثل *caséinase* و *amylase*.

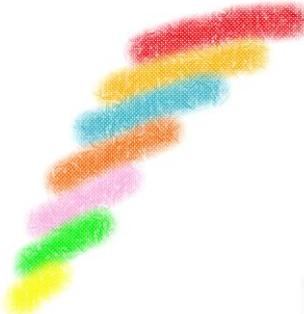
ومن بين الأنواع المدرجة نميز أساسا *B. cereus* (42,50%) تحت ثلاثة ملامح مختلفة، *B. megaterium* (30,40%) *B. mycoides* (10,73%) *B. sphaericus* (7,24%) *B. pumilus* (4,60%) *Brevibacillus brevis* (4,53%)

تم تأكيد الملامح الثلاثة لـ *B. cereus* المتحصل عليها سابقا بواسطة التحديد البيوكيميائي الاضافي API 50CHB باستخدام الطريقة الاحتمالية العددية أيضا. أظهر تسلسل ADNr 16S للملامح البيوكيميائية التي تم الحصول عليها مع API 20E و API 50CHB العضوية للمجموعة *B. cereus* مع تشابه يقدر بـ 99%.

المستوى المتوسط من التلوث للعلب قيد النظر من قبل البكتيريا من مجموعة *B. cereus* بما في ذلك *Bacillus cereus* هو $2,7 \cdot 10^4$ UFC لكل غرام من المنتج. هذا المعدل قريب من الحد الأدنى المطلوب لحدوث خطر التسمم الغذائي.

أظهرت العزلات من مجموعة *B. cereus* المؤكدة بطريقة جزئية، مقاومة تعددية بدرجات متفاوتة، تجاه المضادات الحيوية الأكثر استخداما مثل البنسلين، الأميسيلين، كوليستين، تريميثوبريم، الأموكسيسيلين، الكليندامايسين، الإريثروميسين والتتراسيكلين.

الكلمات الرئيسية: معلبات الخضار، البازلاء، البكتيريا المكونة للبوغ، التحديد الاحتمالي العددي، التحديد الجزئي، الانتشار، مقاومة المضادات الحيوية.



SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	4
1. Les <i>Bacillus</i>	4
1.1. Nomenclature	4
1.2. Caractères généraux	6
1.3. Contamination des aliments: les réservoirs	6
1.4. Altérations des aliments	9
2. Le « groupe <i>Bacillus cereus</i> »	11
2.1. Les taxons du « groupe <i>Bacillus cereus</i> »	12
2.2. Caractères généraux	13
2.3. Diversité écologique	15
2.4. Phylogénie	18
3. <i>Bacillus cereus</i>: pathogène alimentaire	19
3.1. Caractéristiques	19
3.2. Historique	20
3.3. Définition d'une toxi-infection alimentaire	21
3.4. Atteintes gastro-intestinales	22
3.4.1. Syndrome diarrhéique	23
3.4.2. Syndrome émétique	25
3.5. Autres pathologies	26
3.6. Dmi ou dose réponse	28
4. <i>Bacillus cereus</i> : source de problèmes dans les industries agroalimentaires	28
5. Les conserves	31
5.1. Dangers microbiens : les spores bactériennes	31
5.1.1. Caractères généraux	31
5.1.2. Composition des spores	32
5.1.2.1. La sporulation	32
5.1.2.2. Structures impliquées dans la résistance des spores	33
5.2. Maîtrise des dangers microbiens: traitement thermique d'appertisation	35
5.2.1. Principe	35
5.2.2. Efficacité	35
5.2.3. Quantification	37
5.2.3.1. Nombre n de réductions décimales	37
5.2.3.2. Notion de valeur stérilisatrice (f)	37
5.2.3.3. Relation avec la durée de réduction décimale :	37
5.3. Effet du pH sur la thermorésistance	38
CHAPITRE 2 : ANALYSE REGLEMENTAIRE DES CONSERVES VEGETALES A L'ETUDE	40
1. Contrôle de stabilité : Norme AFNOR NF V 08-401	40
1.1. Introduction	40
1.2. Echantillonnage : choix des individus	41
1.3. Principe du contrôle	41
1.4. Méthodologie	42

1.4.1. Examen préliminaire	42
1.4.2. Incubation	42
1.4.3. Examen après incubation	43
1.4.3.1. Aspect extérieur des boîtes	43
1.4.3.2. Examen du produit	43
1.4.4. Interprétation des résultats	44
2. Contrôle de stérilité commerciale ou industrielle	44
2.1. Introduction	44
2.2. Méthodologie	44
2.3. Conclusion d'analyses	44
3. Résultats	45
3.1. Contrôle de stabilité	45
3.2. Contrôle de stérilité	45
4. Discussion	45
CHAPITRE 3 : ANALYSE MICROBIOLOGIQUE CLASSIQUE	48
1. Introduction	48
2. Préparation de la suspension et mise en culture	48
3. Repiquage et conservation des souches	48
4. Orientation préliminaire en faveur de l'identification du genre des cultures obtenues	49
4.1. Etude des caractères cultureux et mobilité	49
4.2. Etude microscopique	49
4.3. Recherche des enzymes respiratoires et du type respiratoire	49
4.3.1. Recherche de la catalase	49
4.3.2. Recherche de l'oxydase	49
4.3.3. Type respiratoire	50
4.4. Mise en évidence de la sporulation	50
5. Orientation biochimique en faveur de l'identification de l'espèce des cultures isolées	50
5.1. Introduction	50
5.2. Biotypage par microgalerie API 20E	51
5.3. Recherche d'enzymes complémentaires	51
5.3.1. Hydrolyse de la caséine	52
5.3.2. Hydrolyse de la lécithine	52
5.3.3. Hydrolyse de l'amidon	52
5.4. Etude biochimique par microgalerie API 50CHB	52
6. Résultats	53
6.1. Mise en culture et orientation en faveur du genre	53
6.2. Orientation biochimique en faveur de l'espèce des cultures isolées	54
6.2.1. Biotypage par microgalerie API 20E	54
6.2.2. Recherche de caséinase, d'amylase et de lécithinase	61
6.2.3. Biotypage par microgalerie API 50CHB	62
7. Discussion	68
7.1. Orientation des cultures isolées en faveur du genre	68
7.2. Identification des cultures isolées en faveur de l'espèce	69
CHAPITRE 4 : IDENTIFICATION MOLECULAIRE : SEQUENÇAGE DE L'ADNR 16S	73
1. Introduction	73
2. Principe	73

3. Méthodologie	74
4. Résultats et discussion	78
CHAPITRE 5 : DENOMBREMENT DE BACILLUS CEREUS PAR METHODE STANDARDISEE ISO 7932	83
1. Introduction	83
2. Méthodologie	84
2.1. Ensemencement et incubation	84
2.2. Comptage des colonies	85
2.3. Epreuves de confirmation	85
2.3.1. Sélection et purification des colonies	85
2.3.2. Mise en évidence de l'hémolyse	85
2.3.3. Examen de la mobilité	85
2.3.4. Mise en évidence de la croissance rhizoïde	85
2.3.5. Présence de cristaux de toxines protéiques	85
3. Expression des résultats	86
4. Résultats et discussion	86
CHAPITRE 6 : ANTIBIORESISTANCE	89
1. Introduction	89
2. Principe de l'antibiogramme : méthode des disques	89
3. Méthodologie	90
3.1. Réalisation pratique de l'antibiogramme	90
3.2. Lecture et interprétation	90
4. Résultats et discussion	91
CONCLUSION	97
PERSPECTIVES	101
BIBLIOGRAPHIE	103
ANNEXES	124
Annexe 1: Base de données de la galerie API 20E pour les <i>Bacillus</i>	124
Annexe 2: Base de données de la galerie API 50CHB	125

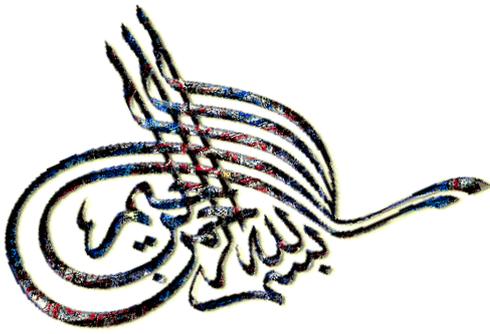
LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Représentation schématique du domaine des eubactéries	4
Figure 1.2. Phylogénie schématique du domaine des eubactéries, fondée sur le séquençage des ARNr 16S	5
Figure 1.3. Modèle de cycles pour <i>Bacillus cereus sensu lato</i>	7
Figure 1.4. Les différentes couches et structures des spores de <i>Bacillus cereus</i> impliquées dans l'adhésion aux surfaces	9
Figure 1.5. Colonies de <i>B.mycooides</i>	12
Figure 1.6. Aspect d'une cellule hyperflagellée de <i>Bacillus cereus</i>	19
Figure 1.7. <i>Bacillus cereus</i> : cellules sporulées sous microscopie optique	19
Figure 1.8. Représentation schématique des infections à <i>B. cereus</i>	21
Figure 1.9. Etapes de la toxi-infection alimentaire due à <i>Bacillus cereus</i> .	25
Figure 1.10. Micrographe d'un biofilm de 6 jours formé par <i>B. cereus</i> sur une surface en inox	29
Figure 1.11 : Les étapes de la sporulation	33
Figure 1.12. Photographie en microscopie électronique d'une spore de <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 produite à 30°C et d'une spore de <i>B. licheniformis</i> AD978 produite à 45°C.	34
Figure 1.13. Structure de l'exosporium de <i>B. cereus</i>	35
Figure 3.1. Culture à contours irréguliers sur gélose caso-agar	53
Figure 3.2. Résultat du test de présomption de la sporulation sur bouillon nutritif.	53
Figure 3.3. Observation microscopique montrant des bacilles sporulés après coloration de Gram	54
Figure 3.4. Pourcentages relatifs d'identification des souches S1, S2, S3, S4	59
Figure 3.5. Pourcentages relatifs d'identification des souches S5, S6, S7, S8	59
Figure 3.6. Fréquence d'apparition des différentes espèces identifiées	60
Figure 3.7. Résultat du test de la lécithinase	61
Figure 3.8. Résultat du test de la caséinase	61
Figure 3.9. Résultat du test de l'amylase	62

Figure 4.1. Principe du séquençage	74
Figure 4.2. Illustration du protocole d'extraction d'ADN avec le Kit « PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent »	75
Figure 4.3. Séquence d'ADNr 16S pour la souche AL1	78
Figure 4.4. Arbre phylogénétique de la souche AL1 : position phylogénétique des séquences d'ADNr 16S	79
Figure 5.1. Colonies de <i>B. cereus</i> ATCC 14579 après 24h d'incubation à 30°C	83
Figure 6.1. Antibiorésistance des souches du groupe <i>Bacillus cereus</i> (AL1) isolées des conserves de petits pois	93
Figure 6.2. Antibiorésistance des souches du groupe <i>Bacillus cereus</i> (AL1) isolées des conserves de petits pois	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Principaux caractères communs et distinctifs des espèces du groupe <i>B. cereus sensu lato</i>	14
Tableau 1.2. Les sept groupes de <i>B. cereus</i>	17
Tableau 1.3. Eléments de diagnostic différentiel	22
Tableau 1.4. Dimensions des spores de bactéries du genre <i>Bacillus</i>	31
Tableau 1.5. Niveaux de thermorésistance approximatifs de cellules végétatives bactériennes	36
Tableau 3.1. Profils biochimiques des souches isolées après 48h d'incubation à 30°C	55
Tableau 3.2. Résultats d'identification biochimique des souches isolées (Souches S1 à S3)	56
Tableau 3.3. Résultats d'identification biochimique des souches isolées (Souches S4 à S6)	57
Tableau 3.4. Résultats d'identification biochimique des souches isolées (Souches S7 à S8)	58
Tableau 3.5. Résultats récapitulatifs d'identification biochimique des souches isolées	60
Tableau 3.6. Correspondance nominative des souches caractérisées par biotypage	62
Tableau 3.7. Profils biochimiques des souches pour identification par API 50CHB	63
Tableau 3.8. Résultats d'identification biochimique de la souche AL1 par API 50CHB	65
Tableau 3.9. Résultats récapitulatifs de l'identification biochimique de la souche AL1	65
Tableau 3.10. Résultats d'identification biochimique de la souche AL2 par API 50 CHB	66
Tableau 3.11. Résultats récapitulatifs de l'identification biochimique de la souche AL2	66
Tableau 3.12. Résultats d'identification biochimique de la souche AL3 par API 50 CHB	67
Tableau 3.13. Résultats récapitulatifs de l'identification biochimique de la souche AL3	67
Tableau 4.1. Conditions PCR pour le couple F1-R1	76
Tableau 4.2. Conditions PCR pour le couple F2-R2	76
Tableau 4.3. Les programmes PCR	77
Tableau 6.1. Diamètres critiques pour les diverses classes d'antibiotiques	91
Tableau 6.2. Antibiorésistance des souches AL1 isolées des conserves de petits pois	92



INTRODUCTION GENERALE

Du temps des premiers pas de l'humanité, le problème de la conservation des denrées alimentaires se posait en termes de survie durant les longues périodes hivernales.

Au cours de son histoire, l'homme mit au point des techniques pour faire face à cette pénurie saisonnière, citons par exemple le séchage, la salaison, le saumurage voire le confisage. Toutes ces techniques, relativement lourdes à mettre en œuvre, induisent une forte altération des qualités nutritives et gustatives des produits traités. De plus, elles ne pouvaient que difficilement dépasser le stade artisanal pour atteindre la production de masse. En 1809, Nicholas Appert révolutionne la conservation en proposant son procédé fondé sur le traitement thermique des aliments enfermés dans des bouteilles en verre hermétiquement scellées. Mais les bouteilles en verre restent fragiles. Ce sont les britanniques qui vont récupérer cette technique et l'adapter en remplaçant les bouteilles par des boîtes métalliques que l'on appelle conserves. Avec l'industrialisation, les conserves sont produites en quantité et se démocratisent.

La qualité des aliments constitue une préoccupation majeure dans notre société de consommation, car toute production industrielle peut présenter des risques. La difficulté d'obtenir la stérilité biologique sans affecter les qualités organoleptiques, fait que de nombreuses conserves ne sont pas à proprement parler stériles. Des spores thermorésistantes peuvent subsister et même être stabilisées par la nature du milieu. Depuis longtemps le coût des produits, leur qualité, mais surtout la sécurité sanitaire des aliments ont été les principaux centres d'intérêt des industriels. A l'heure actuelle, la chaîne alimentaire est devenue plus complexe, multipliant les possibilités de contamination et de développement des agents pathogènes (Codex Alimentarius, 2003).

Les bactéries sporulées occupent une place de premier plan parmi les microorganismes préjudiciables particulièrement à la conserve alimentaire en raison de leur ubiquité et de leur capacité à produire des spores thermo-résistantes qui les rendent particulièrement adaptées aux aliments traités thermiquement. Le danger engendré par ce groupe de bactéries est leur capacité de produire des enzymes ainsi que des toxines susceptibles d'altérer la qualité des produits et d'engendrer des

possibilités d'intoxications alimentaires (Granum *et al.*, 1996). Ces contaminations microbiologiques représentent les risques majeurs sur le plan sanitaire dans les industries agro-alimentaires. Ces industries ont, depuis longtemps, développé des stratégies pour détruire les contaminants sous leur forme végétative mais la maîtrise de la contamination due aux bactéries sporulées demeure un enjeu capital (Tétart et Torny, 2009). La présence des microorganismes sporulés dans les conserves alimentaires ayant subi une stérilisation est décrite de plus en plus fréquemment (ADRIA, 2010).

Les bactéries sporulées les plus rencontrées dans les conserves appartiennent aux genres *Clostridium* et *Bacillus*. Les espèces pathogènes et toxigènes pour l'Homme sont *Cl. perfringens* et *B. cereus* (INRA, 1998).

Bacillus cereus sensu stricto fait partie d'un ensemble d'espèces apparentées, souvent regroupées dans la littérature sous le terme de *Bacillus cereus sensu lato* ou « groupe *Bacillus cereus* ».

Bacillus cereus sensu stricto et, dans une moindre mesure d'autres espèces de *Bacillus*, sont responsables de toxi-infections alimentaires dans le monde, avec 20 à 100 000 cas annuels pour *B. cereus* (INVS, 2004). Ce dernier, peut provoquer des intoxications alimentaires graves avec une mortalité élevée en l'absence d'une prise en charge précoce et adéquate. Les difficultés diagnostiques liées à la méconnaissance de cette bactérie sont responsables de l'évolution fatale de ces intoxications (Tossa *et al.*, 2009). En Algérie, *Bacillus cereus* n'est pas recherché dans les aliments suspects comme d'autres pathogènes, d'autant plus que les symptômes de toxi-infections alimentaires diarrhéiques et émétiques à *Bacillus cereus* sont très proches de ceux provoqués respectivement par *Clostridium perfringens* et *Staphylococcus aureus* (Green *et al.*, 2009).

De ce fait, les intoxications à *Bacillus cereus* n'y sont pas déclarées

Les spores de *Clostridium* et *Bacillus* sont incapables de germer à un pH inférieur à 4.5, ce n'est que pour des produits moins acides que des précautions particulières doivent être prises (Guiraud, 2003). Faisant partie de cette catégorie de produits à risque, les conserves de petits pois ont été choisies pour cette étude du fait de leur pH voisin de 6.2.

L'examen microbiologique est un outil incontournable d'évaluation du niveau de contamination des denrées alimentaires et de la nature de leur flore. L'objectif de ce présent travail, est la recherche et l'identification d'une éventuelle flore sporulée pathogène et /ou d'altération dans les conserves de petits pois de l'importation. Ce

contrôle permettra de vérifier la qualité hygiénique et marchande de ces conserves et, par là même, garantir leur conformité aux normes microbiologiques en vigueur avant leur mise en vente sur le marché national.

La première partie de cette thèse, représentée par le chapitre 1, dresse un état des lieux du sujet au travers d'une introduction bibliographique traitant les éléments suivants :

- Les *Bacillus* : taxonomie et nomenclature, écologie, contaminations et altérations au sein de la matrice alimentaire.
- Le groupe *Bacillus cereus* ou *Bacillus cereus sensu lato* : diversité écologique et phylogénie.
- *Bacillus cereus sensu stricto* : en tant que pathogène alimentaire et problème émergent pour l'industrie agro-alimentaire (biofilms).
- La conserve : dangers (spores) et leur maîtrise (traitement thermique d'Appertisation) ainsi que l'effet du pH sur la thermorésistance.

La deuxième partie, expérimentale, contenant les chapitres 2, 3, 4, 5 et 6, se résume ainsi :

- Une analyse règlementaire des conserves de petits pois a été réalisée en vue de nous assurer de leur conformité.
- Une analyse microbiologique de type classique a suivi la première démarche. L'objectif de cette analyse est qualitatif car elle nous a permis d'identifier les types morphologiques et les cultures obtenues lors du contrôle de stabilité et de stérilité.
- L'exploitation des résultats par méthodes numériques des biotypages effectués par API 20E et API 50CHB nous ont menés vers une flore diversifiée dans le genre *Bacillus* avec prédominance de l'espèce *B. cereus* sous trois profils différents.
- Une identification génomique par séquençage de l'ADNr 16S de l'un des trois profils précités a confirmé l'appartenance de celui-ci au groupe *B. cereus*.
- Une étude quantitative de *Bacillus cereus* a été réalisée par méthode standard suivie de tests de confirmation. Ce travail, s'est terminé par l'étude de l'antibiorésistance de la souche confirmée par méthode moléculaire.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les Bacillus

1.1. Nomenclature

Les bactéries du genre *Bacillus* font partie du domaine (ou empire) des bactéries ou eubactéries (ou Eubacteria) et du phylum (ou division) des firmicutes (Euzéby, 2002) aussi dénommées bactéries à bas G + C % et à coloration de Gram positive (Larpent, 2000), ce qui correspond à une branche des eubactéries (Figure 1.1).

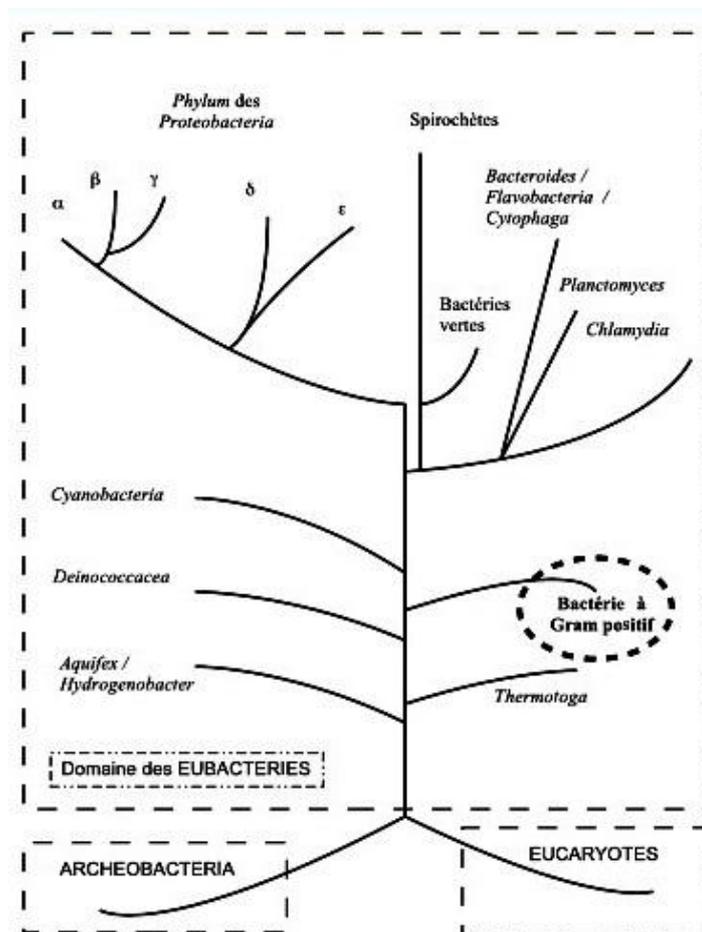


Figure 1.1. Représentation schématique du domaine des eubactéries (Larpent, 2000).

La nomenclature phylogénique de certaines des bactéries à bas à bas G + C % et à coloration de Gram positive, dont *B. cereus* est représentée dans la Figure 1.2 à côté des représentants majeurs des eubactéries (Larpent, 2000).

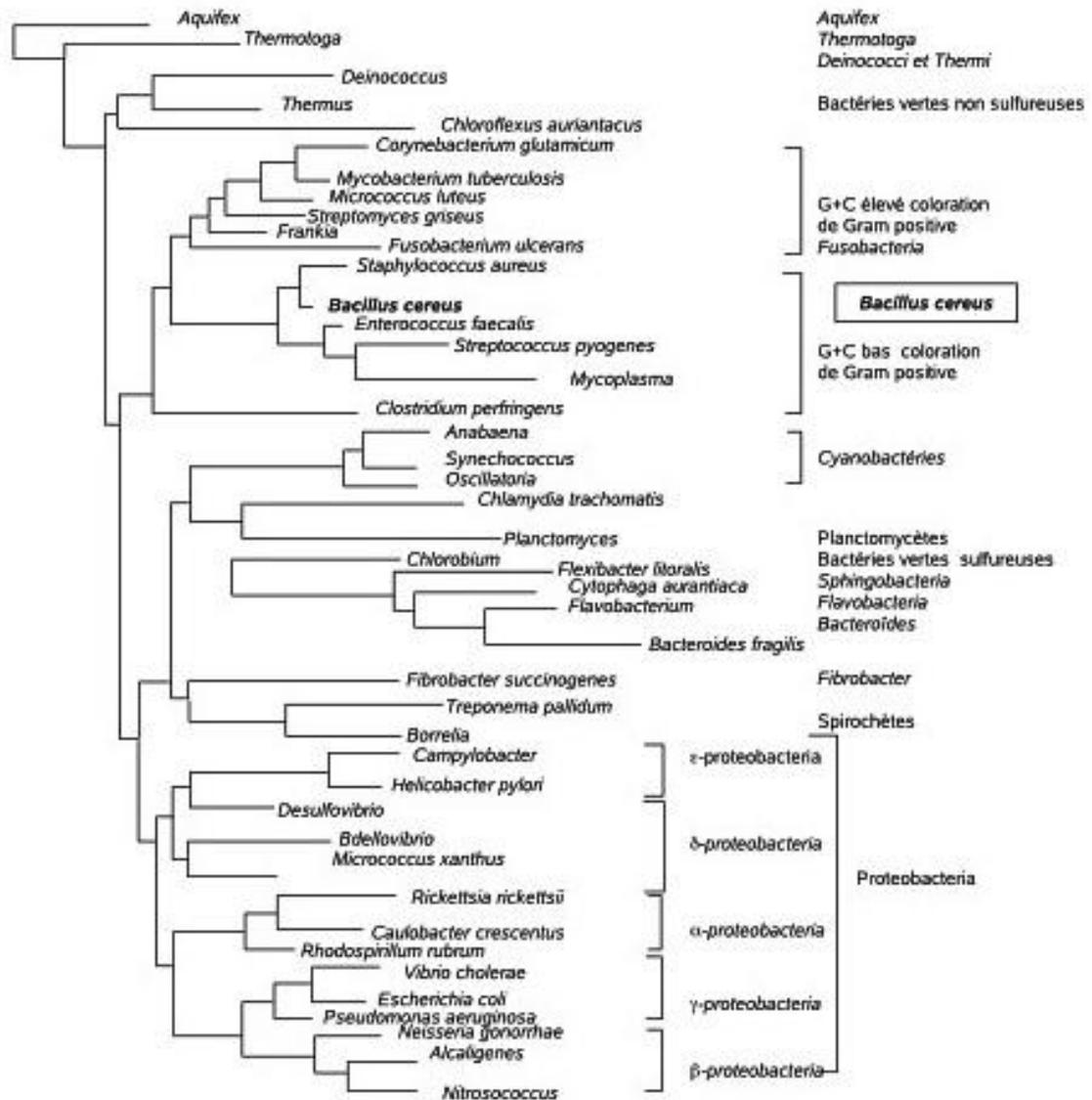


Figure 1.2. Phylogénie schématique du domaine des eubactéries, fondée sur le séquençage des ARNr 16S (Larpent, 2000).

Le genre *Bacillus* est un genre bactérien particulièrement hétérogène.

L'hétérogénéité extrême du genre est reflétée par la grande variété de places écologiques que les nombreuses espèces occupent, et par l'extrême diversité de leurs statuts taxonomiques.

Cette extrême hétérogénéité des *Bacillus* est également à l'origine des remaniements profonds qui ont marqué la classification du genre depuis sa création à ce jour.

Nombreux sont les chercheurs qui proposèrent la subdivision du genre en six genres différents (Forsyth *et al.*, 1998; Priest *et al.*, 2004), mais celui-ci demeura intact jusqu'en 2004, date à laquelle il fut scindé en plusieurs familles et genres de bactéries formant des endospores (Fritze, 2004; Todar, 2008).

Toutefois, malgré cette réorganisation et la description de nouveaux taxons (Coorevits *et al.*, 2012 ; Jung *et al.*, 2011), *Bacillus sensu stricto* demeure le genre le plus important de la famille des Bacillaceae avec plus de 60 espèces bien définies sur le plan taxonomique (Todar, 2008).

1.2. Caractères généraux

Ce sont des bacilles à coloration de Gram positive, ou à coloration de Gram variable.

Les dimensions des cellules végétatives vont de 0,5 µm par 1,2 µm à 2,5 µm par 10 µm de diamètre.

Ce sont des **bactéries sporulées** (Drobniewski, 1993).

La teneur en G + C de l'ADN des espèces peut varier de 32 à 69 %, ce qui est beaucoup plus large que ce que l'on considère comme raisonnable pour la définition d'un genre (TSCA, 1997).

Le genre *Bacillus* a été créé en 1872 par Ferdinand Cohn qui décrit *B. subtilis* comme espèce type. Quinze années plus tard (1887), Frankland isole une nouvelle espèce, *B. cereus* à partir de l'air d'une étable au Royaume-Uni (Frankland et Frankland, 1887). La bactérie isolée est la souche type de *B. cereus* : ATCC 14579. En 1955, Steinar Hauge est le premier à prouver l'implication de *B. cereus* dans des toxi-infections alimentaires (Hauge, 1955). C'est en 1975 que la souche diarrhéique F4430/73 de *B. cereus* a été isolée à partir d'une soupe de pois (Spira et Geopfert, 1975).

1.3. Contamination des aliments : Les réservoirs

B. cereus est très répandu dans l'environnement. Il abonde dans la nature et est capable de survivre et de se développer dans une multitude d'environnements, notamment dans le sol, la poussière aéroportée, l'eau, les sédiments ou les végétaux et les matières en décomposition. (Logan et De Vos, 2009; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

Les souches de l'environnement et des légumes montrent une grande diversité, contrairement aux souches de produits alimentaires chauffés et déshydratés, comme des protéines du lait déshydratées ou de l'amidon.

Le sol et les légumes sont des environnements favorables aux activités métaboliques, et au transfert de matériel génétique entre les souches, ce qui expliquerait la diversité des souches de l'environnement (Nauta *et al.*, 2003).

Le climat influence vraisemblablement la population de *Bacillus cereus* dans le sol (EFSA, 2005) les souches psychotropes étant plus fréquentes dans le sol des régions froides.

Il existe pour les bactéries du groupe *Bacillus cereus* sensu lato, à la manière de ce qui est observé pour *Salmonella*, une circulation entre trois réservoirs (réservoir animal, humain et hydrotellurique). La présence de *B. cereus* dans plusieurs eaux de rivières a été rapportée en Norvège (Ostensvik *et al.*, 2004). Ce réservoir hydro-tellurique pourrait également être à l'origine de la dissémination de *B. cereus* dans l'environnement et de son entrée dans la chaîne de transformation des aliments.

Le réservoir hydrotellurique est bien entendu le plus important, et servirait de source aux deux autres.

Ces notions relatives aux réservoirs de *Bacillus cereus* sont résumées dans la Figure 1.3 (Jensen *et al.*, 2003).

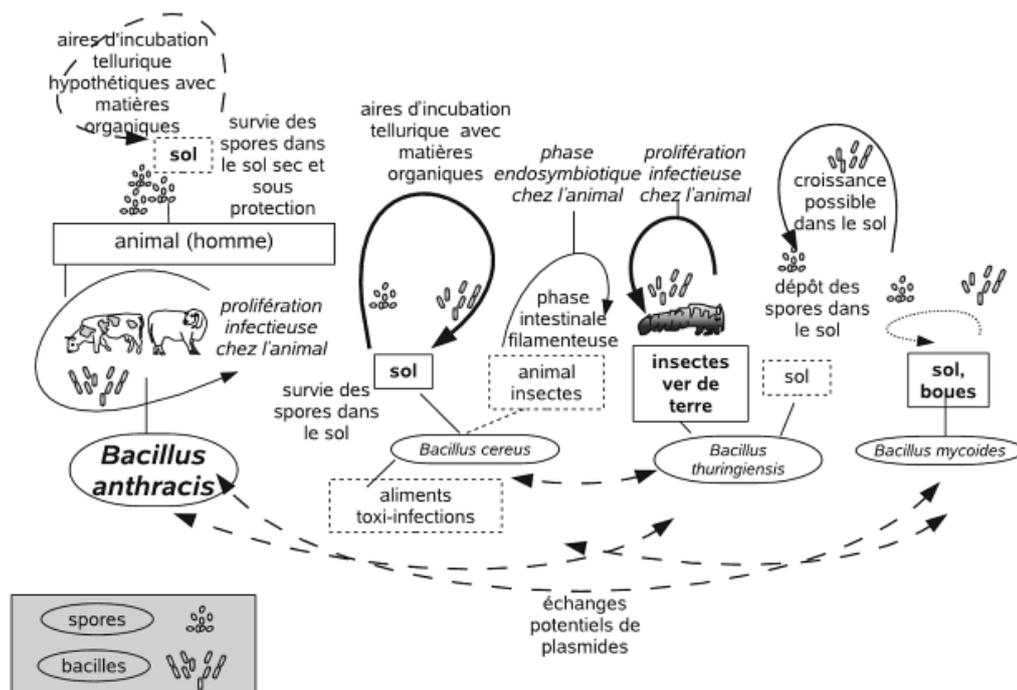


Figure 1.3. Modèle de cycles pour *Bacillus cereus* sensu lato (Jensen *et al.*, 2003).

Les auteurs proposent un modèle dans lequel les membres du groupe *B. cereus* ont deux cycles de vie : un cycle où les bactéries vivent en relation symbiotique avec leurs

hôtes invertébrés, et un autre, peu fréquent, dans lequel les bactéries peuvent se multiplier rapidement chez un autre insecte hôte infecté ou un mammifère (Jensen *et al.*, 2003).

On remarquera que, chez certains arthropodes, « la phase intestinale » de *B. cereus* s'est avérée être filamenteuse. Avec cette « phase », on peut donc concevoir que *B. cereus* pourrait être à son tour pathogène pour l'homme (et parfois pour l'animal), saprophyte dans le milieu extérieur, et symbionte chez l'animal. Il mériterait bien ainsi la dénomination d' « ubiquiste ».

Ce cycle particulier serait partagé par les membres du groupe *B. cereus sensu-lato*, excepté peut-être pour *B. anthracis*.

En outre, on a observé la colonisation des larves de moustique et de divers parasites du sol par *B. cereus* (Feinberg *et al.*, 1999).

Les contaminations des aliments correspondent à un apport de micro-organismes à une denrée alimentaire.

Elles répondent à trois mécanismes, les contaminations primaires, les contaminations croisées et les recontaminations.

Les contaminations des aliments par *Bacillus cereus* proviennent le plus souvent d'un contact avec le réservoir hydrotellurique.

Les contaminations primaires se font par le contact d'un aliment avec un réservoir de micro-organismes, essentiellement le réservoir hydrotellurique, secondairement le réservoir animal, et pratiquement jamais le réservoir humain.

Les contaminations croisées sont des contaminations entre et par les denrées alimentaires. Un aliment-source apporte donc une souche de *Bacillus cereus* à un aliment-destinataire qui sera à l'origine de l'accident.

Les facteurs des contaminations croisées sont représentés en premier lieu par les structures externes des spores de *Bacillus cereus*, qui interviennent dans l'adhésion aux surfaces.

Les différentes couches et structures des spores de *Bacillus cereus* impliquées dans l'adhésion aux surfaces sont résumées sur la Figure 1.4.

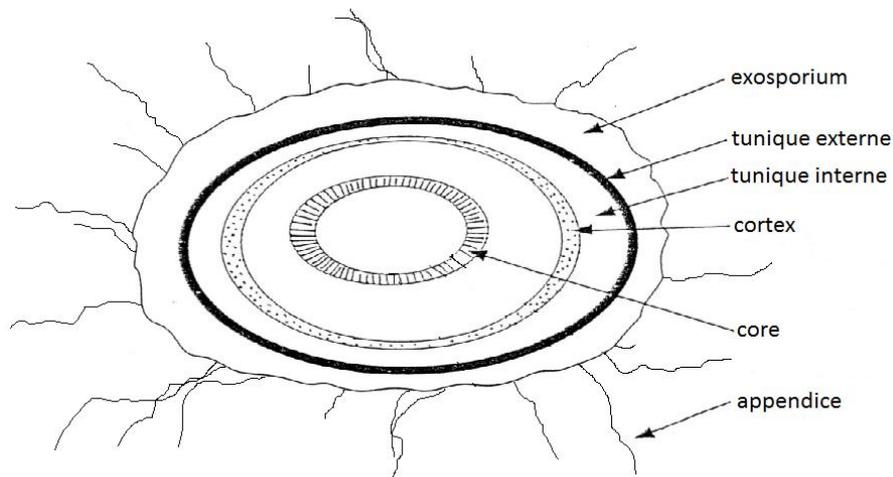


Figure 1.4. Les différentes couches et structures des spores de *Bacillus cereus* impliquées dans l'adhésion aux surfaces (Andersson *et al.*, 1995).

1.4. Altérations des aliments

Les altérations d'aliments causées par *Bacillus* sont principalement des défauts organoleptiques telles que des saveurs désagréables : notes rances, fruitées, levurées, amères (Meer *et al.*, 1991). Bien que principalement induites par *Clostridium*, les altérations visuelles sont également associées à la présence de *Bacillus* mésophiles *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. licheniformis* et se manifestent par des productions de gaz, des coagulations et liquéfactions de produits (Loysance, 1999).

Ces altérations sont dues à la production d'acides, d'enzymes (telles que des lipases et protéases) et d'autres composés indésirables (Burgess *et al.*, 2010).

Il a été montré que des enzymes extracellulaires de *Bacillus cereus* peuvent avoir des activités d'altération des aliments. Parmi ces dernières il existe des protéases, et des lipases comme les lecithinases. Par définition, ces enzymes vont respectivement hydrolyser soit des protéines soit des lipides.

Les aliments les plus décrits pouvant être altérés sont les œufs et le lait pasteurisé.

- Dans le lait :

Comme dit précédemment, les spores de *B. cereus* sont capables de résister à de fortes températures et donc aux principales méthodes de stérilisation de l'industrie agroalimentaire. Il a été montré que dans le lait UHT (ultra haute température), les spores présentes sont alors activées par ce choc thermique. Les bactéries, qui ont ainsi germé, peuvent alors produire des enzymes extracellulaires. Ces enzymes sont produites lors de la fin de la croissance exponentielle ainsi que pendant le début de la

phase stationnaire (Chen *et al.*, 2003). Ainsi, il a été montré que la production de ces enzymes extracellulaires est associée à la sporulation (Chen *et al.*, 2004). Ces dernières donnent au lait une saveur anormale et des défauts de structure (De Jonghe *et al.*, 2010). Les mécanismes altérant les propriétés physiques (microstructure, viscosité) et la saveur du lait sont complexes. Ils résultent d'une combinaison de réactions physiques, chimiques et biochimiques (Chen *et al.*, 2003).

- L'activité protéinase :

Dans le lait, les protéinases vont provoquer un clivage des caséines provoquant une désorganisation des micelles de caséine. Ceci entraînant une coagulation du lait (Chen *et al.*, 2003). L'activité protéolytique provoque alors un défaut dans le caillage, le «sweet curdling» (De Jonghe *et al.*, 2010). L'activité des protéinases est maximale lorsque le pH est alcalin (Chen *et al.*, 2004).

- L'activité lipolytique :

Les enzymes lipolytiques, les lipases, produites par *B. cereus* agissent sur les lipides, notamment les acides gras du lait. Leur action d'hydrolyse est plus efficace sur des acides gras à courte chaîne (Chen *et al.*, 2004). Cette mise en évidence est d'autant plus importante que ce sont ces mêmes acides gras à courtes chaînes qui contribuent le plus à la saveur du lait (Al-Shabibi *et al.*, 1964). Ainsi, cette dégradation donne une saveur rance et fruitée au lait, tout comme les lecithinases peuvent donner au lait un aspect de crème caillée en raison de l'aggrégation des globules gras (De Jonghe *et al.*, 2010).

Il a été montré que l'activité des lipases est maximale lorsque le pH est de 7-9. Les lipases produites par une souche de *B. cereus* sont plus stables que les protéases produites par cette même souche (Chen *et al.*, 2004).

Les aliments fabriqués à partir de lait sont potentiellement altérables par *B. cereus*. Parmi ceux-ci se trouvent les crèmes glacées, les fromages et les yaourts. Dans la littérature, (Chen *et al.*, 2003) ont montré que même si les bactéries qui contaminent le lait ne survivent pas à sa transformation, les enzymes, elles, sont encore plus résistantes à la température et peuvent être retrouvées dans du lait déshydraté. Ainsi, nul doute que *B. cereus* apparait comme un véritable danger en industrie agroalimentaire aussi bien d'un point de vue sanitaire qu'économique.

- Dans les œufs :

La première altération d'aliment a été mise en évidence sur l'œuf. En effet, il a été montré que lorsque des œufs sont contaminés par des *Bacillus cereus*, le jaune devient alors comparable à « une balle de ping pong » de couleur crème. De plus, l'albumine devient alors marron avec une odeur aigre caractéristique qui peut être associée à celle du fromage (Colmer, 1948). Dans les ovoproduits, les bactéries du groupe *Bacillus cereus* sont également responsables d'altération. Les bactéries produisent des lipases et des protéases qui vont être responsables d'une coagulation et d'une décoloration de ces derniers (Baron *et al.*, 2007).

2. Le « groupe *Bacillus cereus* »

L'expression « groupe *Bacillus cereus* » est en fait une nomenclature considérée comme empirique et non-taxonomique (Vilas-Boas *et al.*, 2002) ; elle a toutefois l'intérêt de souligner la grande proximité des micro-organismes qui composent, ce groupe, c'est-à-dire six espèces correspondant à *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* (Nakamura, 1998), *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanesis* (Lechner, 1998) ainsi que la nouvelle espèce *B. cytotoxicus* (Fagerlund *et al.*, 2007; Auger *et al.*, 2008; Lapidus *et al.*, 2008). Le groupe *Bacillus cereus* est actuellement composé de ces sept espèces (Guinebretière *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2011). Toutefois, la systématique du groupe est encore sujette à une controverse.

Bacillus anthracis, *Bacillus cereus sensu stricto* et *Bacillus thuringiensis* ont une telle proximité sur le plan génétique qu'on les regroupe souvent à l'heure actuelle dans une seule « espèce » dénommée *Bacillus cereus sensu lato* (Chen et Tsen, 2002 ; Helgason *et al.*, 2000 ; Rasko *et al.*, 2005).

Ces trois *Bacillus* ont par ailleurs la particularité d'être pathogènes pour l'Homme ou l'animal, ce qui renforce encore la tendance des chercheurs de les regrouper. Même s'il est génétiquement et taxonomiquement très proche de *B. cereus* au sens strict, *B. anthracis* a une écologie totalement différente et sa présence dans l'environnement est lié à l'existence d'infection chez les animaux (Fasanella *et al.*, 2010). La présence de spores de *B. cereus* ne préjuge pas la présence de spores de *B. anthracis*.

2.1. Les taxons du « groupe *Bacillus cereus* »

Sur le plan de l'étymologie, l'espèce *B.anthraxis* vient du grec anthrax (le charbon) à cause de la maladie du charbon et des lésions noirâtres qu'elle provoque.

L'espèce *cereus* vient de l'adjectif latin *cereus* (qui ressemble à la cire) à cause des colonies que *Bacillus cereus* forment sur les géloses.

Historiquement, la nomenclature employée pour classer les souches isolées était inspirée par la nomenclature de *Bacillus anthracis*, à l'époque bactérie « phare » à cause de son pouvoir pathogène.

C'est ainsi que l'on parlait d'« anthracoïde », de « *Bacillus subtilis-mesentericus* » ou « pseudoanthrax-like » (Kramer et Gilbert, 1989).

Pour *Bacillus mycoides*, *mukes* signifie en grec un champignon et *oïdes* la forme. Cette nomenclature fait référence à l'aspect des colonies filamenteuses adhérentes sur les milieux nutritifs solides. Ces colonies rhizoïdes peuvent s'étendre sur plusieurs centimètres, dans le sens, ou le sens contraire, des aiguilles d'une montre (Figure 1.5) (Di Franco *et al.*, 2002).

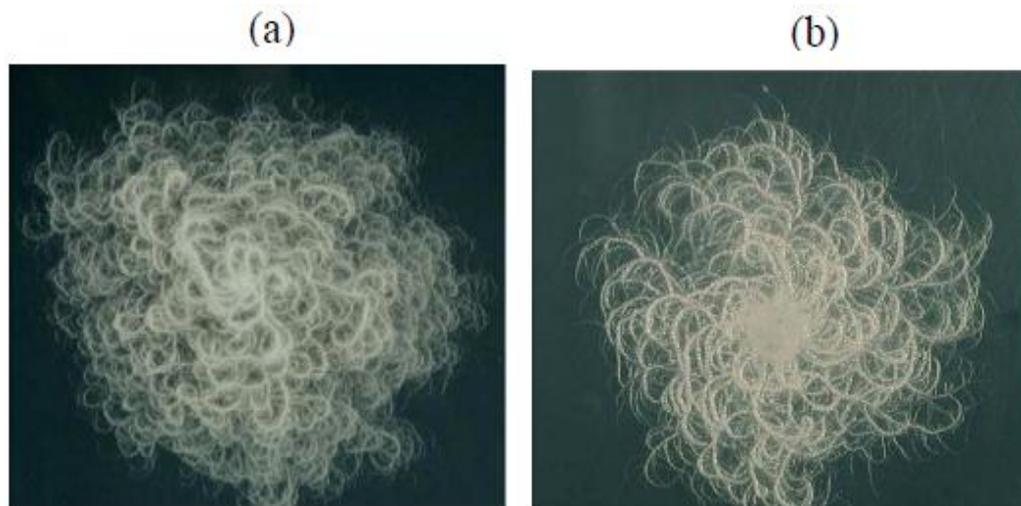


Figure 1.5. Colonies de *B.mycoides* (Di Franco *et al.*, 2002)
(a) Les colonies s'étendent dans le sens des aiguilles d'une montre.
(b) Dans le sens inverse des aiguilles d'une montre.

L'espèce *B. thuringiensis* fait référence à l'origine : en latin la Thuringe.

Ces quatre espèces (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides* et *B. thuringiensis*) ont été incluses en 1980 dans les Approved Lists of bacteriological names, en 1980 (Euzéby, 2002).

Pour *Bacillus pseudomycoïdes*, il s'agit d'une bactérie proche de *Bacillus mycoïdes* (un « faux » mycoïdes). Sa nomenclature a été validée en 1998 par Nakamura (Nakamura, 1998).

L'espèce *B. weihenstephanensis* fait référence à Freising-Weihenstephan, une ville allemande. Sa nomenclature a été validée en 1998 (Lechner *et al.*, 1998).

2.2. Caractères généraux

Les bactéries du groupe *B. cereus* sont des bactéries ubiquitaires et peuvent être isolées à partir de sols, végétaux, de tissus animaux et d'aliments. Ce sont des bactéries à coloration de Gram positive aérobies ou anaérobies facultatives, mobiles ou non. Leurs températures optimales de croissance sont généralement situées entre 25°C et 37°C ; cependant, certains membres sont plus tolérants et sont capables de se développer à des températures très élevées (75°C) ou très basses (3°C) (Drobniowski, 1993). L'hétérogénéité extrême au sein de ce groupe est reflétée par la large variété de niches écologique occupées par ses membres. Les principaux caractères phénotypiques communs et distinctifs au sein du groupe *B. cereus* sont décrits dans le Tableau 1.1.

La composition en base de l'ADN chromosomique de ces espèces est très homogène, le pourcentage en guanine et cytosine est faible, de l'ordre de 35% (Ivanova *et al.*, 2003).

Tableau 1.1. Principaux caractères communs et distinctifs des espèces du groupe *B. cereus sensu lato* (Guinebretière et Sanchis, 2003)

Caractères ^a	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>	<i>B. pseudomycoides</i>
Lécithinase	+	+	+	+	+	+
Utilisation du mannitol	-	-	-	-	-	-
Résistance aux lysosymes	+	+	+	+	+	+
Fermentation du glucose	+	+	+	+	+	+
Réaction VP	+	+	+	+	+	+
Réduction des nitrates	+	+/-	+	+	+	?
Mobilité	+/-	+/-	-	-	+/-	-
Hémolyse (sang de mouton)	+	+	(+)	-	+	?
Colonies rhyzoïdales	-	-	+	-	-	+
Croissance à < 7°C en milieu liquide agité et absence de croissance à 43°C	-	-	-	-	+	?
Cristal parasporal (endotoxine pathogène des insectes)	-	+	-	-	-	-
Lyse par phage gamma	-	-	-	+	-	?
Sensibilité à la pénicilline	-	-	-	+	-	?
Plamides pXO1 et pXO2	-	-	-	-	-	-
Toxine impliquée dans la maladie du charbon	-	-	-	+	-	-
Entérotoxines	+	+	+	?	+	+?

^a CC, caractères communs ; CD, caractères distinctifs. +, > 85 % de souches positives ; +/-, 50 à 84 % positives ; (-), positives faibles ; ?, absence de données suffisantes.

2.3. Diversité écologique

B. cereus est un groupe composé de différentes espèces proches génétiquement réunies sous la dénomination de "Groupe *B. cereus*" ou "*B. cereus sensu lato*". Les études récentes montrent que la classification en 6 espèces basée sur la virulence, la physiologie ou encore la morphologie, ne correspond pas à des critères de divergence génétique (Guinebretière et Sanchis, 2003; Hill *et al.*, 2004). Une gamme très large de température de croissance est enregistrée au sein du groupe *B. cereus*. La température de croissance varie entre souche et ne correspond pas à une espèce de ce groupe. L'espèce définie comme psychrotolérante *B. weihenstephanensis* ne contient pas de souches non psychrotolérantes, mais certaines souches psychrotolérantes n'appartiennent pas à l'espèce *B. weihenstephanensis*.

Afin d'éclaircir la classification existante, (Guinebretière *et al.*, 2008) ont montré que la structure génétique du groupe *B. cereus* regroupait au sein d'un même groupe phylogénétique, des souches appartenant à des espèces différentes mais partageant le même domaine de température de croissance. Les auteurs ont ainsi étudié les relations phylogénétiques de 425 souches des six espèces de *B. cereus*, par analyse de profils AFLP, séquences du gène de ménage panC et recherche de signatures de psychrotrophie sur les séquences des gènes *rrs* et *cspA*.

Selon cette classification, chaque groupe correspond à un « thermotype » particulier qui montre clairement la différence entre les capacités à se développer à basse ou haute température. La température est, en effet, considéré comme le facteur environnemental le plus important auquel les microorganismes doivent répondre (Guinebretière *et al.*, 2008). Enfin, cette étude a, en outre, permis de positionner dans cette nouvelle structure écotype, les pathogènes alimentaires ainsi que les espèces phénotypiques courantes (Carlin *et al.*, 2009; Guinebretière *et al.*, 2010)

Cette étude a permis de mettre en évidence l'existence de 7 groupes phylogénétiques distincts, possédant une gamme de température propre à chacun et les pouvoirs pathogènes qui sont représentés dans le Tableau 1.2.

Le groupe I regroupe les souches de l'espèce *B.pseudomycoïdes*, dont la température de croissance est comprise entre 10°C et 40°C. Les groupes III, IV et V regroupent les souches de *B. cereus sensu stricto* et *B. thuringiensis*, les plus mésophiles du groupe *B. cereus*. Le caractère mésophile est de plus en plus marqué du groupe V vers le groupe III qui regroupe les souches de *B. anthracis*. Le groupe VII contient les souches les plus thermophiles, dont la température de croissance varie de 20°C à 50°C. Ce groupe est très éloigné des 6 autres et il a été récemment proposé que la souche NVH-391.98 soit

représentative de la nouvelle espèce thermophile appelé *B. cytotoxicus* relativement rare, elle est caractérisée par sa toxicité élevée et sa thermotolérance particulière (Guinebretière *et al.*, 2013).

Le groupe II est composé des souches psychrotrophes de *B. cereus* et *B. thuringiensis* et le groupe VI contient les souches psychrotrophes de *B. weihenstephanensis* et *B. mycoides*. Ces deux groupes psychrotrophes se différencient par leur gamme de température de croissance: les souches du groupe II ne présentent pas de croissance en dessous de 7°C et peuvent croître jusqu'à 40°C, alors que celles du groupe VI sont capables de croître dès 5°C mais sont incapables de croître au-delà de 37°C. Seules les souches appartenant au groupe VI possèdent une signature de psychrophilie dans la séquence du gène *cspA*, qui est un bon marqueur de discrimination entre les deux groupes de souches psychrotrophes. Cette classification confirme que les souches psychrotrophes ne sont pas obligatoirement membres de l'espèce *B. weihenstephanensis* (Stenfors et Granum, 2001).

Le groupe VII serait le groupe le plus proche d'un ancêtre commun, (Guinebretière *et al.*, 2008) suggèrent que le groupe *B. cereus* soit issu d'un ancêtre thermophile et qu'il évolue vers la psychrophilie, permettant ainsi une adaptation à de nouvelles niches écologiques. La coexistence de deux groupes psychrotrophes semble indiquer des évolutions parallèles, en réponse à une même contrainte. Les souches du groupe VI sont les plus fortement marquées par le caractère psychrotrophe, alors que les souches du groupe II semblent être en cours de différenciation des groupes mésophiles.

Les souches impliquées dans des cas de toxi-infection alimentaire collective (TIAC) sont regroupées majoritairement dans les groupes III, IV et VII. Les souches psychrotrophes du groupe VI n'ont pas été associées à des TIAC et possèdent un faible potentiel cytotoxique *in vitro* (Cadot *et al.*, 2010). Certaines souches du groupe VI sont toutefois capables de produire la toxine émétique et la capacité à synthétiser cette toxine, apportée par un plasmide, pourrait être transférée d'une souche vers une autre (Thorsen *et al.*, 2006). Au contraire du groupe VI, le groupe II (psychrotrophe) comporte des souches isolées de TIAC. Il existe donc un risque d'émergence de souches productrices de toxine et capables de s'adapter aux températures de réfrigération.

Tableau 1.2. Les sept groupes de *B. cereus* (Guinebretière *et al.*, 2008)

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

nd, non déterminé

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

^bCspA : Major Cold Shock Protein A

2.4. Phylogénie

Bien que le « groupe *B. cereus* sensu lato » apparaisse assez homogène, la classification des espèces qui le composent est depuis longtemps débattue. Dès 1946, Smith et coll. proposaient que les bactéries du groupe *B. cereus* soient considérées comme des variants de l'espèce *B. cereus* (Smith *et al.*, 1946). *B. anthracis*, le statut d'espèce distincte a été maintenu (Gordon *et al.*, 1973). A l'origine, la classification de ces membres était essentiellement basée sur des propriétés phénotypiques évidentes liées, en partie, à des propriétés particulières de virulence. L'aptitude de *B. thuringiensis* à former des inclusions cristallines parasporales composées de protéines insecticides et la présence de la capsule chez *B. anthracis* responsable de l'anthrax chez les mammifères permet de les distinguer de *B. cereus* sensu stricto qui est responsable de toxi-infections alimentaires et d'infections locales et systémiques chez l'Homme. La perte de l'un de ces caractères les rend phénotypiquement indiscernables de *B. cereus* sensu stricto. Au début de l'année 1970, les outils de la biologie moléculaire ont largement contribué à la classification des bactéries.

Actuellement, deux souches sont considérées d'une même espèce lorsqu'elles présentent généralement plus de 70% de réassociation lors d'une hybridation ADN-ADN et plus de 97 % d'identité de séquences des ARN ribosomiaux 16S (Vandamme *et al.*, 1996). Des expériences d'hybridation ADN-ADN (Nakamura, 1994) ainsi que la comparaison des séquences des ARN ribosomiaux 16S ou 23S et du gène *gyrB* (Awad *et al.*, 2006; Bavykin *et al.*, 2004; Chen et Tsen, 2002) révèlent une forte parenté entre les souches du groupe *cereus* et ne permettent pas de distinguer les espèces. Beaucoup d'articles décrivent des méthodes d'analyses moléculaires visant à distinguer *B. anthracis*, *B. thuringiensis* et *B. cereus*. Ces analyses regroupent des techniques telles que la MLEE (MultiLocus Enzyme Electrophoresis) (Helgason *et al.*, 1998; Helgason *et al.*, 2000), la MLST (MultiLocus Sequence Typing) (Helgason *et al.*, 2004; Priest *et al.*, 2004; Sorokin *et al.*, 2006; Tourasse *et al.*, 2006), la AFLP (fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism) (Hill *et al.*, 2004; Keim *et al.*, 1997; Ticknor *et al.*, 2001) ou encore la rep-PCR fingerprinting (Cherif *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2001; Reyes-Ramirez et Ibarra, 2005) et l'hybridation par inhibition et soustraction (SSH : suppression subtractive hybridization) (Radnedge *et al.*, 2003). Aucune de ces études ne permet de distinguer clairement un *B. cereus* d'un *B. thuringiensis*, d'un *B. anthracis*, mais toutes montrent une diversité génétique importante au sein de ces espèces phylogénétiquement très proches. De plus, ces données confirment que *B. anthracis* est une espèce monomorphe chez laquelle la diversité entre les isolats ne peut pas être révélée par ces techniques.

3. Bacillus cereus : pathogène alimentaire

3.1. Caractéristiques

Les souches de *B. cereus* sont constituées de bacilles Gram positif de 1,4 µm, habituellement observés en paires ou en chaînettes courtes. *B. cereus* est anaérobie facultatif, possédant une ciliature péritriche (Figure 1.6) capable de former des endospores et ses colonies blanches d'aspect granuleux font entre 2 et 7 mm de diamètre (Ray, 2004). Les spores ovoïdes de *B. cereus*, non déformantes sont situées en position centrale ou subterminale, à raison d'une spore par cellule (Figure 1.7). Une croissance est observée à des températures se situant entre 10-20 °C et 35-45 °C, la température optimale étant d'environ 37°C (Logan et Rodrigez-Diaz, 2006). Le bacille peut produire six types de toxines, à savoir cinq entérotoxines et une toxine émétique (Murray *et al.*, 2007), qui peuvent être thermostables ou thermolabiles, selon les souches (From *et al.*,2005).

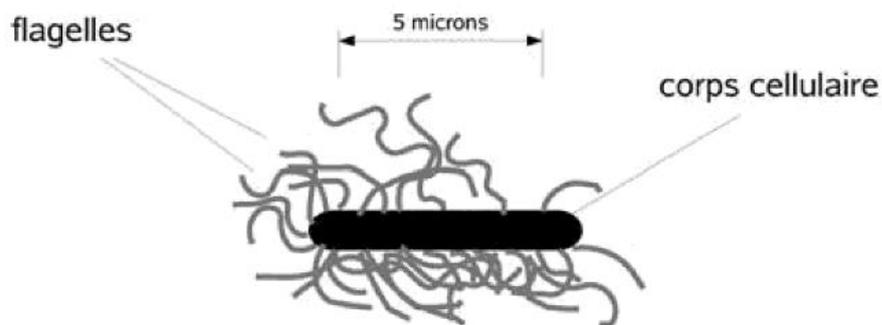


Figure 1.6. Aspect d'une cellule hyperflagellée de *Bacillus cereus* (Senesi *et al.*, 2002).

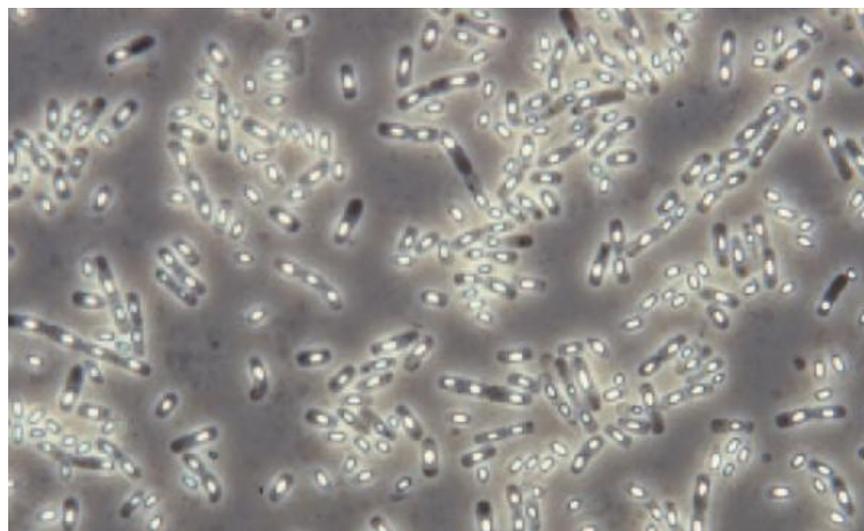


Figure 1.7. *Bacillus cereus* : cellules sporulées sous microscopie optique (ANSES, 2011)

3.2. Historique

Les bactéries aérobies et sporulées ont été suspectées d'être impliquées comme agents d'intoxications alimentaires depuis les premiers jours de la microbiologie.

Néanmoins, c'est seulement récemment que des espèces de *Bacillus* ont été impliquées et étudiées, souvent sous l'apparence trompeuse d'entéropathogènes « nouveaux » ou « émergents » et transmis par les aliments.

Toutefois, la littérature du début du siècle précédent parlait déjà d'intoxications alimentaires causées par *Bacillus cereus*, ou en tout cas par des micro-organismes apparentés dénommés « *Bacillus cereus-like* ».

Le premier épisode décrit date de 1906, que Lubenau, cité par Kramer et Gilbert, a décrit comme un foyer d'hôpital touchant 300 patients et membres du personnel (gastro-entérite aiguë) après avoir mangé des boulettes de viande, dont les restes contenaient des grandes quantités d'une bactérie aérobie génératrice de spores.

La souche a été décrite comme « *Bacillus peptonificans* », et est considérée à l'heure actuelle comme étant probablement une souche de *Bacillus cereus*.

C'est la forme la plus ancienne. Les premiers accidents furent décrits dès 1906, avec 300 personnes hospitalisés, et l'identification d'une souche de « *Bacillus peptonificans* », qui avait toutes les caractéristiques d'un *Bacillus cereus* actuel.

Entre 1936 et 1943, 117 cas de toxi-infections alimentaires dus à *Bacillus cereus* ont été identifiés en Suède (Kramer et Gilbert, 1989).

C'est à la fin des années 1940 que ce micro-organisme a véritablement émergé en tant que responsable de toxi-infection alimentaire (Hauge, 1955), avec, en particulier, un foyer dans l'hôpital d'Oslo en 1948 (Granum *et al.*, 1996).

Très largement répandu dans la nature, *B. cereus* se comporte comme un pathogène opportuniste responsable d'infections systémiques et locales et cette espèce est également responsable de toxi-infections alimentaires (Bottone, 2010; Logan, 2012). La Figure 1.8 illustre les différents types d'infections dans lesquelles *B. cereus* peut être impliqué.

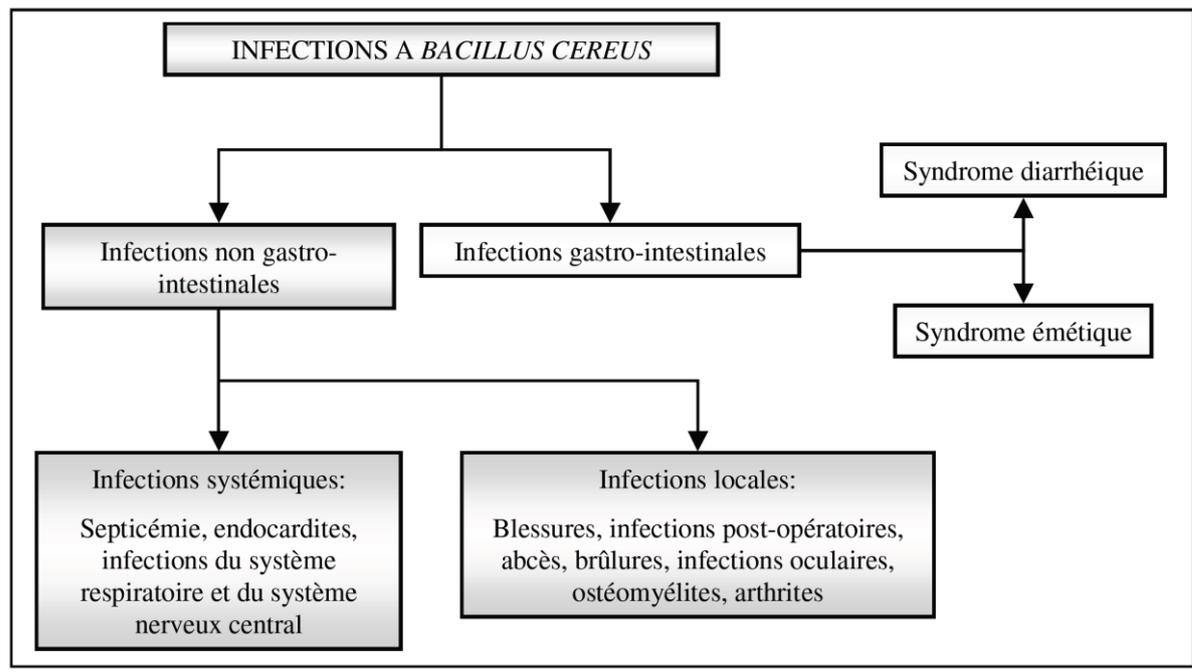


Figure 1.8. Représentation schématique des infections à *B. cereus* (Drobniewski, 1993).

3.3. Définition d'une toxi-infection alimentaire

Individuelles ou collectives, les toxi-infections alimentaires (TIA) résultent de la transmission d'infections à l'homme par les aliments. L'attaque microbienne peut être liée aux propriétés invasives du micro-organisme et/ou aux produits toxiques qu'il est capable d'élaborer au cours de sa croissance. Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est définie comme « l'apparition d'au moins deux cas groupés, similaires d'une même symptomatologie, en général digestive, et dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire ».

Les TIAC à *B. cereus* sont généralement bénignes, néanmoins quelques épisodes mortels ont été décrits montrant que la virulence de *B. cereus* n'est pas à négliger (Bieche *et al.*, 2012; Bielaszewsha *et al.*, 2011; Dierick *et al.*, 2005; Lund *et al.*, 2000; Naranjo *et al.*, 2011; Posfay-Barbe *et al.*, 2008).

L'incidence réelle de *B. cereus* en tant que pathogène alimentaire est difficile à évaluer pour plusieurs raisons. D'une part, les toxi-infections à *B. cereus* ne sont pas à déclaration obligatoire (El-Banna, 2009): elles sont donc probablement sous-estimées dans les listes officielles. Enfin, les cas de TIAC à *B. cereus* ne sont pas toujours attribués à cette bactérie car le symptôme émétique ressemble à une toxi-infection à *Staphylococcus aureus* et le symptôme diarrhéique peut être associé à une toxi-infection à *Clostridium perfringens* (Tableau 1.3). C'est dans ce contexte que l'Institut

National de Veille Sanitaire (INVS) a classé *B. cereus* comme étant la quatrième cause de TIAC en France (INVS, 2009).

Tableau 1.3. Eléments de diagnostic différentiel (JORF, 1987).

	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Bacillus cereus</i> syndrome diarrhéique	<i>Bacillus cereus</i> syndrome émétique	<i>Staphylococcus aureus</i>
Incubation	9 à 15 h	8 à 16 h	1 à 5 h	2 à 4 h (parfois 30 min)
Diarrhée	liquide, bénigne	liquide, bénigne	quelques malades	quelques malades
Vomissements	quelques malades	quelques malades	incoercibles, en fusée	incoercibles, en fusée
Hyperthermie	rare	exceptionnelle	exceptionnelle	rare
Isolement dans les selles	+	+	±	+ (même lysotype)
Isolement dans les vomissements	-	±	+	+ (même lysotype)
Isolement dans les aliments	> 10 ⁵ <i>C. perfringens</i> ou même sérotype que chez le malade	> 10 ⁵ <i>B. cereus</i> ou même sérotype que chez le malade	> 10 ⁵ <i>B. cereus</i> ou même sérotype que chez le malade	> 10 ⁵ <i>S. aureus</i> ou toxine émétique

3.4. Atteintes gastro-intestinales

B. cereus peut être rencontré dans une grande variété d'aliments tels que les pâtes, le riz, les produits laitiers, les denrées alimentaires séchées, la viande, les légumes, les fruits, les céréales, les épices ou les fruits de mer (Coorevits *et al.*, 2008 ; Guinebretière et Nguyen-The, 2003 ; King *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2006 ; Meldrum *et al.*, 2009 ; Rahmati et Labbé, 2008 ; Ranieri et Boor, 2009).

Les maladies gastro-intestinales sont les infections les plus communément associées à *B. cereus* (Didelot *et al.*, 2009). Chez les individus en santé, les symptômes sont généralement bénins, mais les complications peuvent conduire à des maladies plus graves et même à la mort (Dierick *et al.*, 2005 ; Ginsburg, 2003 ; Girish *et al.*, 2003 ; Shiota *et al.*, 2010). Des éclosions de troubles intestinaux dues à *B. cereus* ont été signalées dans le monde entier (Logan et Rodriguez-Diaz, 2006). On lui attribue entre 1% et 33% des cas d'intoxication alimentaire (EFSA, 2005) avec des degrés de gravité variable.

3.4.1. Syndrome diarrhéique

Ce syndrome fait suite à l'ingestion d'aliments contaminés par des cellules végétatives ou des spores bactériennes (Clavel *et al.*, 2004, Ceuppens *et al.*, 2012).

Dans le cas de ce syndrome, on ne sait pas clairement si les entérotoxines sont présentes dans les aliments ou si elles sont produites dans l'intestin grêle par la bactérie. Cependant les entérotoxines sont instables à un pH supérieur à 4 et peuvent être dégradées par la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine (Granum, 1994), de sorte qu'il est plus probable qu'elles soient produites dans l'intestin grêle (Clair *et al.*, 2010). Cinq toxines ont été proposées comme causes potentielles du syndrome diarrhéique : HBL, NHE, BceT, EntFM et CytK, mais trois d'entre elles seulement (HBL, NHE et CytK) ont été associées à des flambées épidémiques d'origine alimentaire (Agata *et al.*, 1995; Lund *et al.*, 2000; Lund et Granum, 1997; Samapundo *et al.*, 2011; Schoeni et Wong, 2005; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

Il existe trois types de toxines produites par *B. cereus* capables d'induire des syndromes diarrhéiques : la Nhe (entérotoxine non hémolytique), Hbl (Hémolysine BL) et Cyt K (cytotoxine K) (Samapundo *et al.*, 2011). Ces entérotoxines impliquées dans des TIAC sont produites lors de la phase de croissance végétative des *B. cereus* dans le petit intestin de la personne contaminée (Granum et Lund, 1997).

Nhe

Nhe est une protéine constituée de trois composants : Nhe A, Nhe B et Nhe C (Lindback *et al.*, 2004). Pour que la toxicité de Nhe soit maximale, il faut que les 3 composantes soient dans un rapport 10/10/1. Les trois composés de Nhe sont codés par l'opéron *nhe*.

Après une exposition à Nhe, il a été montré une augmentation de la taille des cellules ainsi exposées. Selon (Fagerlund *et al.*, 2008; Haug *et al.*, 2010; Lindback *et al.*, 2004), Nhe perturberait les membranes plasmiques épithéliales par l'insertion de pores transmembranaires.

Hbl

La première entérotoxine décrite est l'hémolysine BL (Hbl). Cette entérotoxine est composée de trois sous-unités comprenant deux composants lytiques L2 et L1 codés par *hblC* et *hblD* respectivement et la protéine de liaison B codée par *hblA* (Heinrichs *et al.*, 1993, Ryan *et al.*, 1997). Un quatrième composant HblB', dont la fonction est inconnue, codé par le gène *hblB'*, est produit chez la souche ATCC 14579 (Clair *et al.*,

2010). Hbl est une toxine hémolytique, cytotoxique, dermonécrotique et elle entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire.

L'établissement du syndrome diarrhéique par cette toxine a été montré in vitro par l'accumulation de liquide dans une anse iléale de lapin ligaturée (Beecher *et al.*, 1995). L'interaction des trois sous-unités est nécessaire pour la formation du pore transmembranaire et le ratio optimal des composants L2, L1 et B requis pour une cytotoxicité maximale est de 1 :1 :1. Chacun des composants de Hbl est sécrété via le système Sec et se lie à la membrane cellulaire de manière indépendante. Cependant, les composants L2 et L1 présentent une vitesse de fixation plus rapide que le composant B (Beecher et Wong, 1997; Beecher et Wong, 2000; Fagerlund *et al.*, 2010).

Cyt K

La cytokine K a été mise en évidence la première fois comme étant responsable de TIAC en France en 1998. Il existe 2 formes de la CytK : CytK 1 et CytK 2. L'activité entérotoxique de la cytokine est de créer des pores dans les bicouches lipidiques des cellules épithéliales de l'intestin (Senesi *et al.*, 2010).

Les autres valeurs de virulence spécifiques à *B. cereus* comprennent les protéases, notamment les métalloprotéases (Cadot *et al.*, 2010; Guillemet *et al.*, 2010) et d'autres enzymes de dégradation jouent un rôle dans l'établissement et le développement des infections.

On est donc en présence, sauf exception, d'un phénomène toxi-infectieux, et rarement d'intoxication, phénomène qui sera toutefois parfois retenu comme hypothèse.

La diarrhée infectieuse provoquée par *Bacillus cereus* est de type sécréteur, comme dans le cas du choléra. Les principaux symptômes sont des diarrhées aqueuses, des douleurs abdominales, des nausées, durant généralement 24 heures ne s'expriment généralement qu'au-delà de 6h après l'ingestion de l'aliment contaminé (ANSES, 2011; Clavel *et al.*, 2007; Granum *et al.*, 1993; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008) .

La diarrhée sécrétrice est une diarrhée liquide liée à la perturbation des échanges de l'eau et des électrolytes à travers l'épithélium de l'intestin grêle, provoquée par une entérotoxine.

La diarrhée due à *Bacillus cereus* n'est pas invasive (invasion destructive des muqueuses, généralement au niveau du colon ; elle n'est pas non plus de type pénétrant (comme avec *Salmonella typhi*) où la bactérie pénètre l'épithélium apparemment intact, pour y proliférer (Wijnands *et al.*, 2002).

Les souches diarrhéiques de *Bacillus cereus* agissent par un mécanisme de véritable « toxi-infection » ou plus exactement de « processus infectieux et toxique ».

La toxi-infection intestinale due à *Bacillus cereus* suit un processus classiquement observé chez d'autres bactéries entériques avec plusieurs phases successives : une mobilité flagellaire, orientée par le chimiotactisme, qui permet à la bactérie de se rapprocher des cellules intestinales, une adhésion aux cellules intestinales et une production de toxines.

Le transit des cellules dans l'estomac dure au minimum 6h, le transit dans l'intestin grêle dure 4h (Granum *et al.*, 1995).

In situ, la cellule végétative (ou la spore) adhère aux cellules intestinales.

Il y a alors multiplication cellulaire et production de toxines par la cellule végétative, directement, ou après germination s'il s'agit d'une spore (voir Figure 1.9).

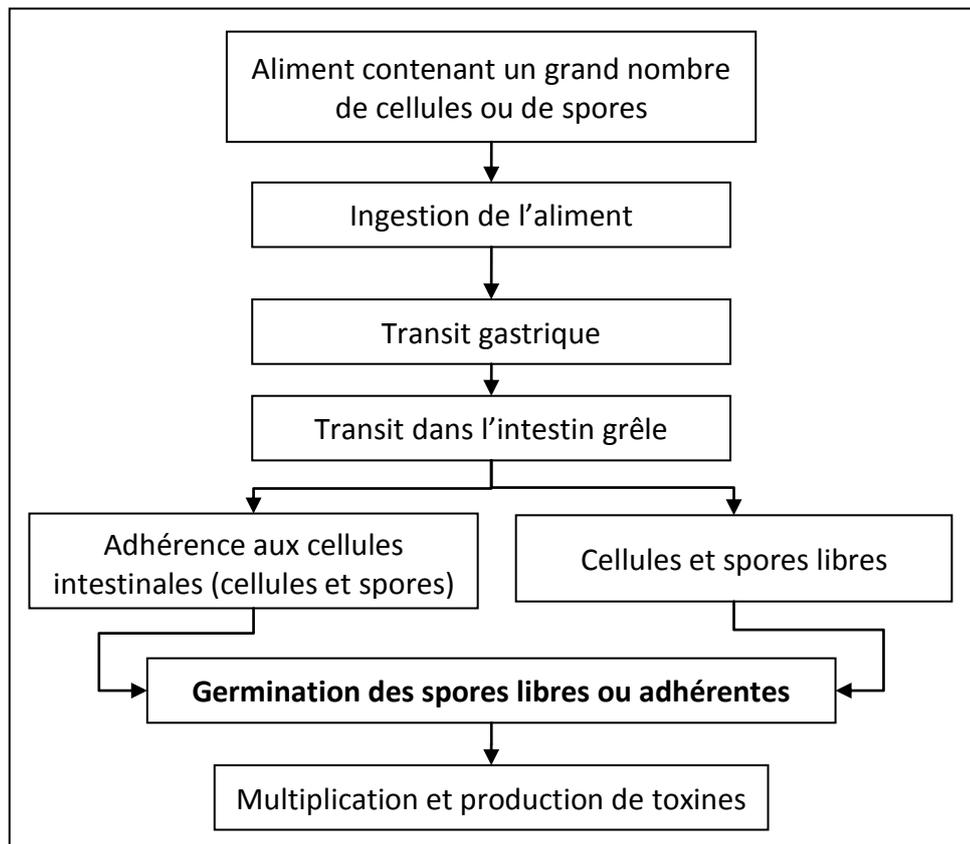


Figure 1.9. Etapes de la toxi-infection alimentaire due à *Bacillus cereus*.

3.4.2. Syndrome émétique

Le premier accident émétique dû à *Bacillus cereus* a été décrit en 1971 en Grande Bretagne ; il était associé à la consommation de riz. La bactérie produit, lors de sa

croissance dans l'aliment, un peptide toxique le céréulide, très stable à la chaleur et au pH extrêmes. Le céréulide est produit pendant la phase stationnaire de croissance (Thorsen *et al.*, 2009).

Il peut par conséquent subsister dans l'aliment après un traitement thermique capable de détruire toute forme végétative de bactérie (Pirhonen *et al.*, 2005). Selon (Rajkovic *et al.*, 2008), aucun traitement thermique dans le domaine de l'industrie alimentaire ne peut détruire le céréulide.

L'ingestion de la toxine, même en l'absence de cellules bactériennes, provoquent des nausées, vomissements, malaises, parfois accompagnés de diarrhées et douleurs abdominales (EFSA, 2011). Les symptômes surviennent dans les 30 minutes à 6 heures après ingestion (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008) et disparaissent au plus tard 24 heures après (Kramer et Gilbert, 1989; Nguyen-The *et al.*, 2003; Pavic *et al.*, 2005).

Dans les formes émétiques, des complications sont toujours à craindre chez les individus fragiles (insuffisants cardiaques, enfants en bas âge, vieillards, malades hospitalisés...) en raison de la brutalité des vomissements. Devant ce syndrome émétique violent, l'hospitalisation des malades est de règle de façon à disposer des moyens de réanimation rapide. Ce syndrome émétique peut avoir des résultats mortels et fulminants.

3.5. Autres pathologies

B. cereus cause différentes maladies non gastrointestinales examinées dans (Bottone, 2010; Drobniewski, 1993). Les éclosions non gastrointestinales de *B. cereus* sont moins fréquentes et la plupart d'entre elles sont identifiées comme éclosions nosocomiales. L'endophtalmie est une infection grave causée par l'introduction de la bactérie dans les yeux après un traumatisme ou une chirurgie. Des cas d'endophtalmie ou de panophtalmie à *B. cereus* ont été rapportés dans les travaux scientifiques (Al-Jamali *et al.*, 2008; Altiparmak *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2007; Tobita et Hayano, 2007; Zheng *et al.*, 2008). Parmi les organismes qui infectent les yeux, *B. cereus* présente l'un des cours de l'infection qui évoluent le plus rapidement (Brinton *et al.*, 1984) et est l'un des plus destructeurs (Levin et D'Amico, 1991).

Une expérience menée sur des lapins par (Callegan *et al.*, 2003) a montré une endophtalmie reproductible causée par la souche ATC 14579. Malgré une intervention énergique menée avec des médicaments ou une intervention chirurgicale, l'endophtalmie à *B. cereus* entraîne habituellement une migration des bactéries à travers l'œil, une progression remarquablement rapide et une réponse inflammatoire

intraoculaire grave, entraînant la perte fonctionnelle de la vue en 24 à 48 heures (Vahey et Flynn, 1991).

B. cereus peut causer une variété d'infections de la peau et des tissus mous, incluant la cellulite (Latsios *et al.*, 2003) et la cellulite nécrosante (Hutchens *et al.*, 2010; Sada *et al.*, 2009). Les infections des blessures, principalement chez des personnes par ailleurs en bonne santé, ont été signalées après un traumatisme, une chirurgie ou des brûlures (Crane et Crane, 2007; Moulder *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2010; Shimoni *et al.*, 2008). L'utilisation de cathéters a souvent été associée aux infections à *B. cereus* (Crane et Crane, 2007; Flavelle *et al.*, 2007).

Certains cas de méningo-encéphalite à *B. cereus* (Evreux *et al.*, 2007; Lebessi *et al.*, 2009; Manickam *et al.*, 2008) et de bactériémie (John *et al.*, 2007) ont été signalés chez des nouveau-nés. La méningo-encéphalite néonatale causée par *B. cereus* est rare, mais le taux de mortalité en est élevé. Les cas d'infection peuvent souvent être retracés à des équipements ou appareils médicaux.

Certains cas de pneumonie à *B. cereus* ont été rapportés. Les infections pulmonaires dues à *B. cereus* sont rares en comparaison de celles attribuées à *B. anthracis*, mais peuvent être tout aussi dangereuses pour la vie des personnes immunodéficientes.

Des cas de pneumonie à *B. cereus* chez des patients cancéreux ont été rapportés par (Fredricks *et al.*, 2006; Katsuya *et al.*, 2009). Dans la plupart des cas, la voie de l'infection était inconnue, mais liée aux infections existantes de *B. cereus* chez les patients. Dans tous les cas, sauf un, l'infection a entraîné le décès.

La gamme d'infections non gastrointestinales rapportées est plus large chez les personnes immunodéficientes. Des cas de méningite nécrosante, d'hémorragie sous-arachnoïdienne et d'abcès cérébraux ont été rapportés en lien avec des infections systémiques de *B. cereus* chez des patients atteints de leucémie (Nishikawa *et al.*, 2009). D'autres infections locales et systémiques de *B. cereus* ont été rapportées chez des patients dont l'immunité est compromise (Hirabayashi *et al.*, 2010; Kiyomizu *et al.*, 2008; Le Scanff *et al.*, 2006; Nishikawa *et al.*, 2009). Chez les patients immunodéprimés, l'infection peut être mortelle (Le Scanff *et al.*, 2006).

Les rapports cliniques démontrent que la gravité des infections de *B. cereus* présentaient une corrélation importante avec la capacité de synthétiser les toxines (Ghelardi *et al.*, 2002) et dépend de la compétence immunitaire de l'hôte ainsi que de la virulence du microbe.

3.6. DMI ou dose réponse

On remarquera que certains auteurs modernes parlent non pas de DMI (Dose Minimale Infectieuse) mais de relation dose-réponse.

Dans le cas des toxi-infections diarrhéiques, la quantité de cellules ou spores de *B. cereus* pathogènes retrouvée dans les aliments incriminés est généralement égale ou supérieure à 10^5 par gramme ou millilitre (Tsigarida *et al.*, 2009) et dans de très rares cas égale ou supérieure à 10^3 par gramme ou millilitre (EFSA, 2005; Kramer et Gilbert, 1989; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

Dans le cas des intoxications émétiques, les toxines peptidiques sont très stables et peuvent persister dans l'aliment même si les bactéries ont disparu (EFSA, 2005). Un minimum de 10^5 cellules de *B. cereus* par gramme ou millilitre de l'aliment à un stade de sa production est nécessaire pour produire suffisamment de toxines et provoquer une intoxication.

On a cependant observé des syndromes émétiques avec peu de cellules de *B. cereus* dans l'aliment (10^2 par gramme).

De même, les pathologies d'origine alimentaire provoquées par *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, ont toujours été associées à une population importante de ces bactéries dans les aliments responsables, de l'ordre de 10^5 cellules ou spores par gramme (Kramer et Gilbert, 1989).

4. Bacillus cereus : source de problèmes dans les industries agroalimentaires

Parmi les micro-organismes nuisibles aux industries agroalimentaires, *Bacillus cereus* occupe une place de premier plan. Sa capacité à croître rapidement, à sporuler et à former des biofilms (Figure 1.10), en a fait un outil suscitant l'intérêt des industries agroalimentaires (Bartoszewicz *et al.*, 2008).

En effet, les spores sont connues comme une des formes de vie les plus résistantes (Nicholson *et al.*, 2000) et leur inactivation complète est souvent impossible sans altérer la qualité de l'aliment, comme c'est le cas de *B. cereus* (Smelt *et al.*, 2008; Daryaei *et al.*, 2013). Ceci serait en partie dû au fait que les spores possèdent une forte hydrophobicité, une surface très peu chargée et une morphologie particulière.

Ce caractère hydrophobe marqué, souvent attribué à l'abondance de protéine de surface (Doyle *et al.*, 1984) est fréquemment cité à l'origine de la forte capacité

d'adhésion des spores (Rönner *et al.*, 1990; Husmark et Rönner, 1992; Faille *et al.*, 2000).

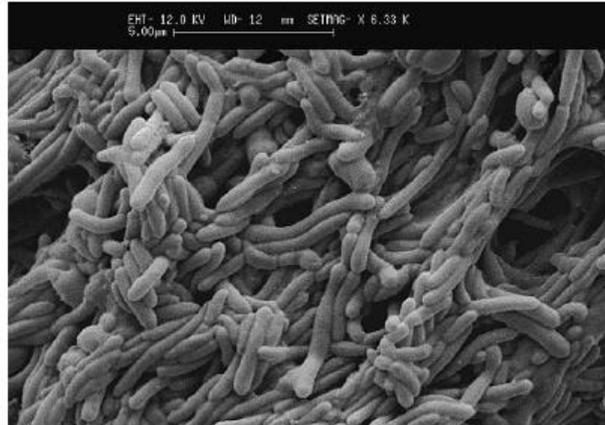


Figure 1.10. Micrographe d'un biofilm de 6 jours formé par *B. cereus* sur une surface en inox (Simoes *et al.*, 2010).

Le phénomène d'adhésion bactérienne a été étudié dans de nombreux domaines de sécurité sanitaire où la présence de micro-organismes adhérents a un impact négatif. Ces domaines comprennent la formation de la carie dentaire (Nicolas et Lavoie, 2011), la colonisation des implants médicaux (Sousa *et al.*, 2011), la formation de biofilms dans les conduites d'eau de boisson (Roux et Ghigo, 2006), et dans les environnements de traitement des denrées alimentaires (Somers et Wong, 2004).

L'adhésion de *B. cereus* et la formation de biofilm sur l'acier inoxydable est largement documentée et utilisée notamment dans les travaux portant sur le décrochement des biofilms et leur élimination, dans les conditions simulant celles des processus industriels (Faille *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2001; Ryu et Beuchat, 2005; Salutiano *et al.*, 2010; Simoes *et al.*, 2011; Wijman *et al.*, 2007). En effet, les biofilms formés sur l'inox sont consistants et les densités cellulaires conséquentes.

B. cereus adhère également à d'autres matériaux tels que les polymères et les plastiques.

Le pouvoir d'adhésion aux surfaces et la formation de biofilm de *B. cereus* sont attribués aussi bien aux propriétés physico-chimiques de surface des spores (Taveron *et al.*, 2006; Ankolekar et Labbé, 2010; Faille *et al.*, 2010a; Lequette *et al.*, 2011), qu'à son potentiel génétique (Sauer, 2003; Hsueh *et al.*, 2006).

L'étude des biofilms dans le milieu des industries alimentaires relève, pour une grande part, du domaine de la sécurité sanitaire des aliments. Presque toutes les branches de l'industrie alimentaire, sont remises en cause par le problème des biofilms (Srey *et al.*,

2013). Leur formation sur les surfaces en contact avec les aliments est quasi inévitable et est favorisée par les conditions qui prévalent dans les établissements de transformation des aliments.

Cette plus grande capacité de résister rend leur élimination plus délicate. Ainsi le nettoyage des installations en industries alimentaires demeure un grand défi, voire même une nécessité quant à une meilleure hygiène en agro et en bio-industries (Simoes *et al.*, 2006 ; Simoes et Vieira, 2009).

Les biofilms sont la source de nombreux problèmes dans l'industrie agro-alimentaire, en termes d'hygiène alimentaire et d'altération des qualités organoleptiques des produits alimentaires (Somers et Wong, 2004).

Un biofilm est un complexe multicellulaire dynamique qui permet à des cellules bactériennes d'adhérer entre elles et sur une surface, en étant entourées d'une matrice protectrice. Cette dernière est composée d'une substance exopolymérique qui protège les bactéries des attaques extérieures comme les procédés de nettoyages (Wijman *et al.*, 2007).

La formation de biofilm comprend différentes étapes et le mécanisme de leur formation a été largement décrit par plusieurs chercheurs dans des études récentes (Verstraeten *et al.*, 2008; Liaqat *et al.*, 2013). Les différentes études montrent que les biofilms se forment de la même manière quelque soit l'environnement qu'ils colonisent (Pace *et al.*, 2006).

En outre, les biofilms constitués de flores d'altération ou de pathogènes à la surface des aliments (viande, fromage, légumes frais) et dans l'environnement industriel (ateliers, équipements, bâtiments) peut conduire à une contamination croisée. Diverses études indiquent que le mode de vie des biofilms, leur structure et leur composition conduisent à une augmentation de résistance aux produits antimicrobiens (Simoes *et al.*, 2006; Simoes et Vieira, 2009).

De plus, l'émergence de bactéries résistantes aux agents antimicrobiens conventionnels montre clairement que de nouvelles stratégies de contrôle des biofilms sont nécessaires (Simoes *et al.*, 2006).

5. Les conserves

5.1. Dangers microbiens : les spores bactériennes

Les *Bacillus* ont une importante capacité à produire des spores résistantes à des conditions environnementales défavorables (Logan et De Vos, 2009). Les spores permettent aux bactéries se retrouvant dans un milieu défavorable ou hostile (les températures et les pH extrêmes, l'exposition aux rayons UV, la diminution de la concentration des nutriments dans un environnement donné) de survivre dans un état de dormance (Raju *et al.*, 2006 ; Raju *et al.*, 2007). Dans cet état, les bactéries peuvent survivre pendant plusieurs mois voire des années en attendant que le milieu redevienne favorable à leur croissance. C'est seulement lorsque le milieu redevient favorable que les spores peuvent induire la germination pour redevenir des cellules végétatives (Castanha *et al.*, 2006; Driks, 2007).

5.1.1. Caractères généraux

En général, les spores de *Bacillus* ont une forme ovale à sphérique, voire cylindrique ; elles sont terminales ou non, mesurant en moyenne 1 μ m par 1 à 2 μ m (Tableau 1.4).

Tableau 1.4. Dimensions des spores de bactéries du genre *Bacillus*
(Carrera *et al.*, 2007)

	Longueur (μ m)	Diamètre (μ m)	Volume (μ m ³)
7 souches de <i>Bacillus anthracis</i>	de 1,23 à 1,67	de 0,81 à 0,86	de 0,420 à 0,642
<i>Bacillus cereus</i>	1,55	0,90	0,657
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1,61	0,80	0,549
<i>Autres Bacillus</i>			
<i>Bacillus atrophaeus</i>	1,22	0,65	0,273
<i>Bacillus megaterium</i>	1,73	0,88	0,696
<i>Bacillus sphaericus</i>	1,07	0,85	0,408
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	1,74	0,98	0,894
<i>Bacillus subtilis</i>	1,07	0,48	0,160

Les volumes moyens de *Bacillus anthracis* et *Bacillus thuringiensis*, sont semblables à ceux de *Bacillus cereus*.

Les autres espèces proches présentent de plus grands volumes de spores que *Bacillus anthracis*, comme on peut s'en rendre compte à la lecture du Tableau 1.4 (Carrera *et al.*, 2007).

Les spores sont donc des éléments de très petites dimensions, ce qui leur donnera la capacité de contaminer les denrées alimentaires à partir d'anfractuosités présentes dans les entreprises du secteur alimentaire.

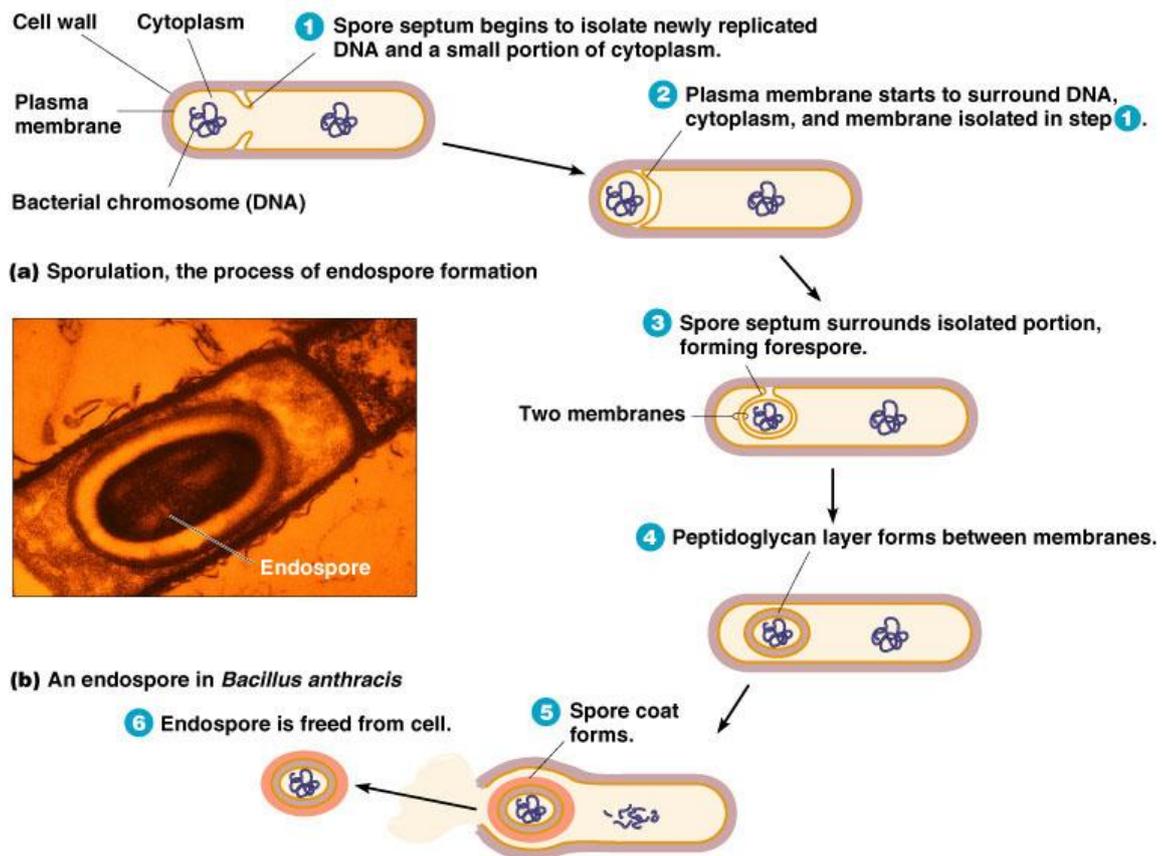
La spore se colore légèrement à la coloration de Gram. Elle est maintenue dans l'exosporium.

5.1.2. Composition des spores

5.1.2.1. La sporulation

La sporulation est provoquée par l'épuisement du milieu en substrat nutritif et peut nécessiter des conditions particulières : absence d'oxygène pour les clostridies, présence d'oxygène pour *Bacillus anthracis* (d'où l'interdiction d'autopsier en plein champ des animaux dont la mort semble être due au charbon bactérien). Le processus de sporulation débute à la fin de la phase de croissance exponentielle et il se déroule en 6 étapes (Figure 1.11). Le stade I ou stade du filament axial se caractérise par la présence d'un matériel nucléaire qui s'étend sur toute la longueur de la cellule et qui correspond à 2 génomes. Au stade II, les deux génomes se séparent et en même temps la membrane cytoplasmique s'invagine près d'un pôle de la cellule pour former un septum de sporulation qui partage la cellule en deux parties inégales. Ce septum de sporulation va envelopper le cytoplasme de la plus petite partie pour former une préspore caractéristique du stade III. Entre les deux membranes limitant la préspore se forme la paroi sporale puis apparaît rapidement le cortex dont la présence est caractéristique du stade IV. Aux stades V et VI, les tuniques sont élaborées et, après maturation, la cellule mère se lyse et libère la spore mature.

Au cours de la sporulation il peut y avoir synthèse de différentes substances: antibiotiques, toxines (entérotoxine de *Clostridium perfringens*) ou corps parasporal (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*) contenant des toxines létales pour les insectes (Euzéby, 2002).



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Figure 1.11 : Les étapes de la sporulation (Qiu, 2004)

5.1.2.2. Structures impliquées dans la résistance des spores

Les spores libres sont capables de résister à la dessiccation, aux radiations UV et aux agents chimiques et physiques (Setlow et Johnson, 2007). Cette résistance est assurée grâce aux différentes structures de la spore. La structure centrale de la spore, appelée protoplaste (Figure 1.12), contient de l'ADN, les ARN et la plupart des enzymes de la spore.

Le protoplaste est entouré de la membrane interne (Figure 1.12). Cette membrane ne permet pas le passage de petites molécules vers le protoplaste (Setlow, 2007). Ainsi, par son imperméabilité, la membrane interne est essentielle pour la résistance des spores aux agents chimiques (Cortezzo *et al.*, 2004). Le cortex, situé entre la membrane interne et la membrane externe, permet de maintenir le protoplaste déshydraté. Il exerce une contrainte mécanique sur l'intérieur de la spore et est ainsi indispensable à sa résistance (Nguyen Thi Minh, 2009). La membrane externe, entourant le cortex, est perméable et en cela ne semble pas intervenir dans les mécanismes de résistance des spores. Les tuniques situées en périphérie de la membrane externe sont perméables aux agents chimiques (Henriques et Moran, 2007; Setlow, 2007).

Les tuniques limitent l'entrée des molécules à l'intérieur de la spore et exercent également une contrainte mécanique vers l'intérieur de la spore, évitant ainsi son gonflement (Nguyen Thi Minh, 2009). Les tuniques ne jouent pas de rôle significatif dans la résistance thermique des spores ni dans la résistance aux radiations (Eichenberger, 2007). Néanmoins, elles sont indispensables à l'intégrité de la spore, car une défaillance dans les tuniques entraîne une instabilité et une germination spontanée de la spore (Henriques et Moran, 2007).

Enfin, une structure externe additionnelle, appelée l'exosporium ; ces structures sont décrites comme une masse transparente ronde en forme d'anneau entourant la spore (Carrera *et al.*, 2007). Comme présenté sur la Figure 1.12, l'exosporium est observable autour des spores de *B. cereus* sensu lato mais n'a jamais été observé autour des spores de *B. subtilis* et *B. licheniformis* (Faille *et al.*, 2010).

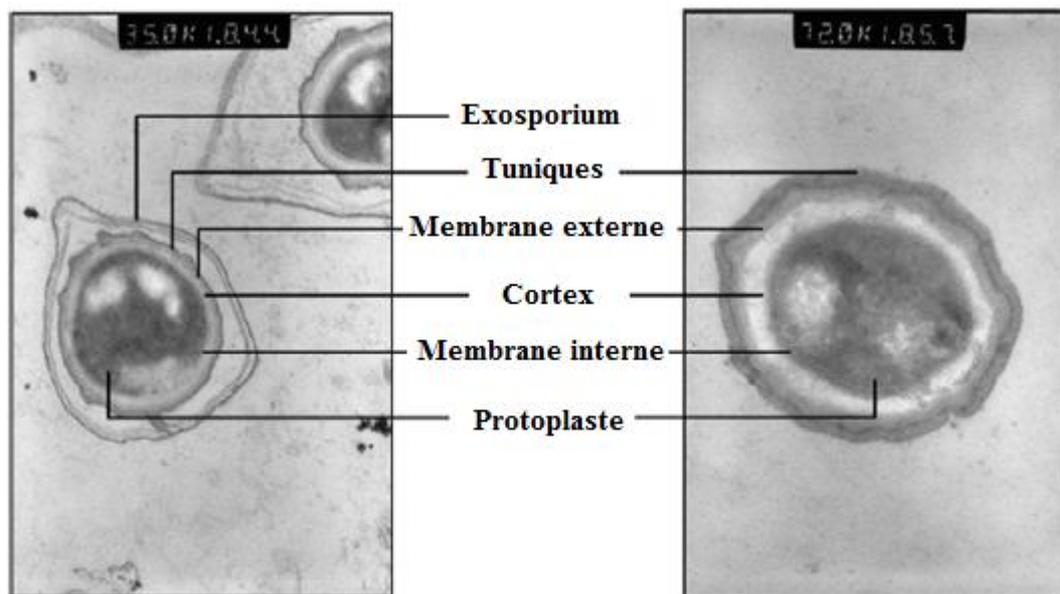


Figure 1.12. Photographie en microscopie électronique d'une spore de *B. weihenstephanensis* KBAB4 produite à 30°C (à gauche, x 35000) et d'une spore de *B. licheniformis* AD978 produite à 45°C (à droite, x72000).

La structure de l'exosporium de la spore de *Bacillus cereus* est présentée dans la Figure 1.13. L'exosporium est composé d'une partie inférieure lamellaire et d'une partie supérieure hérissée ou « hair-like » (en « chevelu ») avec un aspect de « duvet » (Gerhardt et Ribic, 1964).

Cette structure irrégulière de la surface de la spore et de l'exosporium facilitera l'adhésion des spores aux substrats en entreprises du secteur alimentaire (Figure 1.13).

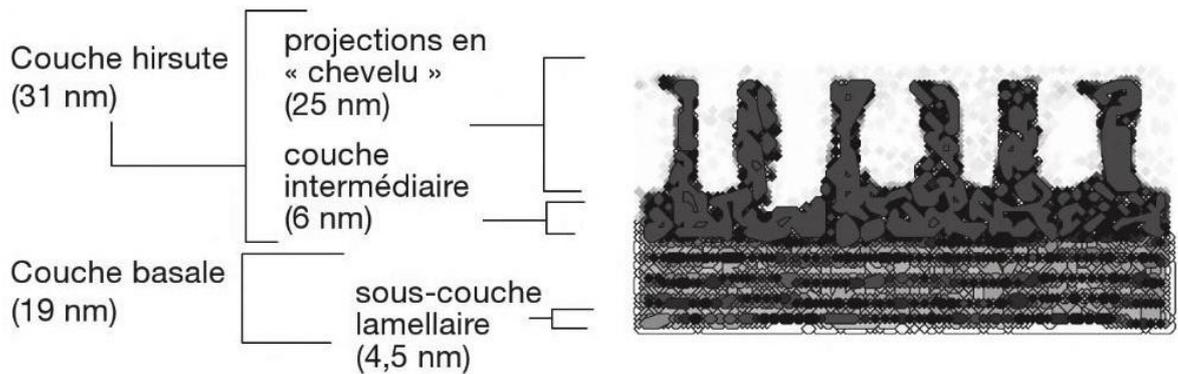


Figure 1.13. Structure de l'exosporium de *B. cereus* (Gerhardt et Ribí, 1964).

5.2. Maîtrise des dangers microbiens: traitement thermique d'appertisation

5.2.1. Principe

Le traitement thermique est aujourd'hui la technique de décontamination la plus communément utilisée en industrie agroalimentaire (Farkas, 2007). En termes de sécurité alimentaire, il a pour objectif de détruire ou d'inhiber totalement, d'une part les enzymes, et d'autre part les microorganismes et leurs toxines, dont la présence ou la prolifération pourrait altérer la denrée considérée ou la rendre impropre à l'alimentation humaine (Décret n°55-241, 1955).

L'appertisation (Appert, 1810) consiste à stériliser par la chaleur des denrées périssables dans des contenants hermétiques (boîtes métalliques, bocaux). Sont considérées comme conserves les denrées alimentaires, d'origine animale ou végétale périssables, dont la conservation est assurée par un procédé associant le conditionnement dans un récipient étanche à l'eau, aux gaz et aux microorganismes, à toute température inférieure à 55°C et un traitement par la chaleur (Décret n°55-241, 1955). L'appertisation est largement utilisée aujourd'hui pour la conservation à long terme des denrées alimentaires pouvant aller de plusieurs mois à quelques années.

5.2.2. Efficacité

Le traitement thermique est caractérisé par le couple temps/température. Les premiers travaux de thermorésistance microbiologique se sont focalisés sur l'expression de la réponse des microorganismes. L'expression de la cinétique de destruction en base décimale a permis d'introduire le terme de "durée de réduction

décimale". Cette durée, appelée D, correspond au temps nécessaire (en minutes) pour réduire la population d'un facteur 10, à une température donnée (Katzin *et al.*, 1942).

La cinétique de destruction des microorganismes est, dans la grande majorité des cas, décrite par l'équation suivante (1):

$$\log N = \log N_0 - \frac{t}{D} \quad (1)$$

avec t le temps de traitement, N₀ la population initiale, N la population survivante au temps t et D la durée de réduction décimale (Gaillard, 2003).

Un autre paramètre, appelé paramètre de thermorésistance Z, correspond à l'élévation de température nécessaire pour réduire au dixième la durée de réduction décimale. Cette cinétique d'inactivation est encore actuellement la plus utilisée, et sert de référence au traitement thermique, ainsi qu'à la classification des espèces microbiennes.

Même si de nombreux travaux définissent différents paramètres pour évaluer l'efficacité des traitements thermiques, le modèle linéaire et les paramètres D et Z sont encore largement utilisés. De nombreuses données exploitant ces paramètres sont accessibles, aussi bien pour des spores que pour des cellules végétatives. Le Tableau 1.5 montre quelques uns des exemples de valeurs de D et Z rencontrées dans la littérature.

Tableau 1.5. Niveaux de thermorésistance approximatifs de cellules végétatives bactériennes (Aguirre *et al.*, 2009)

Type d'aliments et microorganismes	D value (min) à:		Z value (°C)
	121°C	100°C	
Aliments peu acides (pH>4.6)			
Aérobies thermophiles			
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	4.0-4.5	3 000	7
Anaérobies mésophiles			
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.1-1.5		9-13
<i>Clostridium botulinum types A et B</i>	0.1-0.2	50	10
<i>Clostridium perfringens</i>		0.3-20	10-30
Aérobies mésophiles			
<i>Bacillus licheniformis</i>		13	6
<i>Bacillus subtilis</i>		11	7
<i>Bacillus cereus</i>		5	10
<i>Bacillus megaterium</i>		1	9
Aliments acides (pH≤4.6)			
Aérobies thermotolérants			
<i>Bacillus coagulans</i>	0.01-0.1		
Aérobies mésophiles			
<i>Bacillus polymyxa</i>		0.1-0.5	

5.2.3. Quantification

5.2.3.1. Nombre n de réductions décimales

La manière la plus directe de quantifier un traitement thermique est de caractériser celui-ci par son efficacité sur une souche cible donnée, c'est-à-dire par le taux de réductions atteint (N/N_0) après le traitement. Cette efficacité est souvent exprimée par le taux de réduction décimal noté n et défini par :

$$n = \log \frac{N_0}{N} \quad (2)$$

5.2.3.2. Notion de valeur stérilisatrice (F)

La valeur stérilisatrice est un concept répandu dans l'industrie de la pasteurisation et de l'appertisation. Elle est utilisée pour quantifier un traitement thermique indépendamment de la cible visée. Elle correspond à tout traitement entraînant le même taux de destruction qu'un traitement à la température de référence (121,1°C) pendant t minutes :

$$F = t_{121,1^0 C} \quad (3)$$

Lorsque le traitement est réalisé à une température différente de 121,1°C, le temps nécessaire pour atteindre la valeur stérilisatrice F souhaitée est, selon la relation de Bigelow :

$$t = F_T \cdot 10^{\frac{T-T^*}{z}} \quad (4)$$

où t est le temps de traitement à la température T pour atteindre la valeur stérilisatrice $F_{121,1}$. La valeur de z est conventionnellement fixée à dix (en référence à la valeur relative à *Clostridium botulinum*).

Le choix du micro-organisme de référence *Clostridium botulinum* est lié au fait que c'est le micro-organisme, rencontré en agroalimentaire, qui résiste le plus aux conditions du traitement et à son pouvoir de fabrication d'une neurotoxine extrêmement dangereuse.

5.2.3.3. Relation avec la durée de réduction décimale :

Par définition, la durée de réduction décimale D_T est le temps de traitement à la température T nécessaire pour réduire une population d'un facteur 10. On peut alors écrire :

$$\log \frac{N_0}{N} = \frac{t}{D_T} = n \quad (5)$$

Où n est le nombre de réductions décimales appliqué. On en déduit :

$$t_T = n.D_T \quad (6)$$

L'équation 5 devient dans les conditions standards de la température :

$$t_{T^*} = F_{T^*} = n.D_{T^*} \quad (\text{Formule de Stumbo}) \quad (7)$$

Jusqu'en 1996, un produit appertisé était commercialisable si le traitement thermique suffisait à réduire de 10^{12} une flore de spores de *Clostridium botulinum* soit $F_{121.1^\circ\text{C}}^{10} = 12.D_{121.1^\circ\text{C}}$. Le temps de réduction décimale pour *Cl. Botulinum* étant de 12 s, il faut donc un traitement minimum de 144 secondes soit 2.4 minutes soit 2.4 unités stérilisatrices.

La nouvelle réglementation européenne a supprimé cette règle et rend le producteur responsable de sa fabrication.

5.3. Effet du pH sur la thermorésistance

La résistance thermique d'un micro-organisme varie en fonction des conditions physiologiques et physico-chimiques dans lesquelles il se trouve avant, pendant et après le traitement thermique. Les facteurs modifiant éventuellement l'allure de la destruction thermique des micro-organismes sont :

- des facteurs intrinsèques : thermo-résistance variable selon les espèces, les formes végétatives ou sporulées, l'âge, l'état physiologique ...
- des facteurs environnants : pH, l'activité de l'eau, présence de lipides et de protéines, pression osmotique, les sels minéraux. Pour chaque facteur physique ou chimique du milieu de traitement jouant un rôle sur la thermo-résistance des micro-organismes, on peut mettre en évidence deux effets distincts. D'une part, on observe un effet s'exerçant sur les spores au moment du traitement thermique. D'autre part, la germination et la recroissance qui suit le traitement thermique sont également influencées par la composition physico-chimique du milieu.

Sur la multitude de facteurs pouvant influencer la résistance thermique des micro-organismes, qu'ils soient physiques, chimiques ou biologiques, certains se distinguent par leur effet prépondérant. Parmi eux probablement le facteur concernant le plus l'industrie alimentaire, compte tenu de l'acidité d'une grande majorité des produits alimentaires et de son effet substantiel sur les spores bactériennes chauffées.

Le pH du milieu de sporulation influence la formation des spores (Gaillard *et al.*, 1998).

Certains auteurs montrent également que les pH proches des limites de sporulation augmente le temps de sporulation et réduit la concentration finale des spores obtenues. A pH 8,0, 4 jours sont nécessaires pour obtenir $2,5 \cdot 10^9$ spores/ml de *B. subtilis* ATCC31324, alors que 20 jours sont nécessaires pour produire $1,5 \cdot 10^5$ et $1,6 \cdot 10^7$ spores/ml à pH 6,0 et pH 10,0 respectivement (Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011). Selon ces études, les meilleurs taux de sporulation, concentrations en spores et temps de sporulation sont observés pour des sporulations à pH voisins de la neutralité.

La résistance de la plupart des bactéries et des spores bactériennes à la chaleur, est maximale dans une zone de pH proche de la neutralité, et décroît rapidement lorsque le milieu est plus acide ; il s'ensuit que, dans les produits acides, la destruction des micro-organismes par la chaleur est relativement plus facile que dans les autres.

Le *Clostridium botulinum* est la bactérie pathogène la plus résistante à la chaleur : c'est pourquoi elle est prise comme germe de référence pour l'établissement de barème de stérilisation. Or, contrairement aux levures et aux moisissures, la plupart des bactéries et surtout *C. botulinum* sont incapables de proliférer et de produire leurs toxines dans un milieu acide de pH inférieur à 4,5.

Cela a conduit à définir deux types de produits qui subiront des traitements différents

- Conserves acides (pH < 4,5)

Elles ne permettent pas le développement des germes sporulés, comme *Clostridium botulinum* et autres *Clostridium* toxigènes, ni des bactéries des toxi-infections alimentaires (*Salmonelle*, *Staphylocoque*) qui, cependant, peuvent survivre. Le traitement thermique doit être suffisant pour détruire celles-ci, ainsi que la flore acidophile (levure, moisissures, bactéries acidophiles) et pour inhiber les enzymes d'origine organique.

- Conserves non acides (pH > 4,5)

Le traitement thermique doit garantir «un effet stérilisateur» adéquat contre les spores de *C. botulinum* et a fortiori contre les autres bactéries pathogènes moins résistantes. Les toxines doivent être absentes après stérilisation et les enzymes organiques ou microbiennes inactivées.

ANALYSE REGLEMENTAIRE DES CONSERVES VEGETALES A L'ETUDE

1. Contrôle de stabilité : norme AFNOR NF V 08-401

1.1. Introduction

La présente norme (JORAD) décrit des méthodes d'examen permettant de vérifier la stabilité biologique d'individus prélevés à partir d'un lot de conserves et reconnus sans défauts susceptibles d'influer sur les résultats.

Elle est applicable aux produits de pH supérieur ou égal à 4,5.

Le contrôle comporte un examen préliminaire de l'emballage: les boîtes ne doivent pas présenter de défauts.

Dans certains cas, les défauts sont visibles à l'œil nu, qu'il s'agisse de phénomènes d'altération rapide conduisant à des « bombages » ou des « flochages » (définition ci-après) ou qu'il s'agisse tout simplement d'un défaut de sertissage.

Les déformations qui peuvent éventuellement apparaître sont de trois origines différentes. Il peut s'agir de déformations dues à une altération d'origine microbienne, à une modification de nature chimique ou à des déformations d'origine physique. Suivant l'origine et l'intensité du phénomène, nous différencions la boîte floche, bombée et fuitée.

Par différence à une boîte « normale » qui ne présente pas de défaut majeur, une boîte est dite « floche » lorsque ses deux fonds, ou l'un d'entre eux, présentent une légère convexité qui disparaît sous la pression des doigts mais réapparaît lorsque cette pression cesse. Est dite « floche » aussi une boîte dont un seul des fonds présente une légère convexité qui disparaît sous la pression des doigts mais se transmet au fond opposé.

Le flochage se produit souvent dans le cas de mise en boîte de produits qui ont commencé à fermenter.

Une boîte est dite « bombée » lorsque les deux fonds (ou l'un des fonds) se sont déformés sous l'action d'une pression intérieure en prenant une forme convexe plus ou moins accentuée et lorsqu'ils ne peuvent pas reprendre leur position normale même sous une forte pression (AFNOR, 1976) Une boîte est dite « fuitée » lorsqu'elle présente un défaut d'étanchéité visible ou mis en évidence par les examens prescrits par les normes. Enfin, le becquet est une déformation permanente des fonds ou du couvercle dans le cas d'un emballage en verre. Il est généralement provoqué par une surpression interne trop importante surtout au cours de la phase de refroidissement-détente.

1.2. Echantillonnage : choix des individus

Pour réaliser l'ensemble des examens il est nécessaire de disposer d'au moins 5 individus «normaux» y compris un individu servant de témoin.

Notre étude a porté sur 10 lots de 5 boîtes de conserves de petits pois **importées**, identiques entre elles et en apparence normales. Ceux-ci ont été prélevés au niveau du circuit de distribution de la ville d'Annaba. On entend par lot, une quantité déterminée de conserves fabriquées le même jour dans des conditions sensiblement homogènes.

1.3. Principe du contrôle

Le contrôle de stabilité se fait aux moyens des épreuves suivantes :

- Incubation de deux individus à 37°C
- Incubation de deux individus à 55°C
- Examen de l'aspect extérieur (en cours d'incubation et après incubation).
- Examen des caractéristiques suivantes sur des individus incubés et sur un témoin non incubé: Aspect, odeur, texture, détermination du pH, examen microscopique.

En pratique, de nombreux laboratoires effectuent l'incubation à 30°C plutôt qu'à 37°C

1.4. Méthodologie

1.4.1. Examen préliminaire

- Relever les différentes caractéristiques des individus retenus : Nature du produit, type et format de l'emballage, indications réglementaires et autres inscriptions figurant sur l'emballage l'étiquette ou l'illustration.
- Repérer chaque individu par un marquage indélébile.
- Enlever éventuellement l'étiquette en s'assurant à nouveau par un examen attentif que ces individus sont "normaux".
- Le témoin doit être conservé à la température du laboratoire à la condition que celle-ci ne dépasse pas 25° C.

1.4.2. Incubation

Les conditions d'incubation (température et durée) ont été choisies pour fournir les garanties optimales d'efficacité du contrôle.

L'incubation, préliminaire à l'examen microbiologique, a pour but :

- de permettre la germination des spores;
- de favoriser la multiplication des formes végétatives en les plaçant dans des conditions thermiques idéales à leur développement;
- d'évaluer la stabilité du produit : la multiplication des micro-organismes entraîne l'apparition de signes qui échappent lors de l'examen initial (flat-sour, bombage).

Les individus doivent être disposés, sur un papier filtre ou un papier kraft, dans la position la plus favorable pour détecter une fuite éventuelle.

L'incubation est effectuée comme suit :

- Placer dans l'étuve réglée à 30°C deux des individus choisis et les y laisser 21 jours.
- Placer dans l'étuve réglée à 55°C deux des individus choisis et les y laisser 10 jours. L'incubation ne doit pas dépasser 10 jours de manière à éviter l' « auto stérilisation » des thermophiles acidifiants.
- Pratiquer des examens journaliers de leur aspect extérieur et retirer de l'étuve les individus présentant un bombage ou une fuite.

1.4.3. Examen après incubation

1.4.3.1. Aspect extérieur des boîtes

Noter l'aspect extérieur des boîtes. Les laisser pendant 24 heures à la température ambiante avant de procéder aux opérations suivantes:

- **Nettoyage et désinfection des boîtes**
 - Nettoyer l'emballage en le brossant avec une solution de détergent spécialement autour des serties.
 - Placer l'emballage à l'intérieur de l'enceinte de prélèvement. Passer sur l'emballage et comme précédemment en insistant sur les serties, un coton hydrophile imbibé d'une solution d'eau de javel. Recommencer avec un coton hydrophile imbibé d'alcool à 95% en volume.
 - Laisser sécher.
- **Ouverture de l'emballage**

Immédiatement avant l'ouverture, passer un coton hydrophile imbibé d'alcool à l'endroit où l'on va pratiquer l'ouverture. Les boîtes à l'étude sont à ouverture facile.

1.4.3.2. Examen du produit

- **Etude des caractéristiques organoleptiques**

Noter les modifications qui auraient pu survenir par rapport au témoin, concernant l'odeur, l'aspect et la texture (ne pas goûter les conserves incubées).

- **Détermination du pH**

Le pH est déterminé suivant la norme NF V 08-406 (1996). Il est mesuré sur le produit en l'état au moyen d'un pH-mètre muni d'une électrode combinée de type classique.

Il est recommandé de faire plusieurs mesures pour chaque individu. Dans le cas des produits hétérogènes comme le cas de nos conserves, il est mesuré sur le produit après homogénéisation.

- **Examen microscopique**

Faire une application directe sur une lame de verre en réalisant des étalements fins à partir du produit brut. Sécher et fixer à la chaleur.

Effectuer une coloration de Gram et observer 20 champs au microscope. Noter la Morphologie de la flore microbienne et le nombre de germes par champ microscopique. Calculer le facteur $R = n/n_0$ où n_0 est le nombre moyen de germes pour l'individu non incubé et n est le nombre moyen de germes pour un individu incubé.

1.4.4. Interprétation des résultats

Une conserve est stable si elle présente l'ensemble des trois caractéristiques suivantes:

- Absence de déformation de l'emballage
- Différence de pH inférieure ou égale à 0,5 unité pH par rapport au témoin.
- Absence de variation de la flore microbienne du point de vue quantitatif: Le rapport n/no doit être inférieur à 100.

2. Contrôle de stérilité commerciale ou industrielle

2.1. Introduction

La stérilité industrielle implique l'absence de microorganismes revivifiables pouvant être préjudiciables pour la santé humaine ou pouvant altérer le produit.

L'application des barèmes choisis en industrie n'implique pas la stérilité absolue du produit. On ne peut exclure que des microorganismes résistent sans être cultivables ou sans développement dans les conditions de conservation du produit. Il n'y a pas de stérilité absolue. On parle de stérilité industrielle ou commerciale.

2.2. Méthodologie

Le prélèvement de 0,1 ml a été réalisé à partir du produit brut : les petits pois sont écrasés dans la boîte même, à l'aide d'une pipette stérile après homogénéisation du produit. L'ensemencement en stries transversales a été effectué à raison de deux boîtes de Pétri pour chaque milieu utilisé : gélose nutritive ordinaire à 0,2 % d'amidon (Peptone 10g/l ; Extrait de viande 5g/l ; Chlorure de sodium 5g/l ; Gélose 15g/l ; Amidon 2g/l) et gélose caso-Agar à 0,2 % d'amidon (Peptone de caséine 15g/l ; Peptone de farine de soja 3g/l ; Chlorure de sodium 5g/l ; Gélose 15g/l ; Amidon 2g/l).

2.3. Conclusion d'analyses

Une conserve végétale est déclarée propre à la consommation humaine lorsqu'elle:

- ne présente aucun défaut au niveau de l'emballage;
- ne présente pas de modifications des caractères organoleptiques ou d'anomalies microscopiques;
- satisfait au test de la stabilité biologique;
- satisfait au test de la stérilité industrielle;
- ne renferme pas de toxines dangereuses pour la santé humaine.

Dans le cas où une conserve végétale ne satisfait pas à l'un des critères fixés ci-dessus elle sera considérée comme impropre à la consommation humaine.

3. Résultats

3.1. Contrôle de stabilité

Un aspect farineux a caractérisé le contenu des boîtes de conserve de petits pois analysées. L'exposition de ces dernières, à 30°C pendant 21 jours et à 55°C pendant 7 jours n'a entraîné aucune modification visible du contenant et du contenu. L'emballage n'a subi aucune déformation, les caractéristiques organoleptiques et le pH ont été préservés. Les résultats obtenus pour le pH sont en moyenne de 6.50 pour les boîtes témoins, de 6.28 et de 6.20 respectivement pour les boîtes incubées à 30°C et à 55°C. Les différences moyennes de pH entre les boîtes de conserve incubées à 30°C et 55°C par rapport aux témoins sont respectivement égales à 0.22 et 0.30 donc inférieures à 0.5 unité.

Après coloration de Gram, nous avons observé une population bactérienne aussi abondante que variée, constituée de formes bacillaires plus ou moins longues, à l'état isolé ou regroupées en chaînettes Gram+ et de quelques spores. Seule, la présence de cette flore largement supérieure à 30 bactéries sur 20 champs microscopiques et un rapport n/n0 supérieur à 100, met en doute la stabilité donc «la stérilité commerciale» des conserves de petits pois étudiées.

3.2. Contrôle de stérilité

Dans la totalité des boîtes de conserve de petits pois incubées à 30°C, il ya eu un développement très important de cultures sur les deux milieux utilisés, à savoir, la gélose nutritive et la gélose caso-agar additionnées d'amidon. Il n'y a eu aucune pousse dans les conserves incubées à 55°C.

Les résultats du contrôle de stabilité nous ont orientés vers la recherche d'une microflore aérobie mésophile sporulée.

4. Discussion

Pour toutes les boîtes de conserves analysées (témoins et incubées), la présence d'amidon révélée par un aspect farineux, prouve que les petits pois n'ont pas été mis

en boîtes juste après la récolte. Les petits pois frais entament le processus de conversion des sucres en amidon dès le moment où ils sont cueillis (Bédard, 2006).

L'exposition des boîtes de conserves de petits pois, à 30°C pendant 21 jours et à 55°C pendant 7 jours n'a entraîné aucune modification visible du contenant et du contenu. L'emballage n'a subi aucune déformation, les caractéristiques organoleptiques et le pH ont été préservés. Les résultats obtenus pour le pH sont en moyenne de 6.50 pour les boîtes témoins, de 6.28 et de 6.20 respectivement pour les boîtes incubées à 30°C et à 55°C. Les différences moyennes de pH entre les boîtes de conserve incubées à 30°C et 55°C par rapport aux témoins sont respectivement égales à 0.22 et 0.30 donc inférieures à 0.5 unité.

Ces valeurs prouvent qu'il n'y a pas eu d'acidification c'est-à-dire pas de « flat-sour ». Ceci nous a permis d'écarter les microorganismes responsables de ce type d'altération qui est dû principalement aux bactéries anaérobies facultatives thermophiles dont *Geobacillus stearothermophilus* (De Vos *et al.*, 2009) et *B. coagulans*. Ce dernier est un thermophile facultatif qui ne se manifeste que dans les conserves à pH acide inférieur à 4.5. Les bactéries sporulées thermophiles sont reconnues comme étant la cause principale des altérations des conserves alimentaires (Prévost *et al.*, 2010).

De même, aucun fuitage n'est apparu ; le papier buvard sur lequel ont été déposées ces boîtes de conserve au cours de l'incubation, est resté sans tache. Aucun bombage n'a été détecté ; on observe également l'absence de couleur, d'odeurs putride, butyrique et de production d'H₂S. Dans les conserves des légumes à pH supérieur à 4.5, comme les petits pois, le bombage (H₂, CO₂) avec production H₂S et d'odeurs putrides ainsi que le bombage sans production d'H₂S suivi d'odeurs butyriques sont l'œuvre de bactéries anaérobies sporulées comme les *Clostridium* mésophiles et thermophiles très gazogènes (Chen *et al.*, 2005; Guiraud, 2003; Liu et Shen, 2004). Ce résultat révèle ainsi l'inexistence de contamination de ces boîtes par ce type de bactéries.

Le défaut de stérilisation, que la boîte soit bombée ou non, est caractérisée par une flore microbienne composée uniquement d'espèces thermorésistantes. Dans notre étude, les espèces de *Bacillus* présentes ne sont pas gazogènes ou n'ont pas rencontré des conditions favorables à la production d'une quantité de gaz suffisante, il n'y a pas eu de bombage.

Après coloration de Gram, nous avons observé une population bactérienne aussi abondante que variée, constituée de formes bacillaires plus ou moins longues, à l'état isolé ou regroupées en chaînettes Gram+ et de quelques spores. Seule, la présence de

cette flore largement supérieure à 30 bactéries sur 20 champs microscopiques (Guiraud et Rosec, 2004) ainsi qu'un facteur R dépassant grandement 100 germes met en doute la stabilité biologique et « la stérilité commerciale » des conserves de petits pois étudiées.

L'apparition de cultures abondante sur gélose nutritive et caso-agar certifie que les conserves à l'étude ne répondent pas à l'un des critères microbiologiques d'usage quant à la stérilité industrielle ou commerciale. Ce critère préconise l'absence de microorganismes **revivifiables** pouvant être préjudiciables pour la santé humaine ou pouvant altérer le produit.

ANALYSE MICROBIOLOGIQUE CLASSIQUE

1. Introduction

Les techniques traditionnelles de la microbiologie reposent sur la mise en culture d'un inoculum dans un milieu spécifique. La composition du milieu, la température d'incubation et la nature de l'atmosphère dans laquelle est incubé le milieu permettent de créer une pression de sélection et de cultiver sélectivement une population bactérienne.

La flore microbienne des produits bruts est variable. Les traitements de préparation et le traitement thermique de conservation, différent selon le type de conserve en fonction de la nature du produit, vont la modifier. Ces traitements entraînent la sélection de germes plus ou moins thermorésistants.

2. Préparation de la suspension et mise en culture

Une suspension a été préparée à partir d'un échantillon de 25 g de produit prélevé selon la norme AFNOR NF V08 – 403 dans les deux phases et broyé en présence de 100 ml de tryptone-sel (Guiraud, 2003).

L'ensemencement en stries transversales a été effectué en surface d'une gélose nutritive et gélose caso-agar supplémentée de 0,2% d'amidon (lever la dormance), à raison de deux boîtes de Pétri pour chaque milieu de culture. Les boîtes ont été incubées couvercle vers le bas à 30°C pendant 72h avec des lectures toutes les 24h.

3. Repiquage et conservation des souches

Toutes les souches obtenues ont été repiquées sur gélose nutritive inclinée et conservées à +4°C pour les examens qui vont suivre.

4. Orientation préliminaire en faveur de l'identification du genre des cultures obtenues

4.1. Etude des caractères cultureux et mobilité

L'aspect des colonies a été analysé et a permis de déterminer la morphologie (taille, forme, contour, relief...). La mobilité a été appréciée en utilisant la gélose mobilité (Trypticase 10g/l ; Extrait de levure 2,5g/l ; Dextrose 5g/l ; Na₂HPO₄ 2,5g/l ; Gélose 3g/l) (USFDA, 2005).

4.2. Etude microscopique

L'analyse microscopique après coloration de Gram nous a permis de déterminer la morphologie des bactéries, leur mode de regroupement, le type de Gram ainsi que la présence ou l'absence de spores.

4.3. Recherche des enzymes respiratoires et du type respiratoire

4.3.1. Recherche de la catalase

Ce test, standardisé pour les identifications bactériologiques (Prescott *et al.*, 2007), a été réalisé sur des colonies pures, bien isolées et à plusieurs reprises.

Cette enzyme ferro-protéique, présente chez de nombreuses bactéries, est capable de catalyser l'hydrolyse de l'eau oxygénée en libérant l'oxygène. La mise en évidence d'une bactérie « catalase positive » se manifeste par un dégagement important d'oxygène.

4.3.2. Recherche de l'oxydase

Comme pour la recherche de la catalase, ce test est standardisé pour les identifications bactériologiques (Prescott *et al.*, 2007).

Il s'agit d'une réaction colorée, qualitative, pour la mise en évidence de la phénylène diamine oxydase des bactéries, à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder le réactif : N diméthyl paraphénylène diamine. Cette oxydation se manifeste par l'apparition d'une coloration mauve.

4.3.3. Type respiratoire

On utilise la gélose Viande-Foie (VF) (Extrait de viande 10g/l ; Peptone 20g/l ; Extrait de levure 10g/l ; Glucose 5g/l ; Gélose 15g/l) profonde en tube que l'on incube à 30°C pendant 24 heures.

4.4. Mise en évidence de la sporulation

L'aptitude à la sporulation a été révélée par le test de thermorésistance. Une culture âgée (3 à 10 jours) sur bouillon nutritif (Peptone 10g/l ; Extrait de viande 5g/l ; Chlorure de sodium 5g/l) additionné de 0,004% de sulfate de Manganèse a subi 10 mn de chauffage au bain Marie à 80°C. Le sulfate de Manganèse est un agent favorisant la sporulation. Le tube de bouillon nutritif est ensuite repiqué sur un autre bouillon nutritif et incubé à 30°C pendant 2 à 5 jours. S'il y a développement microbien, il y a présomption de la sporulation. Il faut toujours confirmer cette présomption par un examen microscopique.

5. Orientation biochimique en faveur de l'identification de l'espèce des cultures isolées

5.1. Introduction

L'identification des *Bacillus* est encore considérée comme délicate malgré les clefs d'identification et les tableaux de résultats qui sont depuis assez longtemps à la disposition des bactériologistes.

De plus en plus, l'importance des *Bacillus* est reconnue et leur incidence sur les productions agricoles et industrielles ou leurs interférences sur le plan médical rendent leur identification complète très souhaitable.

Le genre *Bacillus* est très étendu, il est donc nécessaire d'utiliser un nombre important de tests pour réussir à les classer. Divers travaux ont montré l'intérêt et la fiabilité du système API 20E et API 50CHB pour l'identification rapide de la plupart des espèces du genre *Bacillus*.

Le système API BioMérieux est une version miniaturisée, standardisée et automatisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries. Le système se présente sous forme de galeries d'identification, avec une série de tubes-cupules prête à l'emploi et contenant des substrats lyophilisés nécessaires aux différents tests biochimiques.

L'exploitation des résultats se fait suivant une méthode probabiliste numérisée.

Le principe de base est de réaliser un calcul de probabilités à partir :

- d'une base de données, c'est-à-dire essentiellement des tableaux de pourcentage de positivité de caractères pour les différents taxons (les tableaux "API")
- du profil obtenu au laboratoire

Ce calcul consiste à :

- Calculer la probabilité de chaque taxon : c'est le produit des probabilités élémentaires, c'est-à-dire la probabilité pour un taxon déterminé de l'obtention du caractère du profil pour ce taxon. Cette probabilité élémentaire est simplement le pourcentage quand le caractère est positif et 100 moins le % si le caractère est négatif.
- Déterminer le bon taxon qui est celui dont la probabilité est la plus forte.

5.2. Biotypage par microgalerie API 20E

La galerie API 20E associe 20 tests enzymatiques et de fermentation des sucres, permet l'identification des bacilles Gram négatifs oxydase négative de type entérobactéries (Holmes *et al.*, 1978) et de bacilles Gram positifs du genre *Bacillus*.

Les galeries ont été inoculées, suivant les recommandations du fabricant et incubées à une température de 30°C pendant 24 à 48 heures.

Pour l'exploitation des résultats, nous avons eu recours à la matrice d'identification des *Bacillus* établi par Michel Cavalla en 2003, en utilisant le tableur Excel.

La base de données est fournie sous la forme d'un tableau (Annexe 1) donnant, pour chaque taxon et pour chaque caractère, sa probabilité d'être positif (Joffin et Leyral, 2006).

5.3. Recherche d'enzymes complémentaires

D'autres tests complémentaires tels que la mise en évidence de la caséinase, la lécithinase et l'amylase ont été réalisés respectivement sur gélose au lait, gélose au jaune d'œuf et gélose à l'amidon (Delarras, 2014).

5.3.1. Hydrolyse de la caséine

Elle est mise en évidence sur une gélose au lait : gélose blanche à 2.5 à 3% d'agar en solution dans l'eau dans laquelle on ajoute la même quantité de lait stérile. L'ensemencement se fait par touches ou par stries centrales.

L'hydrolyse de la caséine se traduit par un halo clair autour de la culture.

5.3.2. Hydrolyse de la lécithine

Elle est étudiée de façon classique par ensemencements par touches ou par stries centrales d'une gélose nutritive additionnée de jaune d'œuf stérile à 10% en eau physiologique et incubée à 30°C pendant 24 heures.

L'éclaircissement du jaune d'œuf autour des colonies et un précipité en halo traduisent la dégradation de la lécithine.

5.3.3. Hydrolyse de l'amidon

Mise en évidence sur gélose nutritive ordinaire contenant 10g/l d'amidon soluble, coulée en boîte de Pétri etensemencée par touches ou par stries centrales.

Après incubation à 30°C pendant 24 heures, la culture est recouverte de lugol. L'absence des colorations noires autour des colonies traduit l'hydrolyse de l'amidon.

5.4. Etude biochimique par microgalerie API 50CHB

Le milieu API 50CHB Medium est destiné à l'identification des *Bacillus*. Ce milieu est prêt à l'emploi et permet l'étude de la fermentation des 49 sucres de la galerie API 50CHB.

Les trois profils biochimiques de *Bacillus cereus* identifiés par API 20E ont été inoculés sur galeries API 50CHB suivant les recommandations du fabricant et incubés à une température de 30°C pendant 24 à 48 heures.

La lecture des galeries a été effectuée par utilisation des feuilles de calcul pour l'identification microbienne réalisées par Jean Noël JOFFIN en 2009 qui permettent l'identification des souches suivant une base de données (Annexe 2). Les résultats reposent sur le principe de l'identité numérique.

Les noms d'espèces obtenus sont accompagnés d'un pourcentage d'identification et d'un indice de typicité, qui compare le profil réel et le profil idéal de la souche, lui-même déduit des pourcentages de positivité. Les résultats sont ensuite analysés par le logiciel qui conclut à une identification excellente, très bonne, acceptable, de faible discrimination, non fiable ou présomptive, inacceptable ou douteuse.

6. Résultats

6.1. Mise en culture et orientation en faveur du genre

Après incubation à 30°C pendant 72 heures avec une lecture toutes les 24h, certaines colonies obtenues sur gélose nutritive et caso-agar, sont généralement assez grosses, mates ou granuleuses, à contours le plus souvent irréguliers (Figure 3.1) ou filamenteux. D'autres sont rhizoïdes et adhérentes à la gélose. Toutes ces cultures sont très mobiles.

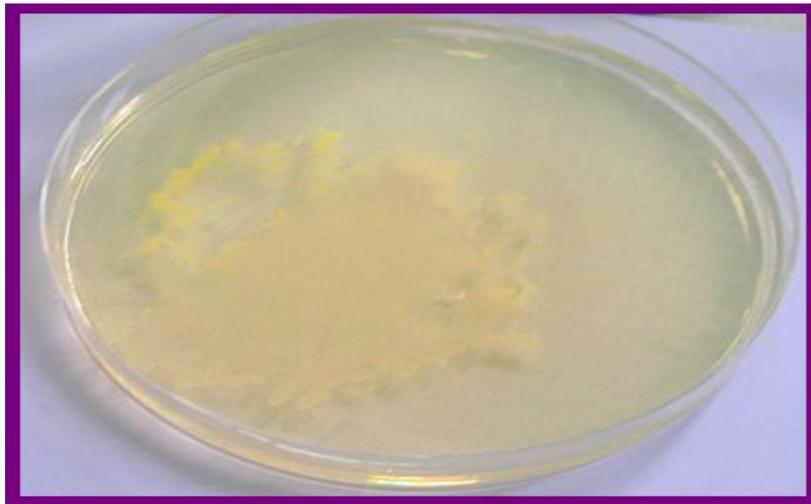


Figure 3.1. Culture à contours irréguliers sur gélose caso-agar.

Une catalase positive pour toutes les souches isolées et une oxydase variable ont été observées. Après sélection thermique (test de thermo-résistance), la présomption de la sporulation a été mise en évidence par la formation, de voile blanchâtre dans le bouillon nutritif après 24 h d'incubation (Figure 3.2).

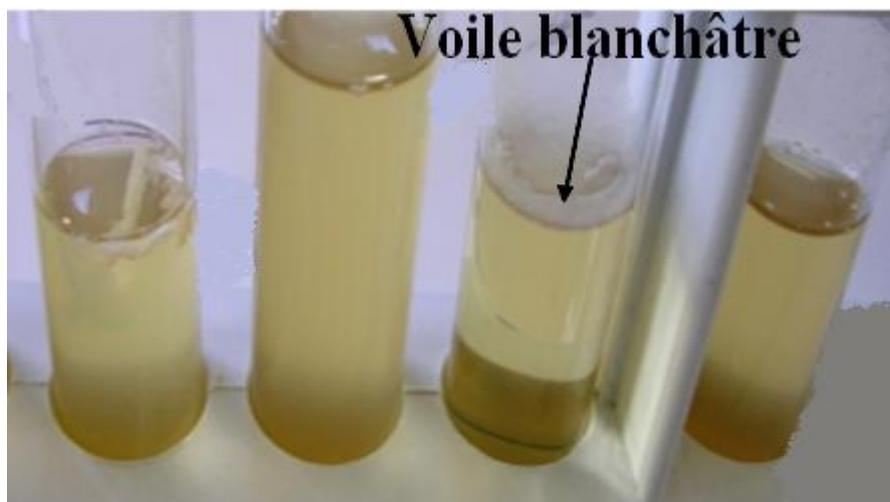


Figure 3.2. Résultat du test de présomption de la sporulation sur bouillon nutritif.

L'observation microscopique à partir de ces tubes, nous a révélé des bâtonnets Gram+ isolés ou en chaînettes et la présence de spores (Figure 3.3). La présomption de l'aptitude à la sporulation a été confirmée par l'observation de bacilles Gram+ sporulés.

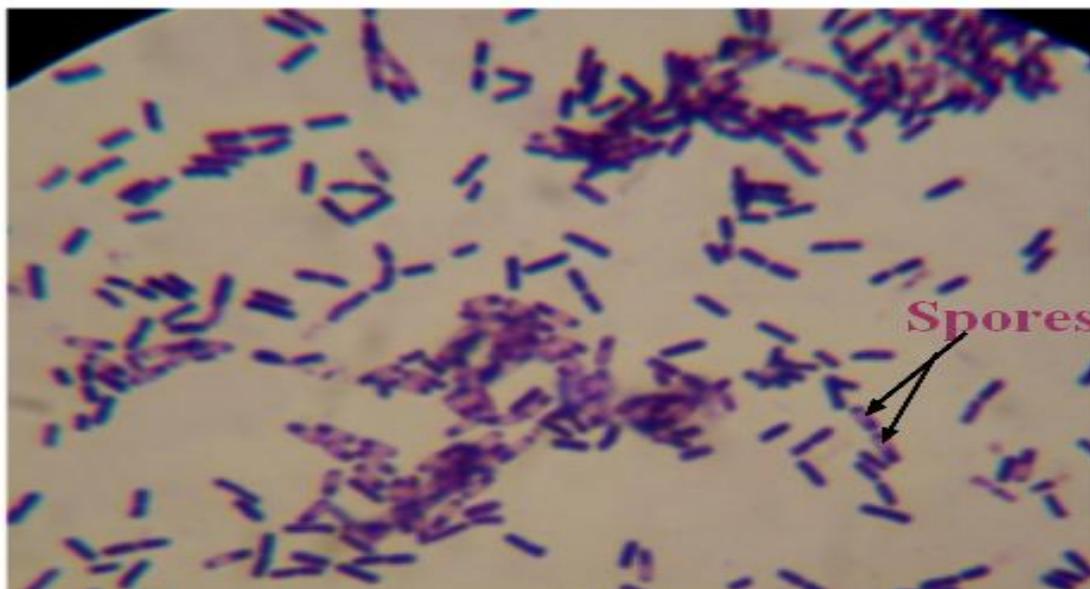


Figure 3.3. Observation microscopique montrant des bacilles sporulés après coloration de Gram

6.2. Orientation biochimique en faveur de l'espèce des cultures isolées

6.2.1. Biotypage par microgalerie API 20E

Les résultats des caractères biochimiques que nous avons obtenus sur galeries API 20E rajoutés à ceux du type respiratoire, de la mobilité et de la lécithinase nous ont permis de différencier huit profils biochimiques reportés dans le Tableau 3.1.

D'après le Tableau 3.1, toutes les souches isolées ont donné un résultat négatif pour les tests lysine décarboxylase (LDC), ornithine décarboxylase (ODC), H₂S, urée, tryptophane désaminase (TDA) et arabinose.

La diversité des profils obtenus ne montre pas une discrimination fiable entre les trois biotypes du groupe *Bacillus cereus*. Le biotype S1 est le seul à avoir une réaction VP négative (VP -), une réaction positive pour le mannitol (MAN+), le rhamnose (RHA+) et le saccharose (SAC+).

Le biotype S2 est le seul à avoir une réaction positive pour l'amydaline (AMY+).

Le biotype S3 est le seul à avoir une réaction négative pour le sorbitol (SOR-)

Tableau 3.1. Profils biochimiques des souches isolées après 48h d'incubation à 30°C.

Souches	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
ANAEROBIOSE	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	+	+	-	+	+
ADH	+	+	-	-	+	+	+	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-
CITRATE	+	-	-	-	+	-	+	+
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-
INDOLE	-	-	-	-	-	-	+	-
VP	-	+	+	+	+	+	+	-
GELATINASE	+	+	+	-	+	-	+	+
GLUCOSE	+	+	+	+	+	-	-	+
MANNITOL	+	-	-	-	+	-	-	+
INOSITOL	+	+	+	-	-	-	-	-
SORBITOL	+	+	-	-	-	-	-	-
RHAMNOSE	+	-	-	-	-	-	-	+
SACCHAROSE	+	-	-	-	+	-	-	-
MELIBIOSE	-	-	-	-	-	-	-	+
AMYGDALINE	-	+	-	-	+	-	-	-
ARABINOSE	-	-	-	-	-	-	-	-
OXYDASE	+	+	+	-	-	-	+	+
NITRITES	-	+	-	-	+	-	+	+
MOBILITE	+	+	+	+	+	+	+	-
LECITHINASE	+	+	+	-	-	-	-	-

+ : la couleur du milieu a complètement changé

- : la couleur du milieu n'a pas changé

Rappelons que l'identification des souches isolées a été effectuée en utilisant une méthode probabiliste numérisée. La base de données est fournie sous la forme d'un tableau (Annexe 1) donnant, pour chaque taxon et pour chaque caractère, sa probabilité d'être positif (Joffin et Leyral, 2006) nous avons eu recours à la matrice d'identification des *Bacillus* selon la galerie API 20E établie par Michel Cavalla en 2003, en utilisant le tableur Excel (<http://mcavalla.free.fr/>).

Les résultats de l'identification de nos souches en utilisant des feuilles de calcul sont reportés dans les tableaux 3.2, 3.3 et 3.4.

Lors de l'identification d'une souche donnée, Cavalla propose de calculer, pour chaque taxon, un pourcentage absolu (noté **Pabs** dans les tableaux précités). De plus, il fournit la possibilité de calculer un pourcentage relatif (noté **Prel** dans les tableaux précités).

Cette valeur est égale au rapport entre $100 \times \text{Pabs}$ et la somme des pourcentages absolus correspondant à la souche considérée (notée **somme Pabs**).

Les pourcentages relatifs d'identification obtenus pour chaque profil sont représentés par les Figures 3.4 et 3.5.

Le résultat de l'identification d'une souche est représenté par le taxon correspondant au pourcentage relatif (Prel) maximal dans la colonne Prel de la souche considérée. Cette valeur maximale est interprétée comme étant un pourcentage d'identification.

Notons que, dans les résultats des calculs que nous avons accomplis et qui sont reportés dans les Tableaux 3.2, 3.3 et 3.4, nous utilisons la notation scientifique exponentielle. Par exemple, $6,4E-22$ correspond à la valeur de probabilité $6,4 \times 10^{-22}$.

Tableau 3.2. Résultats d'identification biochimique des souches isolées (Souches S1 à S3)

Souches	S1		S2		S3	
	Pabs	Prel	Pabs	Prel	Pabs	Prel
<i>B. alvei</i>	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>B. amyloliquefaciens</i>	6,4E-22	0,0	1,49E-23	0,0	2,11E-16	0,0
<i>B. anthracis</i>	4,27E-28	0,0	3,85E-27	0,0	3,81E-17	0,0
<i>B. brevis</i>	1,48E-22	0,0	3,81E-22	0,0	7,95E-20	0,0
<i>B. carotarum</i>	3,53E-19	0,0	3,53E-19	0,0	3,46E-15	0,4
<i>B. cereus</i>	2,04E-17	97,8	4,5E-13	100,0	8,73E-13	92,5
<i>B. cereus (émétique)</i>	5,57E-20	0,0	5,01E-19	0,0	2,7E-16	0,0
<i>B. circulans</i>	6,05E-21	0,0	2,44E-22	0,0	1,33E-21	0,0
<i>B. coagulans</i>	1,91E-28	0,0	1,74E-25	0,0	1,93E-22	0,0
<i>B. firmus</i>	3,77E-20	0,0	3,46E-23	0,0	4,96E-17	0,0
<i>B. laterosporus (2)</i>	3,4E-29	0,0	1,01E-26	0,0	1,09E-17	0,0
<i>B. lentus</i>	3,49E-21	0,0	9,16E-25	0,0	4,88E-20	0,0
<i>B. licheniformis</i>	2,87E-23	0,0	7,71E-23	0,0	6,51E-27	0,0
<i>B. macerans</i>	4,55E-23	0,0	9,65E-24	0,0	3,08E-26	0,0
<i>B. megaterium (2)</i>	6,34E-23	0,0	5,82E-26	0,0	6,4E-21	0,0
<i>B. mycoides</i>	1,39E-22	0,0	1,03E-21	0,0	7,96E-18	0,0
<i>B. pantothenicus</i>	8,1E-23	0,0	2,98E-25	0,0	3,3E-22	0,0
<i>B. pasteurii</i>	4,47E-28	0,0	3,95E-23	0,0	4,29E-20	0,0
<i>B. polymyxa</i>	4,47E-32	0,0	7,06E-30	0,0	7,84E-27	0,0
<i>B. pumilus</i>	1,04E-25	0,0	2,93E-26	0,0	7,73E-24	0,0
<i>B. sphaericus</i>	7,84E-28	0,1	2,71E-23	0,0	2,97E-18	0,0
<i>B. stearothermophilus 1</i>	4,66E-23	0,0	5,63E-19	0,0	6,19E-14	6,6
<i>B. stearothermophilus 2</i>	3,66E-24	0,0	4,46E-22	0,0	4,85E-15	0,5
<i>B. stearothermophilus 3</i>	2,92E-29	0,0	3,5E-23	0,0	3,84E-18	0,0
<i>B. subtilis</i>	4,72E-22	0,0	1,02E-24	0,0	2,12E-22	0,0
<i>B. thiaminolyticus</i>	1,15E-34	0,0	1,06E-37	0,0	1,15E-34	0,0
<i>B. thuringiensis (1)</i>	2,09E-22	0,0	1,87E-19	0,0	2,07E-20	0,0
Somme Pabs	2,09E-17		4,5E-13		9,44E-13	
Résultat d'identification	97,8 % B. cereus		100 % B. cereus		92,5 % B. cereus	

Tableau 3.3. Résultats d'identification biochimique des souches isolées
(Souches S4 à S6)

Souches	S4		S5		S6	
	Pabs	Prel	Pabs	Prel	Pabs	Prel
<i>B. alvei</i>	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>B. amyloliquefaciens</i>	6,43E-17	0,0	1,72E-17	0,0	1,15E-3	0,0
<i>B. anthracis</i>	4,27E-24	0,0	4,32E-38	0,0	4,23E-22	0,0
<i>B. brevis</i>	2,6E-12	44,1	2,96E-18	0,0	4,06E-11	44,1
<i>B. carotarum</i>	3,53E-15	0,0	3,54E-15	0,4	3,53E-15	0,0
<i>B. cereus</i>	2,74E-18	16,7	5,64E-18	99,9	1,53E-11	16,7
<i>B. cereus (émétique)</i>	5,29E-22	0,0	9,73E-23	0,0	1,07E-17	0,0
<i>B. circulans</i>	2,79E-16	0,0	2,16E-13	25,70	1,44E-20	0,0
<i>B. coagulans</i>	1,93E-18	0,0	1,72E-23	0,0	1,95E-24	0,0
<i>B. firmus</i>	1,32E-13	0,0	8,93E-14	10,7	3,77E-1	0,0
<i>B. laterosporus (2)</i>	3,63E-18	0,0	9,92E-23	0,0	3,67E-20	0,0
<i>B. lentus</i>	2,41E-12	6,4	6,73E-15	0,0	1,02E-17	0,0
<i>B. licheniformis</i>	9,82E-26	0,0	3,86E-19	0,0	1,33E-28	0,0
<i>B. macerans</i>	5,47E-22	0,0	7,28E-18	0,0	1,96E-26	0,0
<i>B. megaterium (2)</i>	9,42E-19	0,0	2,76E-15	0,3	1,95E-25	0,0
<i>B. mycoides</i>	6E-14	0,2	1,04E-16	0,0	1E-11	10,9
<i>B. pantothenicus</i>	4,44E-20	0,0	1E-23	0,0	1,33E-23	0,0
<i>B. pasteurii</i>	4,29E-16	0,0	4,07E-25	0,0	4,25E-14	0,0
<i>B. polymyxa</i>	3,17E-21	0,0	3,06E-22	0,0	3,23E-29	0,0
<i>B. pumilus</i>	2,29E-17	0,0	5,19E-13	61,9	9,75E-23	0,0
<i>B. sphaericus</i>	2,65E-11	69,7	3,69E-20	0,0	2,59E-11	28,2
<i>B. stearothermophilus 1</i>	6,25E-12	16,5	5,58E-17	0,0	6,25E-16	0,0
<i>B. stearothermophilus 2</i>	5E-17	0,0	4,47E-22	0,0	5E-21	0,0
<i>B. stearothermophilus 3</i>	3,84E-14	0,1	3,5E-23	0,0	3,77E-14	0,0
<i>B. subtilis</i>	2,63E-22	0,0	9,79E-16	0,1	7,36E-27	0,0
<i>B. thiaminolyticus</i>	1,14E-28	0,0	1,02E-25	0,0	1,15E-30	0,0
<i>B. thuringiensis (1)</i>	2,35E-25	0,0	2,09E-22	0,0	2,28E-19	0,0
Somme Pabs	3,8E-11		8,38E-13		9,2E-11	
Résultat d'identification	69,7 % B. sphaericus		61,9 % B. pumilus		44,1 % B. brevis	

Tableau 3.4. Résultats d'identification biochimique des souches isolées
(Souches S7 à S8)

Souches	S7		S8	
	Pabs	Prel	Pabs	Prel
<i>B. alvei</i>	0	0,0	0	0,0
<i>B. amyloliquefaciens</i>	3,3E-18	0,0	3,24E-06	7,8
<i>B. anthracis</i>	4,1E-28	0,0	4,69E-27	0,0
<i>B. brevis</i>	3,81E-12	0,0	8,36E-11	0,0
<i>B. carotarum</i>	3,46E-11	0,3	3,5E-09	0,0
<i>B. cereus</i>	2,91E-11	0,3	3,96E-21	0,0
<i>B. cereus (émétique)</i>	5,29E-14	0,0	3E-21	0,0
<i>B. circulans</i>	1,8E-18	0,0	1,05E-05	25,4
<i>B. coagulans</i>	1,7E-21	0,0	1,7E-13	0,0
<i>B. firmus</i>	2,17E-11	0,2	1,19E-08	0,0
<i>B. laterosporus (2)</i>	2,95E-20	0,0	3,01E-16	0,0
<i>B. lentus</i>	2,86E-17	0,0	7,54E-09	0,0
<i>B. licheniformis</i>	1,05E-21	0,1	1,94E-15	0,0
<i>B. macerans</i>	1,12E-21	1,3	1,15E-11	0,0
<i>B. megatherium (2)</i>	6,98E-20	0,0	2,73E-05	66,2
<i>B. mycoides</i>	9,95E-09	99,1	8,14E-13	0,0
<i>B. pantothenicus</i>	2,48E-26	0,0	2,43E-10	0,0
<i>B. pasteurii</i>	3,95E-19	0,0	3,99E-17	0,0
<i>B. polymyxa</i>	7,5E-22	0,0	3,91E-13	0,0
<i>B. pumilus</i>	1,75E-15	0,0	2,16E-07	0,5
<i>B. sphaericus</i>	3E-15	0,0	7,06E-15	0,0
<i>B. stearothermophilus 1</i>	7,6E-18	0,0	4,2E-10	0,0
<i>B. stearothermophilus 2</i>	6,15E-25	0,0	3,29E-11	0,0
<i>B. stearothermophilus 3</i>	4,+8E-20	0,0	2,63E-16	0,0
<i>B. subtilis</i>	1,56E-18	0,0	1,52E-08	0,0
<i>B. thiaminolyticus</i>	1,01E-23	0,0	9,87E-16	0,0
<i>B. thuringiensis (1)</i>	1,99E-12	0,0	2,11E-20	0,0
Somme Pabs	1E-08		4,13E-05	
Résultat d'identification	91,1 % B. mycoides		66,2 % B. megatherium	

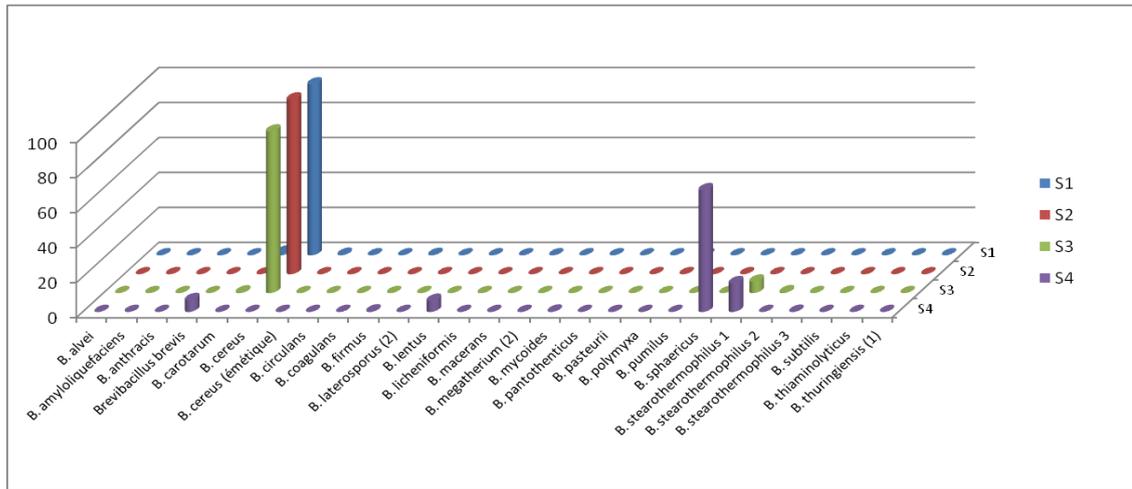


Figure 3.4. Pourcentages relatifs d'identification des souches S1, S2, S3, S4

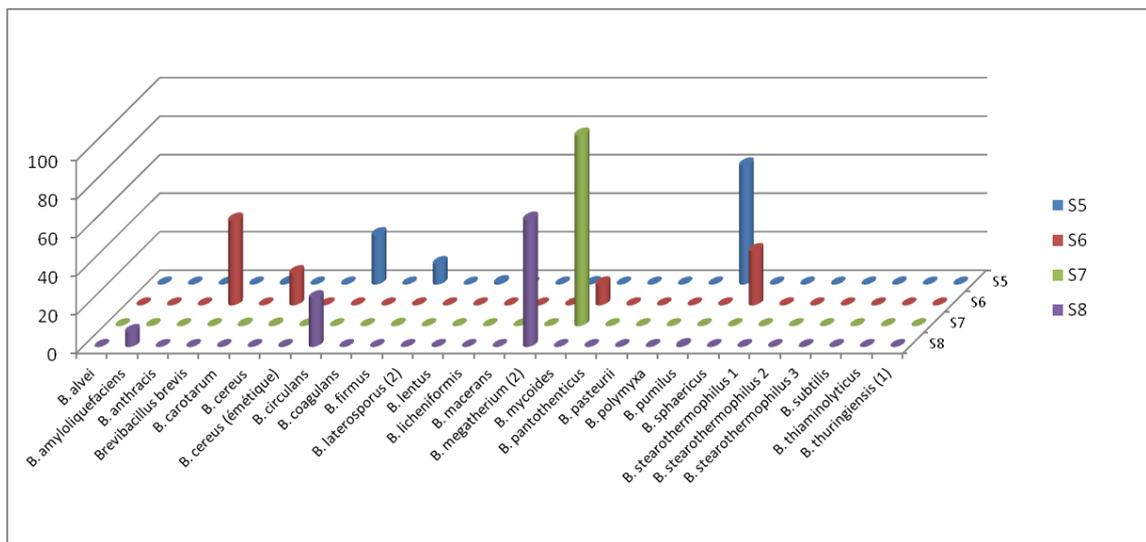


Figure 3.5. Pourcentages relatifs d'identification des souches S5, S6, S7, S8

Les résultats de l'identification des souches isolées, représentés par les taxons correspondants aux pourcentages relatifs maximaux nous ont permis de valider six espèces avec des taux d'identification généralement satisfaisants comme le montre le Tableau 3.5.

Tableau 3.5. Résultats récapitulatifs d'identification biochimique des souches isolées

Nom de la souche	Espèce identifiée	Pourcentage d'identification
S1	<i>B. cereus</i>	97.8
S2	<i>B. cereus</i>	100
S3	<i>B. cereus</i>	92.5
S4	<i>B. sphaericus</i>	69.7
S5	<i>B. pumilus</i>	61.9
S6	<i>Brevibacillus brevis</i>	44.1
S7	<i>B. mycoides</i>	91.1
S8	<i>B. megatherium</i> (2)	66.2

Les pourcentages relatifs maximaux sont en faveur des trois profils du groupe *Bacillus cereus* à savoir, S1 (97,8%), S2 (100%), S3 (92,5%) et du biotype S7 (91,1%) correspondant à *Bacillus mycoides*.

Parmi les espèces identifiées par méthode biochimique figure principalement le groupe *B. cereus* (42.50%); *B. megatherium* (30.40%); *B. mycoides* (10.73%); *B. sphaericus* (7.24%); *B. pumilus* (4.60%) et *Brevibacillus brevis* (4.53%).

La fréquence d'apparition des différentes espèces est représentée par la Figure 3.6 :

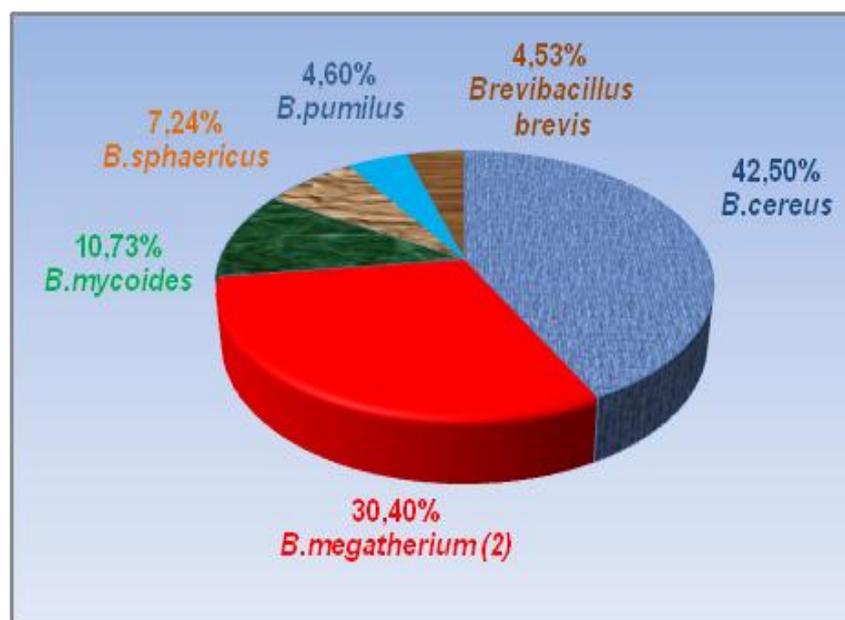


Figure 3.6. Fréquence d'apparition des différentes espèces identifiées

6.2.2. Recherche de caséinase, d'amylase et de lécithinase

Les résultats des tests biochimiques complémentaires tels que la caséinase et l'amylase n'ont fait qu'appuyer l'identification des espèces isolées (Guiraud, 2003). Une lécithinase très active a caractérisé *B. cereus* (Figure 3.7).



Figure 3.7. Résultat du test de la lécithinase.

La caséine a été hydrolysée par toutes les souches (Figure 3.8), montrant ainsi une caséinase positive pour toutes les souches.

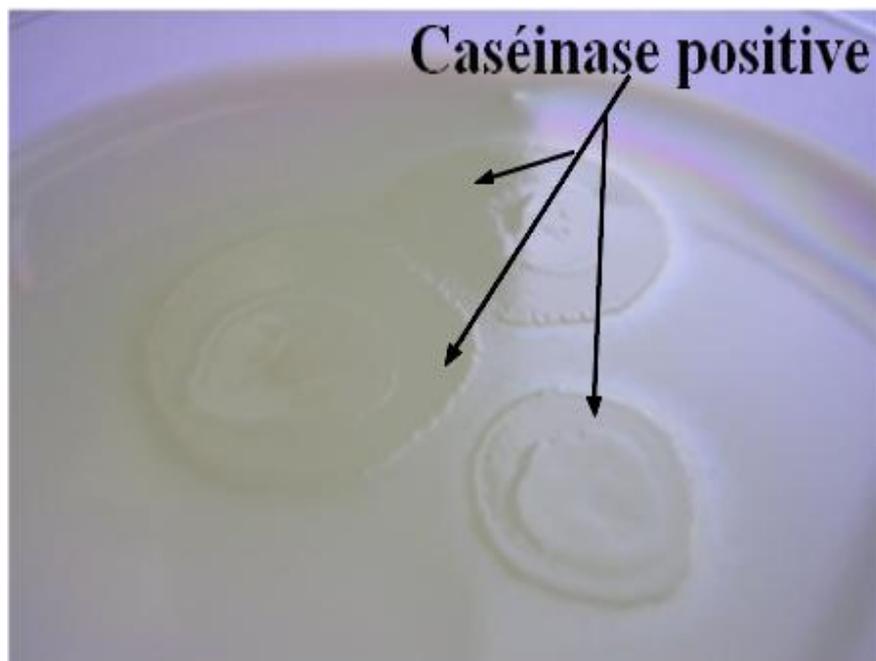


Figure 3.8. Résultat du test de la caséinase

L'amidon a été aussi dégradé par toutes les souches, à l'exception de *B. sphaericus*, *Brevibacillus brevis* et *B. pumilus* (Figure 3.9)

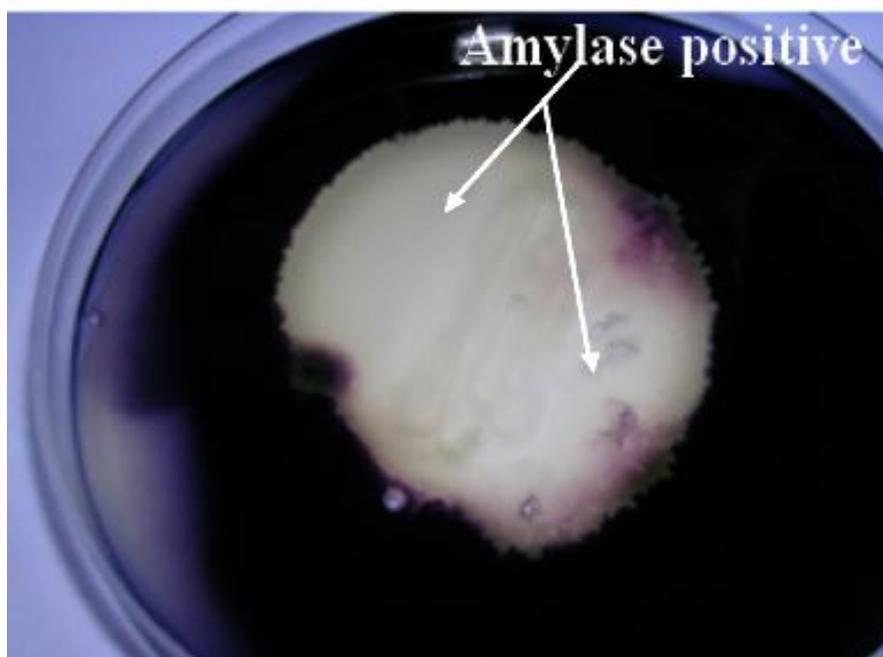


Figure 3.9. Résultat du test de l'amylase.

6.2.3. Biotypage par microgalerie API 50CHB

Les résultats du métabolisme des carbohydrates ont révélé l'existence de *Bacillus cereus* sous trois biotypes différents (Tableau 3.5). Nous les avons classés et renommés (AL1, AL2, AL3) par ordre décroissant de leurs pourcentages d'identification selon le biotypage par microgalerie API 20E (voir Tableau 3.6).

Tableau 3.6. Correspondance nominative des souches caractérisées par biotypage

Nom de souche (API 20E)	Pourcentage d'identification par microgalerie API 20E	Nom de souche (API 50CHB)
S2	100	AL1
S1	97.8	AL2
S3	92.5	AL3

Les résultats des caractères biochimiques que nous avons obtenus pour AL1, AL2 et AL3, sur galeries API 50 CHB sont reportés dans le Tableau 3.7 qui montre que plusieurs substrats n'ont été fermentés par aucun des trois biotypes identifiés, à savoir : érythrol, arabinose, xylose, adonytol, β -méthyl-D xyloside, D mannose, sorbose, rhamnose, dulcitol, inositol, mannitol, sorbitol, méthyl-D mannoside, méthyl-D glucoside, mélibiose, inuline, mélézitose, raffinose, xylitol, lyxose, tagatose, fucose, arabitol, 2 kéto-gluconate et 5 kéto-gluconate.

Cependant, les trois profils diffèrent les uns des autres par leur capacité à métaboliser certains substrats. Par exemple, la souche **AL1** est la seule à fermenter le Turanose (TUR⁺) et le gluconate (GNT⁺).

La souche **AL2** ne fermente pas le N acétyl glucosamine (NAG⁻) et le saccharose (SAC⁻), mais est positive pour amidon (AMD⁺) et gentiobiose (GEN⁺).

La souche **AL3** ne fermente pas le cellobiose (CEL⁻) et le galactose (GAL⁻).

Tableau 3.7. Profils biochimiques des souches pour identification par API 50CHB

	SOUCHE AL1	SOUCHE AL2	SOUCHE AL3
GLY : 1	+	+	+
ERY : 2	-	-	-
DARA : 3	-	-	-
LARA : 4	-	-	-
RIB : 5	+	+	+
DXYL : 6	-	-	-
LXYL : 7	-	-	-
ADO : 8	-	-	-
MDX : 9	-	-	-
GAL : 10	+	+	-
GLU : 11	+	+	+
FRU : 12	+	+	+
MNE : 13	-	-	-
SBE : 14	-	-	-
RHA : 15	-	-	-
DUL : 16	-	-	-
INO : 17	-	-	-
MAN : 18	-	-	-
SOR : 19	-	-	-
MDM : 20	-	-	-
MDG : 21	-	-	-
NAG : 22	+	-	+
AMY : 23	-	-	+
ARB : 24	+	+	+
ESC : 25	+	+	+

	SOUCHE AL1	SOUCHE AL2	SOUCHE AL3
SAL : 26	+	+	+
CEL : 27	+	+	-
MAL : 28	+	+	+
LAC : 29	-	-	+
MEL : 30	-	-	-
SAC : 31	+	-	+
TRE : 32	+	+	+
INU : 33	-	-	-
MLZ : 34	-	-	-
RAF : 35	-	-	-
AMD : 36	-	+	-
GLYG : 37	+	+	+
XLT : 38	-	-	-
GEN : 39	-	+	-
TUR : 40	+	-	-
LYX : 41	-	-	-
TAG : 42	-	-	-
DFUC : 43	-	-	-
LFUC : 44	-	-	-
DARL : 45	-	-	-
LARL : 46	-	-	-
GNT : 47	+	-	-
2KG : 48	-	-	-
5KG : 49	-	-	-

L'identification des souches AL1, AL2 et AL3 a été effectuée en utilisant une méthode probabiliste numérisée. La base de données est fournie sous la forme d'un tableau (Annexe 2) donnant, pour chaque taxon et pour chaque caractère, sa probabilité d'être positif. Nous avons eu recours à la matrice d'identification des *Bacillus* selon la galerie API 50CHB établie par Jean Noël JOFFIN en 2009 à partir du travail de Michel CAVALLA et des observations de Jean CAU, en utilisant le tableur Excel (<http://www.techmicrobio.eu>).

Lors de l'identification d'une souche donnée, Joffin propose de déterminer :

- le taxon le plus probable,
- un indice de typicité évaluant la concordance entre le taxon trouvé et les caractères habituels du taxon,
- une évaluation, en fonction de cet indice, de la validité de l'identification.

Les résultats du biotypage par microgalerie API 50CHB sont représentés dans les Tableaux 3.8 et 3.9 pour la souche AL1, les Tableaux 3.10 et 3.11 pour la souche AL2 et enfin les Tableaux 3.12 et 3.13 pour la souche AL3.

Lors de l'identification d'une souche donnée, d'une manière similaire à Cavalla (voir la section 6.2.1 de ce chapitre), Joffin propose de calculer, pour chaque taxon, un pourcentage absolu (noté **Pabs** dans les tableaux précités). De plus, il fournit la possibilité de calculer un pourcentage relatif (noté **Prel** dans les tableaux précités). Cette valeur est égale au rapport entre **Pabs** et la somme des pourcentages absolus correspondant à la souche considérée.

Le résultat de l'identification d'une souche est représenté par le taxon correspondant au pourcentage relatif (Prel) maximal dans la colonne Prel de la souche considérée. Cette valeur maximale est interprétée comme étant un pourcentage d'identification.

Notons que, dans les résultats des calculs que nous avons accomplis et qui sont reportés dans les Tableaux 3.8 à 3.13, nous utilisons la notation scientifique exponentielle. Par exemple, 2,4E+81 correspond à la valeur de probabilité $2,4 \times 10^{+81}$.

Les tableaux 3.9, 3.11 et 3.13 présentent les résultats récapitulatifs des cinq taxons ayant les meilleurs pourcentages de l'identification biochimique de chacune des souches AL1, AL2 et AL3.

La souche **AL1** a le pourcentage d'identification le plus élevé (96,2%), indice de typicité de 42% et zéro incompatibilité. Tous ces caractères correspondent à une excellente identification.

La souche **AL1** est suivie par la souche **AL2** avec un pourcentage d'identification de 93,3%, un indice de typicité de 31% et aucune incompatibilité. Tout cela correspond aussi à une excellente identification.

La souche **AL3** correspond à une très bonne identification avec un pourcentage de 68.5%, un indice de typicité de 43% et zéro incompatibilité.

Tableau 3.8. Résultats d'identification biochimique de la souche AL1 par API 50CHB

Taxons	Classement	Pabs	Prel	P(plus typique)	Typicité	Incompatibilité
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	18	2,4E+81	0,0%	9,1E+95	-1,43	3
<i>Bacillus anthracis</i>	2	3,2E+91	2,7%	4,3E+96	0,15	1
<i>Bacillus cereus 1</i>	1	1,1E+93	96,2%	3,5E+96	0,42	0
<i>Bacillus cereus 2</i>	4	9,6E+88	0,0%	3,8E+96	-0,27	0
<i>Bacillus circulans</i>	21	3,0E+79	0,0%	6,2E+94	-1,55	0
<i>Bacillus coagulans</i>	9	1,4E+87	0,0%	1,5E+94	-0,17	1
<i>Bacillus firmus</i>	16	5,9E+83	0,0%	5,4E+95	-0,99	1
<i>Bacillus lentus</i>	8	2,5E+87	0,0%	3,9E+93	-0,03	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	19	7,2E+79	0,0%	2,8E+95	-1,60	0
<i>Bacillus megaterium</i>	12	9,6E+85	0,0%	1,2E+95	-0,52	0
<i>Bacillus mycoides</i>	3	1,3E+91	1,1%	5,0E+96	0,07	0
<i>Bacillus pumilus</i>	14	2,2E+84	0,0%	3,7E+95	-0,87	0
<i>Bacillus smithii</i>	17	2,0E+82	0,0%	1,1E+96	-1,29	3
<i>B. subtilis / B. amyloliquefaciens</i>	11	2,3E+86	0,0%	5,3E+94	-0,39	0
<i>Bacillus non reactive</i>	27	5,5E+72	0,0%	2,7E+97	-3,11	0
<i>Breibacillus agri</i>	29	1,8E+71	0,0%	1,5E+97	-3,32	11
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	7	4,2E+87	0,0%	1,9E+96	-0,44	2
<i>Brevibacillus non réactive</i>	23	3,0E+76	0,0%	1,3E+97	-2,44	2
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	15	1,8E+84	0,0%	2,7E+95	-0,86	1
<i>Geobacillus thermoglucosidiasus</i>	10	9,7E+86	0,0%	3,2E+94	-0,25	2
<i>Paenibacillus alvei</i>	6	6,3E+88	0,0%	5,8E+94	0,01	0
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	28	2,4E+72	0,0%	5,9E+96	-3,07	10
<i>Paenibacillus gluconolyticus</i>	24	2,5E+75	0,0%	1,1E+96	-2,44	6
<i>Paenibacillus lautus</i>	26	1,1E+74	0,0%	1,2E+96	-2,67	7
<i>Paenibacillus macerans</i>	25	5,9E+74	0,0%	3,2E+95	-2,46	2
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	22	6,9E+77	0,0%	5,6E+96	-2,15	2
<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	5	7,6E+88	0,0%	3,3E+95	-0,11	0
<i>Paenibacillus validus</i>	20	3,1E+79	0,0%	1,5E+96	-1,78	7
<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	13	1,9E+85	0,0%	6,0E+95	-0,75	1

Tableau 3.9. Résultats récapitulatifs de l'identification biochimique de la souche AL1

Classement	Taxon	Probabilité	Typicité	Incompatibilité	Test sur probabilité	Test sur typicité
1	<i>Bacillus cereus 1</i>	0,962	0,42	0	Excellente identification	Bonne typicité
2	<i>Bacillus anthracis</i>	0,027	0,15	1	mauvaise indetification	mauvaise typicité
3	<i>Bacillus mycoides</i>	0,011	0,07	0	mauvaise indetification	mauvaise typicité
4	<i>Bacillus cereus 2</i>	0,000	-0,27	0	mauvaise indetification	mauvaise typicité
5	<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	0,000	-0,11	0	mauvaise indetification	mauvaise typicité

Tableau 3.10. Résultats d'identification biochimique de la souche AL2 par API 50 CHB

Taxons	Classement	Pabs	Prel	P(plus typique)	Typicité	Incompatibilité
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	15	5,0E+83	0,0%	9,1E+95	-1,04	2
<i>Bacillus anthracis</i>	6	2,1E+88	0,0%	4,3E+96	-0,39	1
<i>Bacillus cereus 1</i>	1	2,4E+92	93,3%	3,5E+96	0,31	0
<i>Bacillus cereus 2</i>	9	2,5E+87	0,0%	3,8E+96	-0,53	1
<i>Bacillus circulans</i>	20	3,1E+79	0,0%	6,2E+94	-1,55	0
<i>Bacillus coagulans</i>	13	9,2E+84	0,0%	1,5E+94	-0,53	2
<i>Bacillus firmus</i>	14	1,3E+84	0,0%	5,4E+95	-0,94	0
<i>Bacillus lentus</i>	4	5,3E+88	0,0%	3,9E+93	0,19	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	19	3,4E+79	0,0%	2,8E+95	-1,65	0
<i>Bacillus megaterium</i>	12	1,7E+86	0,0%	1,2E+95	-0,47	0
<i>Bacillus mycoides</i>	2	1,7E+91	6,6%	5,0E+96	0,09	1
<i>Bacillus pumilus</i>	17	5,6E+82	0,0%	3,7E+95	-1,14	0
<i>Bacillus smithii</i>	18	1,3E+81	0,0%	1,1E+96	-1,49	4
<i>B. subtilis / B.amyloliquefaciens</i>	8	3,2E+87	0,0%	5,3E+94	-0,20	0
<i>Bacillus non reactive</i>	26	2,7E+74	0,0%	2,7E+97	-2,83	0
<i>Breibacillus agri</i>	24	1,8E+75	0,0%	1,5E+97	-2,65	9
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	3	1,2E+89	0,0%	1,9E+96	-0,20	1
<i>Brevibacillus non réactive</i>	21	8,9E+78	0,0%	1,3E+97	-2,03	1
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	11	1,8E+86	0,0%	2,7E+95	-0,53	0
<i>Geobacillus thermoglucosidiasus</i>	10	2,4E+87	0,0%	3,2E+94	-0,19	1
<i>Paenibacillus alvei</i>	5	5,0E+88	0,0%	5,8E+94	-0,01	0
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	28	1,8E+73	0,0%	5,9E+96	-2,92	9
<i>Paenibacillus glucoanalyticus</i>	27	6,7E+73	0,0%	1,1E+96	-2,70	8
<i>Paenibacillus lautus</i>	29	3,1E+72	0,0%	1,2E+96	-2,93	8
<i>Paenibacillus macerans</i>	25	7,5E+74	0,0%	3,2E+95	-2,44	3
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	23	4,8E+77	0,0%	5,6E+96	-2,18	3
<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	7	4,3E+87	0,0%	3,3E+95	-0,31	0
<i>Paenibacillus validus</i>	22	4,3E+78	0,0%	1,5E+96	-1,92	7
<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	16	2,3E+83	0,0%	6,0E+95	-1,07	2

Tableau 3.11. Résultats récapitulatifs de l'identification biochimique de la souche AL2

Classement	Taxon	Probabilité	Typicité	Incompatibilité	Test sur probabilité	Test sur typicité
1	<i>Bacillus cereus 1</i>	0,933	0,31	0	Excellente identification	Bonne typicité
2	<i>Bacillus mycoides</i>	0,066	0,09	1	mauvaise identification	mauvaise typicité
3	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	0,000	-0,20	1	mauvaise identification	mauvaise typicité
4	<i>Bacillus lentus</i>	0,000	0,19	0	mauvaise identification	mauvaise typicité
5	<i>Paenibacillus alvei</i>	0,000	-0,01	0	mauvaise identification	mauvaise typicité

Tableau 3.12. Résultats d'identification biochimique de la souche AL3 par API 50 CHB

Taxons	Classement	Pabs	Prel	P(plus typique)	Typicité	Incompatibilité
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	13	2,4E+85	0,0%	9,1E+95	-0,76	1
<i>Bacillus anthracis</i>	3	8,0E+91	4,3%	4,3E+96	0,21	1
<i>Bacillus cereus 1</i>	1	1,3E+93	68,5%	3,5E+96	0,43	0
<i>Bacillus cereus 2</i>	4	6,7E+91	3,6%	3,8E+96	0,21	1
<i>Bacillus circulans</i>	21	2,5E+78	0,0%	6,2E+94	-1,73	0
<i>Bacillus coagulans</i>	14	1,8E+85	0,0%	1,5E+94	-0,48	1
<i>Bacillus firmus</i>	12	6,4E+85	0,0%	5,4E+95	-0,65	0
<i>Bacillus lentus</i>	6	8,5E+89	0,0%	3,9E+93	0,39	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	20	9,8E+78	0,0%	2,8E+95	-1,74	0
<i>Bacillus megaterium</i>	10	3,3E+86	0,0%	1,2E+95	-0,43	0
<i>Bacillus mycoides</i>	2	4,3E+92	23,0%	5,0E+96	0,32	0
<i>Bacillus pumilus</i>	16	1,3E+84	0,0%	3,7E+95	-0,91	0
<i>Bacillus smithii</i>	18	8,6E+79	0,0%	1,1E+96	-1,68	5
<i>B. subtilis / B.amyloliquefaciens</i>	9	4,9E+86	0,0%	5,3E+94	-0,34	0
<i>Bacillus non reactive</i>	22	5,4E+76	0,0%	2,7E+97	-2,45	0
<i>Breibacillus agri</i>	24	1,8E+75	0,0%	1,5E+97	-2,65	9
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	5	1,3E+91	0,7%	1,9E+96	0,14	1
<i>Brevibacillus non réactive</i>	19	5,7E+79	0,0%	1,3E+97	-1,89	0
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	15	3,0E+84	0,0%	2,7E+95	-0,83	0
<i>Geobacillus thermoglucosidiasus</i>	11	2,1E+86	0,0%	3,2E+94	-0,36	2
<i>Paenibacillus alvei</i>	7	7,5E+88	0,0%	5,8E+94	0,02	1
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	29	2,4E+72	0,0%	5,9E+96	-3,07	10
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	25	9,3E+74	0,0%	1,1E+96	-2,51	6
<i>Paenibacillus lautus</i>	28	3,1E+72	0,0%	1,2E+96	-2,93	7
<i>Paenibacillus macerans</i>	27	5,1E+72	0,0%	3,2E+95	-2,80	2
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	23	1,3E+76	0,0%	5,6E+96	-2,44	1
<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	8	5,5E+86	0,0%	3,3E+95	-0,46	1
<i>Paenibacillus validus</i>	26	6,0E+74	0,0%	1,5E+96	-2,57	9
<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	17	1,2E+84	0,0%	6,0E+95	-0,95	1

Tableau 3.13. Résultats récapitulatifs de l'identification biochimique de la souche AL3

Classement	Taxon	Probabilité	Typicité	Incompatibilité	Test sur probabilité	Test sur typicité
1	<i>Bacillus cereus 1</i>	0,685	0,43	0	Très bonne identification	Bonne typicité
2	<i>Bacillus mycoides</i>	0,230	0,32	0	mauvaise identification	Bonne typicité
3	<i>Bacillus anthracis</i>	0,043	0,21	1	mauvaise identification	mauvaise typicité
4	<i>Bacillus cereus 2</i>	0,036	0,21	1	mauvaise identification	mauvaise typicité
5	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	0,007	0,14	1	mauvaise identification	mauvaise typicité

7. Discussion

7.1. Orientation des cultures isolées en faveur du genre

Après incubation à 30°C pendant 72 heures avec une lecture toutes les 24h, certaines colonies obtenues sur gélose nutritive et caso-agar, sont généralement assez grosses, mates ou granuleuses, à contours le plus souvent irréguliers (Figure 3.1) ou filamenteux. D'autres sont rhizoïdes et adhérentes à la gélose

Sur le plan cultural, les colonies apparues sur gélose nutritive et amidon et caso-agar plus amidon, généralement volumineuses, mates à contours le plus souvent irréguliers, rappellent l'aspect des *Bacillus* cités par la littérature (Logan et Turnbull, 2000).

Sur le plan morphologique, les cellules végétatives obtenues répondent aux critères des *Bacillus* : Tailles, spore centrale à subterminale non déformante et inclusions lipidiques parfois (Harmon *et al.*, 1991; Holbrook et Anderson, 1980).

L'aspect des colonies à 30°C obtenues en culture aérobie à catalase positive et à oxydase variable dont les types morphologiques correspondent à des bâtonnets à Gram + sporulés nous permettent de déduire la présence de *Bacillus* mésophiles aérobies sporulés (Larpent, 2000), tant redoutés en conserverie (Brossard *et al.*, 2008).

La mise en culture de cette flore sans précaution particulière, autrement dit sans étape de revivification, prouve qu'elle a repris une activité normale après un temps de réparation au cours du stockage ou de leur durée de vie commerciale.

Les *Bacillus* ont une importante capacité à produire des spores thermorésistantes qui les rendent particulièrement adaptés au traitement thermique. Les spores bactériennes sont souvent le problème le plus difficile à résoudre pour la conservation.

La présence de ces bactéries sporulées peut se justifier par le fait qu'au moment de la récolte, les petits pois ont été probablement contaminés par des microorganismes aptes à la formation d'endospores qui ont pu survivre au traitement thermique de conservation.

La germination des spores a été induite par la nature des conserves à savoir le pH des petits pois qui se situe dans la zone optimale de croissance des *Bacillus* (Couvert, 2002) et leur richesse en amidon reconnue comme un agent de germination et de détoxification (Guiraud, 2003).

Des teneurs élevées en amidon peuvent modifier la thermorésistance de certaines espèces, indépendamment de toute action physico-chimique sur le milieu (épaississement....) susceptibles d'influencer la pénétration de la chaleur (Cheftel, 1999).

La formation d'empois d'amidon aurait diminué la transmission de la chaleur par convection et provoqué une défaillance au niveau du traitement thermique (Cheftel, 1999) justifiant ainsi la présence des *Bacillus*. La contamination des aliments par ces derniers sont associés à diverses sources en amont, en particulier l'environnement agricole et l'environnement industriel (Carlin, 2011). Les *Bacillus* sont notamment retrouvés dans le sol (Vilain *et al.*, 2006), leur présence dans cet environnement entraîne ensuite la contamination des légumes.

Les résultats du contrôle de stabilité et de stérilité nous ont orientés vers la recherche d'une flore aérobie mésophile sporulée.

7.2. Identification des cultures isolées en faveur de l'espèce

Notons que l'espèce *B. cereus* est apparue sous trois profils différents, ce qui reflète bien la diversité au sein d'une même espèce en ce qui concerne les bactéries sporulées. Ceci est confirmé par (Guinebretière *et al.*, 2008) ainsi que (Van der Auwera *et al.*, 2007) qui indiquent que *B. cereus* fait partie d'un ensemble d'espèces apparentées regroupées sous le terme *Bacillus cereus* sensu lato présentant une grande diversité phénotypique.

Les différentes espèces de *Bacillus* mésophiles isolées et identifiées par API 20E, telles que *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. sphaericus* figurent parmi celles qui ont été retrouvées dans les aliments par plusieurs auteurs (Bartoszewicz *et al.*, 2008; Iurlina *et al.*, 2006; Oomes *et al.*, 2007; Te Giffel, 2001).

D'après la Figure 3.6, la fréquence d'apparition de *B. cereus*, reconnue comme bactérie à pouvoir pathogène indiscutable (Euzéby, 2010) est de loin la plus élevée (42.5 %), relativement à celle des autres espèces du même genre. *B.cereus* est la quatrième cause de TIAC en France avec les salmonelles, les staphylocoques et les clostridium (Albert *et al.*, 2009 ; INVS, 2007 ; Delmas *et al.*, 2006 ; Delmas *et al.*, 2010). Ceci est dû au fait que la contamination des produits finis ont souvent pour origine la contamination des ingrédients : légumes, céréales, matières premières laitières... (Iurlina *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2007; Te Giffel *et al.*, 1996a). Les souches de *B.cereus* susceptibles de provenir du sol et contaminant les légumes sont particulièrement à

risque (<http://www.avignon.inra.fr>). Ces contaminations sont souvent amplifiées par les procédés de fabrication utilisés (Ronimus *et al.*, 2003 ; Scott *et al.*, 2007).

Le sol peut contenir entre 10^3 et 10^5 Spores de *Bacillus cereus* par gramme (Guinebretière *et al.*, 2003; Kotiranta *et al.*, 2000 ; Vilain *et al.*, 2006; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). C'est pour cela que cette bactérie peut être ensuite retrouvée à toutes les étapes de la chaîne de fabrication des conserves et persister dans les conserves mal stérilisées. Dans ce cas, il ne produit pas de gaz mais peut modifier leur goût.

Le passage des matières premières à une température tiède (blanchiment) avant qu'un traitement ne survienne peut mener à une augmentation dramatique de la thermorésistance des spores de *B. cereus* (Leguerinel *et al.*, 2007).

On présume que la combinaison d'une température élevée et d'un bref temps de chauffage détruit toutes les spores de *B. cereus* ; cependant, les travaux de Feijoo *et al.*, 1997, ont indiqué que quelques spores de *B. cereus* peuvent survivre, même aux traitements UHT les plus énergiques.

Les spores de *Bacillus cereus* sont largement retrouvées dans l'environnement et les installations industrielles. Ce spores posent des problèmes au niveau économique en détériorant les aliments et au niveau de la santé puisque *B. cereus* fait partie des pathogènes émergents.

Les spores de *Bacillus cereus* sont capables de résister au nettoyage classique des chaînes de production alimentaire, entraînant une recontamination rapide des surfaces (Faille *et al.*, 2010a)

La contamination supplémentaire pendant le traitement technologique peut se produire parce que les spores de *Bacillus cereus* ayant de fortes capacités d'adhérence, pourraient former des biofilms qui persistent sur la surface de l'équipement de traitement (Andersson *et al.*, 1995) et entraîner des risques importants pour la santé des consommateurs (Daryaei *et al.*, 2013).

Dans le cas de *Bacillus cereus*, la capacité des spores d'adhérer fortement aux surfaces des équipements dans les entreprises de transformation des aliments est bien établie et attribuée à leur hydrophobicité élevée (Faille *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2001; Shaheen *et al.*, 2009; Simmonds *et al.*, 2003).

Les spores de *B. cereus* hautement hydrophobes, adhèrent facilement aux équipements et sont difficiles à éliminer. En plus de l'hydrophobicité, la présence d'exosporium et d'appendices contribueraient à la persistance des spores sur les

équipements de traitement des denrées alimentaires et également à la formation de biofilm (Granum, 2007 ; Ankolekar et Labbé, 2010).

Dans la littérature, il est établi que les propriétés de surface des bactéries peuvent influencer leur adhésion à la surface des matériaux. D'après (Rönner *et al.*, 1990), les procédés de nettoyage classique ne permettent d'éliminer que 40% des spores. Cela est dû à la capacité des bactéries à adhérer fortement à de nombreuses surfaces y compris l'acier inoxydable.

Parmi les facteurs qui influencent l'attachement microbien aux surfaces inertes, les propriétés de surfaces des cellules et des supports inertes sont largement citées dans la littérature (Bagge-Ravn *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2001; Hilbert *et al.*, 2003; Van Houdt et Michiels, 2010).

Les spores de souches appartenant au groupe *B. cereus* sont généralement les plus adhérentes.

La rapidité dans le processus d'adhésion des cellules végétatives par rapport aux spores peut être expliquée par leur mobilité, sachant le rôle des flagelles dans les stades initiaux de l'adhésion de *B. cereus* (Houry *et al.*, 2010).

Les biofilms des industries alimentaires sont à l'origine de problèmes qui affectent la qualité hygiénique et sanitaire des produits transformés ainsi que celle des matériaux. En effet, les biofilms sont incriminés dans 40% de toxi-infections alimentaires en France (Lequette *et al.*, 2010), et sont considérés comme un risque pour la santé parce qu'ils constituent un refuge pour les pathogènes (Vlkova *et al.*, 2008).

Les bactéries du biofilm se détachent, et peuvent se retrouver dans le produit fini et affecter ainsi sa qualité hygiénique et sanitaire (Bagge-Ravn *et al.*, 2003; Kusumaningrum *et al.*, 2003; Brook et Flint, 2008; Pérez-Rodriguez *et al.*, 2008). Le développement de biofilm peut réduire l'efficacité des appareils par diminution de transfert de chaleur dans les échangeurs thermique ou provoquer des recontaminations (Austin et Bergeron, 1995; Chmielewski et Franck, 2003; Simoes *et al.*, 2010).

Finalement, au phénomène de résistance à la chaleur se sont ajoutés les problèmes posés par la capacité d'adhésion de *B. cereus* à différents matériaux dans les ateliers de production et/ou à la formation de biofilms résistants aux procédures de nettoyage (Euzéby, 2010).

La présence de *B. megaterium* avec une fréquence de 30.40% est inquiétante car cette bactérie est capable de produire des toxines thermostables à 30°C avec les mêmes caractéristiques physiques que le céréulide (Taylor *et al.*, 2005).

Les fréquences d'apparition de *B. sphaericus* (7.24%), de *B. pumilus* (4.60%) et de *Brevibacillus brevis* (4.53%) ne sont pas négligeables car ces espèces sont considérées par certains auteurs comme des bactéries à pouvoir pathogène opportuniste; elles peuvent être responsables de toxi-infections alimentaires chez les personnes immuno-déficientes (Euzéby, 2010).

Bacillus pumilus a été responsable de lésions cutanées similaires à celles provoquées par *B. cereus* (Tena *et al.*, 2007).

Dans la présente étude, les résultats biochimiques révélés lors de l'identification par API 50CHB sont comparables à ceux obtenus par (Haque et Russel, 2005; Logan et Berkeley, 1984 ; Rangasamy *et al.*, 1993; Te Giffel *et al.*, 1995, 1996 a,b., 1997).

Rappelons que les trois biotypes correspondants aux groupes *Bacillus cereus* identifiés par API 20E et confirmés par API 50CHB reflètent bien la diversité au sein d'une même espèce (Guinebretière *et al.*, 2008; Van der Auwera *et al.*, 2007).

Les tests biochimiques de la galerie API 20E et de la galerie API 50CHB sont les tests de références pour l'identification des bacilles sporogènes aérobies.

La galerie API 20E et la galerie 50 CHB BioMérieux permettent l'identification des caractères biochimiques principaux, mais tous les taxons ne sont pas identifiables (Logan et Berkeley, 1984). Celles-ci ne nous permettent pas de faire la distinction entre les membres du groupe *Bacillus cereus* (Carlin *et al.*, 2000; Guinebretière *et al.*, 2001).

Ces galeries ne donnent que l'appartenance au groupe *Bacillus cereus* (AFSSA, 2003). L'objectif du biotypage étant de fournir une discrimination rapide des souches en vue de la sélection de celle qui subira le séquençage de son ADNr 16S. La souche AL1, ayant obtenu le pourcentage d'identification et l'indice de typicité les plus élevés, a été sélectionnée en vue d'une caractérisation plus rigoureuse.

Actuellement, les techniques phénotypiques conservent leur importance, mais l'identification au sein du groupe *B. cereus* est difficile et nécessite le plus souvent le couplage des techniques phénotypiques et moléculaires.

IDENTIFICATION MOLECULAIRE : SEQUENÇAGE DE L'ADNr 16S

1. Introduction

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis une révision complète de la phylogénie des organismes vivants. Les nouvelles classifications phylogénétiques des bactéries sont donc basées sur des critères de proximité génétique et non plus sur des critères phénotypiques. L'ADN ribosomique 16S (ADNr 16S), qui code l'ARN ribosomique 16S reste la molécule la mieux renseignée dans les bases de données de séquences nucléotidiques et la plus employée dans la phylogénie bactérienne (Amann *et al.*, 1995; Chun *et al.*, 2007). D'une longueur de 1500 paires de bases (pb), elle possède une structure en mosaïque, composée de 9 régions hypervariables et de 10 régions conservées. De ces régions conservées peuvent être extraites des amorces ou des sondes dites «universelles». Les régions hypervariables offrent des possibilités d'amorçages spécifiques d'un taxon donné. La base de données Ribosomal Database Project 10 (RDP 10, <http://rdp/cme.msu.edu>) qui contient plus d'un million de séquences alignées d'ADNr 16S a été réalisée à partir de séquences de souches bactériennes isolées ou de clones de l'ADNr 16S.

2. Principe

La première étape consiste à extraire de l'ADN bactérien à partir d'une culture isolée sur un milieu solide. L'amplification s'effectue par PCR, suivie par une purification, une réaction de séquence, un séquençage, pour terminer avec une analyse et BLAST (Figure 4.1).

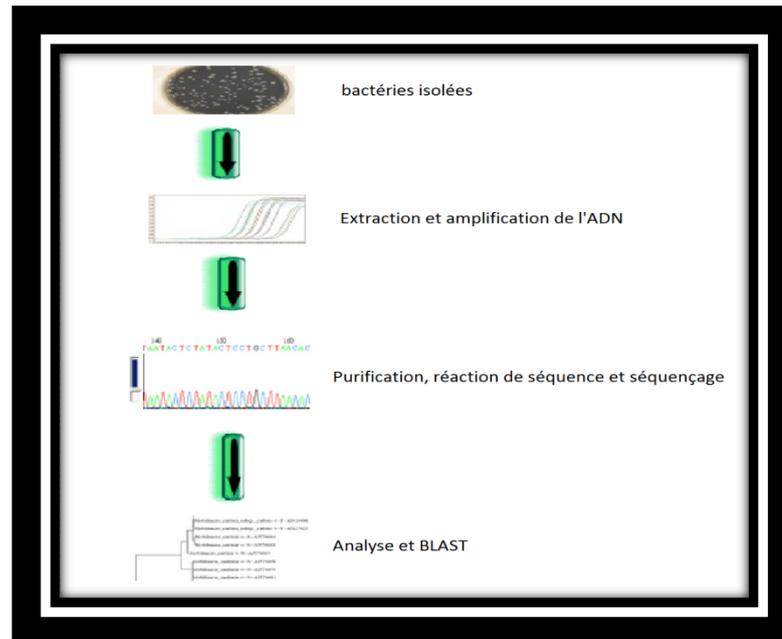


Figure 4.1. Principe du séquençage

3. Méthodologie

Un des trois profils biochimiques (AL1) obtenu par API 50CHB a été identifié par séquençage d'ADNr 16S au niveau du laboratoire Genoscreen à l'institut Pasteur de Lille.

Les extractions d'ADN ont été réalisées à l'aide du Kit « PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent » commercialisé par Applied Biosystems (Figure 4.2).

La seule différence avec le protocole fourni, est que les ADN extraits ont été dilués au 1/10ème avant l'étape de PCR afin de diluer d'éventuels inhibiteurs qui seraient présents dans la préparation.

Deux PCR ont été réalisées pour chaque ADN extrait. Les amorces utilisées pour séquencer l'ADNr16S sont les suivantes : F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), R1 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'), F2 (5'-CTCCTACGGGAGGCAG-3') et R2 (5'-GACACGAGCTGACGACA-3').

Les conditions PCR pour le couple F1-R1 sont représentées dans le Tableau 4.1 :

Quick Reference Card

For safety and biohazard guidelines, refer to the “Safety” section in the *PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent Protocol (PN 4367554)*. For every chemical, read the MSDS and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves.

For a list of required and recommended equipment, consumables, and reagents refer to the *PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent Protocol (PN 4367554)*.

DNA Sample Preparation for Bacterial and Fungal Cultures

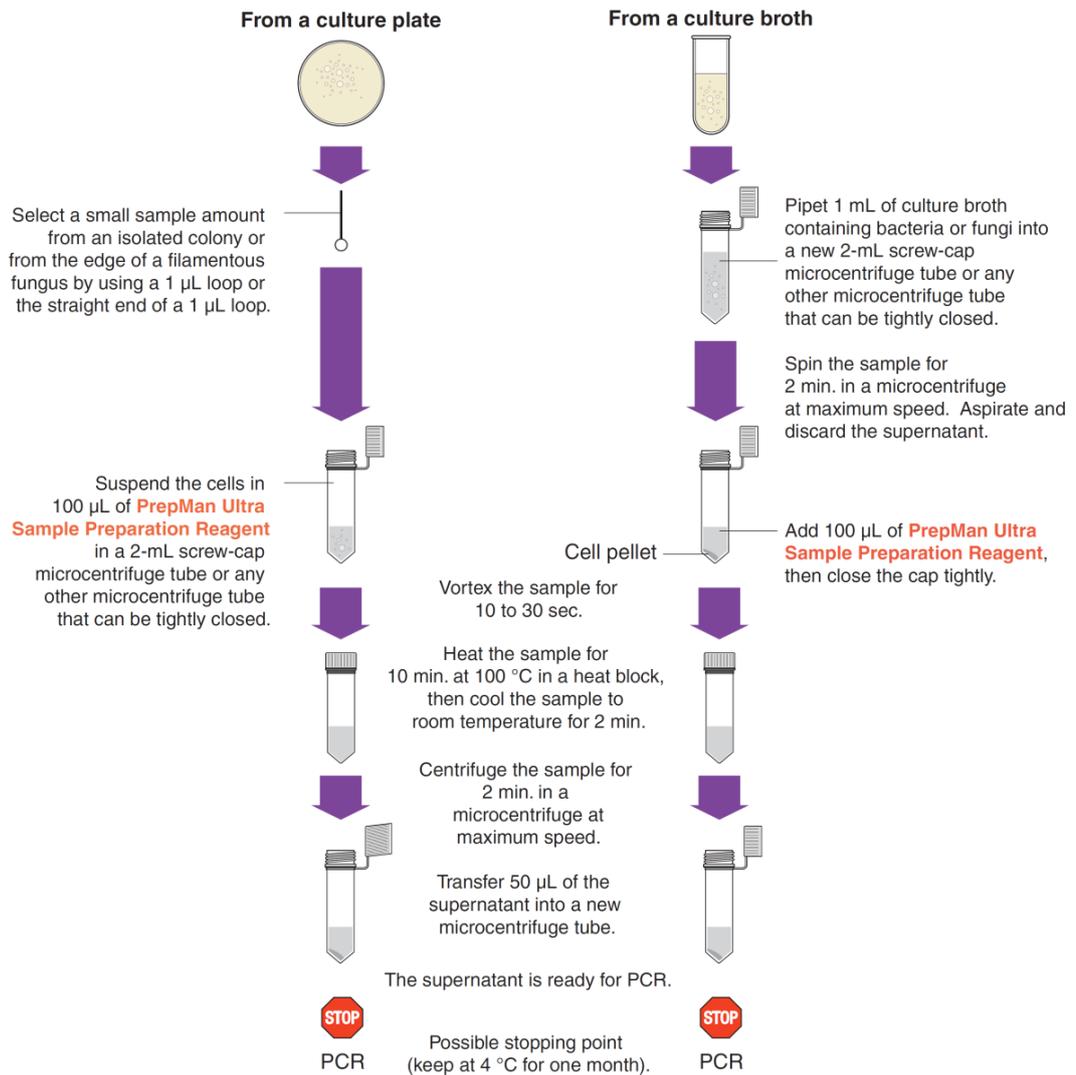


Figure 4.2. Illustration du protocole d'extraction d'ADN avec le Kit « PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent » (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_042137.pdf)

Tableau 4.1. Conditions PCR pour le couple F1-R1

	Concentration finale	Volume pour 1 puits	Fournisseur
H ₂ O		39.75µL	GIBCO
Tampon (10X)	1X	5µL	Biolabs
dNTP (4mM)	0.24mM	3µL	Roche
MgCl ₂ (25mM)	0.5mM	1µL	Applied Biosystems
Primer F 10µM	0.5pmol	0.5µL	IDT
Primer R 10µM	0.5pmol	0.5µL	IDT
Taq polymerase (5U/µL)	1U	0.25µL	Biolabs

Les conditions PCR pour le couple F2-R2 sont représentées dans le Tableau 4.2:

Tableau 4.2. Conditions PCR pour le couple F2-R2

	Concentration finale	Volume pour 1 puits	Fournisseur
H ₂ O		37.75µL	GIBCO
Tampon (10X)	1X	5µL	Biolabs
dNTP (4mM)	0.24mM	3µL	Roche
MgCl ₂ (25mM)	1.5mM	3µL	Applied Biosystems
Primer F 50µM	1pmol	0.5µL	IDT
Primer R 50µM	1pmol	0.5µL	IDT
Taq polymerase (5U/µL)	1U	0.25µL	Biolabs

Les programmes PCR sont représentés dans le Tableau 4.3 :

Tableau 4.3. Les programmes PCR

F1/R1	F2/R2
95°C 12min 92°C 2min	95°C 12min
40 cycles : 93°C 30s 55°C 30s 72°C 1min	50 cycles : 95°C 30s 60°C 30s 72°C 30s
72°C 10min	72°C 10min

Les produits de PCR ont été purifiés par aspiration sur plaque NucleoFast (MachereyNagel). Ceux-ci ont ensuite été séquencés dans les deux sens par la technique de séquençage SANGER selon des conditions optimisées par le laboratoire GenoScreen (kit Big dye terminator V3.1 et séquenceur 3730XL commercialisés par Applied Biosystems).

La technique de séquençage utilisée est adaptée de celle décrite par (Sanger *et al.*, 1977). Elle est basée sur l'incorporation de didésoxynucléotides. La polymérase permettant l'amplification du gène d'intérêt est mise en présence d'oligonucléotides non marqués (dNTP : désoxyribonucléotides triphosphate) et de didésoxynucléotides (ddNTP : didésoxyribonucléotides triphosphate) marqués par des fluochromes différents selon leur nature. L'incorporation d'un ddNTP entraîne l'arrêt de l'élongation. Ainsi, on obtient théoriquement des séquences d'ADN de toutes tailles dont le dernier nucléotide est fluorescent.

La réaction de séquence utilise la chimie du « Big Dye Terminator » (Applied Biosystem) selon les recommandations du fabricant. La solution commerciale « Big Dye Terminator » contient les dNTP, les ddNTP marqués ainsi que l'ADN polymérase. Le mélange réactionnel pour une réaction contient : le tampon de dilution du Dig Dye 0,75 µl, la solution Big Dye 0,5 µl ; l'amorce 5 pmol ; le produit PCR 30 à 50 ng et l'eau MilliQ 5 µl. La réaction s'effectue dans un thermocycleur.

Les séquences obtenues ont été assemblée et comparées dans les bases de données publiques : NCBI database et LeBibi database (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>) en utilisant l'outil : BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Ces bases de données nous ont permis d'identifier l'espèce bactérienne de la souche AL1 et d'élaborer un arbre phylogénétique.

4. Résultats et discussion

Le protocole employé pour l'extraction de l'ADN génomique de l'isolat AL1, ainsi que l'amplification du gène 16S ont permis l'obtention de la séquence nucléotidique de 1048 paires de bases (pb) représentée par la Figure 4.3 :

```
CAACCATGCACCACCTGTCACCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGTCAAGACCT
GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAG
TTTCAGCCTTGCGGCCGTACTIONCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCT
AACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCT
CAGTGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCGCTACAC
ATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGTTGAGCCGTGGGCTTT
CACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTA
CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCAC
TTGTTCTCCCTAACACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGAGACTTTC
GTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCA
CCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCAT
CCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCTTTCAATTTGAAACCATGCGGTTCAAATGTTATCCGGTATTAGCCCCGGTT
TCCCGGAGTTATCCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACTTCATAAGAGCA
AGCTCTY AATCCATTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGA
```

Figure 4.3. Séquence d'ADNr 16S pour la souche AL1

Le résultat du blast précise que cette séquence est similaire au groupe *B. cereus* à 99% de similarité sur un fragment de 1048 pb (Figure 4.4).

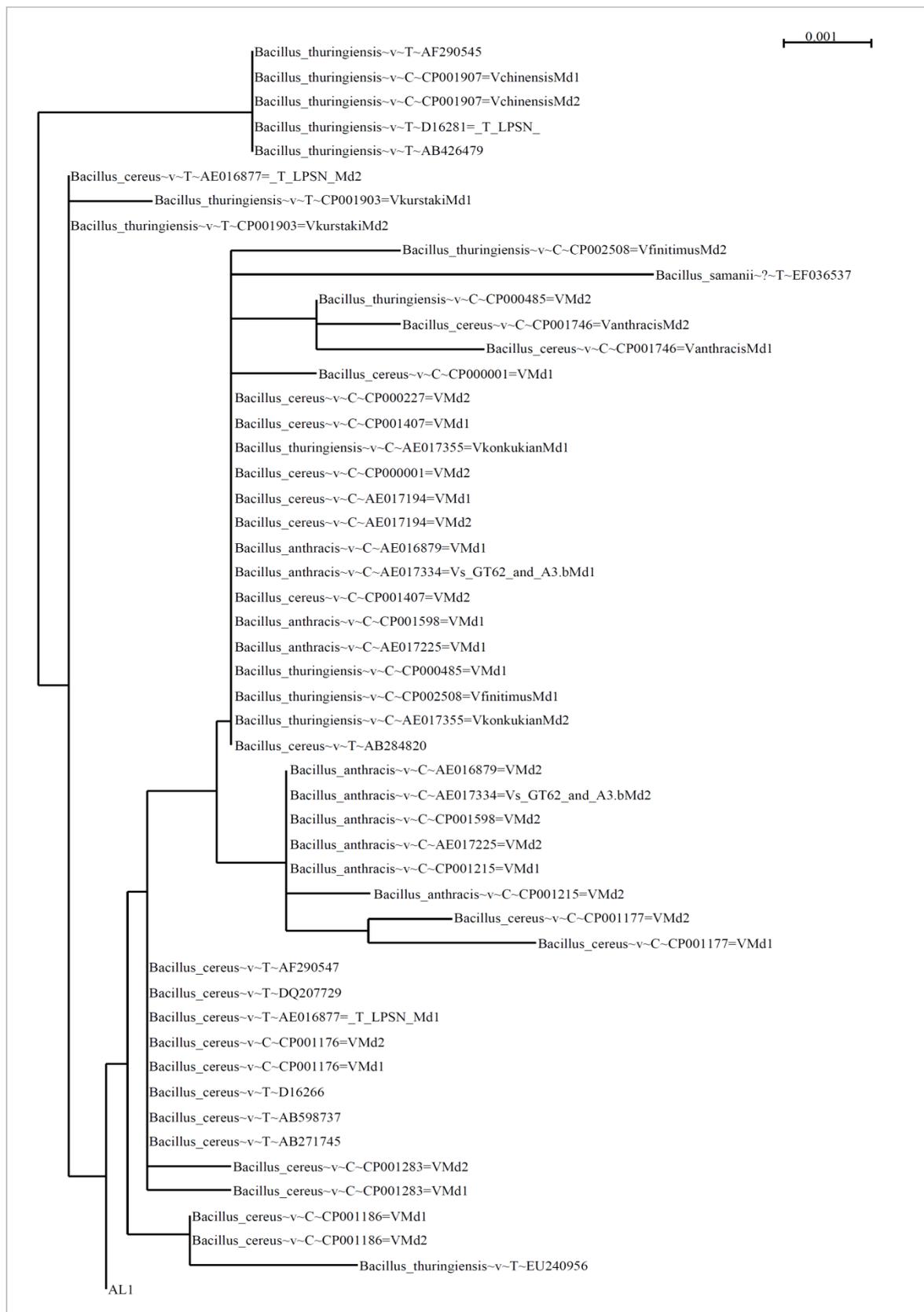


Figure 4.4. Arbre phylogénétique de la souche AL1 : position phylogénétique des séquences d'ADNr 16S. L'échelle indique 0,001 substitution par nucléotide position

La séquence de l'isolat AL1 sélectionné a été déposée dans Genbank et est enregistrée sous le numéro d'accèsion (JQ765002).

L'arbre phylogénétique du nouvel isolat AL1 (JQ765002) le représente sous la forme d'une branche unique le distinguant des autres espèces.

Dans notre étude, l'analyse du séquençage de l'ADNr 16S de la souche AL1 a confirmé les résultats obtenus par biotypage comme le préconise Guinebretière *et al.*, 2001, donc son affiliation au groupe *B. cereus* apparenté à *B. cereus*.

Les espèces les plus proches et donc apparentées sont :

Bacillus_cereus ~v ~C ~CP001176=VMd1

Bacillus_cereus ~v ~T ~D16266

Bacillus_cereus ~v ~C ~CP001176=VMd2

Bacillus_cereus ~v ~T ~AE016877=_T_LPSN_Md1

Bacillus_cereus ~v ~T ~DQ207729

Bacillus_cereus ~v ~T ~AF290547

Bacillus_cereus ~v ~T ~AB598737

Bacillus_cereus ~v ~T ~AB271745

Concernant ces espèces apparentées, aucune bibliographie n'a été publiée jusqu'à ce jour, afin de permettre une étude comparative avec la nouvelle souche isolée à partir des conserves étudiées.

L'isolat AL1 pourrait faire partie des groupes phylogénétiques II, IV, V de Guinebretière qui sont représentés par des souches mésophiles dont les spores sont caractérisées par une thermorésistance élevée (Carlin *et al.*, 2009) associées à des toxi-infections alimentaires (Guinebretière *et al.*, 2010).

Il s'agit là, d'une classification opérationnelle pour l'appréciation et la gestion du risque *Bacillus cereus* dans les aliments (EFSA, 2005).

Afin de confirmer cette hypothèse, il serait obligatoire de recourir à des techniques discriminatives, capables de fournir rapidement et avec précision des indications sur le

risque d'intoxication aux *B. cereus* préconisé par plusieurs auteurs (Chaves *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2012; Thorsen *et al.*, 2010), et ce, pour la souche (AL1).

Les bactéries du groupe *B. cereus* appartiennent aux bactéries les plus séquencées au monde (INRA). Le séquençage du gène codant l'ADNr 16S est un outil complémentaire à l'analyse des caractères phénotypiques utilisée pour identifier des bactéries. En effet, dans un certain nombre de cas, l'identification classique ne donne pas un résultat satisfaisant en terme d'identification (bactérie rare ou à croissance difficile, galeries non adaptées...). Le séquençage du gène ADNr 16S, présent chez toutes les espèces bactériennes permet d'améliorer la qualité de l'identification ou de confirmer une identification présomptive.

Des souches bactériennes appartiendront au même genre si leurs séquences d'ADNr 16S possèdent un degré de similitude supérieur à 97% et à la même espèce si le degré de similitude est de 99% (Drancourt *et al.*, 2000).

Alors que la taxonomie traditionnelle présente le groupe *Bacillus cereus* comme des espèces distinctes, la phylogénie moléculaire nouvelle et le séquençage comparé des génomes sont en faveur de leur classification en une seule espèce (Guinebretière *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2011; Tourasse *et al.*, 2011). Le concept de l'espèce unique a déjà été largement proposé notamment pour les trois espèces très proches génétiquement : *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus sensu stricto* (Hansen et Hendriksen, 2001 ; Helgason *et al.*, 2004; Priest *et al.*, 2004; Tourasse *et al.*, 2006; Vilas-Boas *et al.*, 2007). La proximité génétique de ces espèces est révélée par la similarité extrêmement élevée (plus de 99%) de leurs chromosomes (Ash *et al.*, 1991; Rasko *et al.*, 2005).

La taxonomie du groupe *B. cereus* est complexe et controversée car les caractéristiques phénotypiques discriminantes entre les différentes espèces ne sont pas stables et leurs déterminants génétiques peuvent être échangés y compris au sein des matrices alimentaires (Van der Auwera *et al.*, 2007). Quoiqu'extrême, l'exemple d'un cas d'anthrax très rare causé par une souche *B. cereus* qui a acquis les gènes de virulence de *B. anthracis* a été mis en évidence. Les transferts de gènes au sein des souches de *B. cereus* et des espèces associées sont bien une réalité et l'évaluation de la fréquence de tels processus de transformations a des conséquences tout à fait concrètes (Guinebretière et Sanchis, 2003; Guinebretière *et al.*, 2007; Lereclus *et al.*, 2004).

Selon Vilas-Boas, le débit du flux d'échange des gènes est plus élevé pour les bactéries de la même espèce. Toutefois, des échanges sont possibles entre *B. cereus* et *B. thuringiensis* (Vilas-Boas *et al.*, 2002).

Le groupe *B. cereus* est une population hautement dynamique et le transfert génétique entre les membres du groupe est un mécanisme évolutif important. Différents plasmides se retrouvent dans différentes souches de *B. cereus* et certains abritent des gènes liés à la pathogénicité ou à l'adaptation environnementale (Helgason *et al.*, 2000a; Hoffmaster *et al.*, 2004; Rasko *et al.*, 2005; Rasko *et al.*, 2007).

Le transfert génétique est possible et pourrait donc augmenter le potentiel de risque de *B. cereus*.

DENOMBREMENT DE BACILLUS CEREUS PAR METHODE STANDARDISEE ISO 7932

1. Introduction

La méthode ISO 7932 (NF, 2005) s'intitule «General guidance for enumeration of *Bacillus cereus*» ou «directives générales pour le dénombrement de *Bacillus cereus* — méthode par comptage des colonies à 30°C » (méthodes horizontales). La gélose sélective pour *Bacillus cereus* de Mossel ou milieu MYP est utilisée pour la détection et dénombrement des spores et formes végétatives de *Bacillus cereus* dans les produits alimentaires.

Le milieu MYP (mannitol- egg yolk- phenol red-polymyxin agar) permet de mettre en évidence l'activité lécithinase par un précipité visible autour de la colonie, et l'incapacité de *B. cereus* à fermenter le mannitol, qui se traduit par une coloration rose rouge autour de la colonie (Fricker *et al.*, 2008) (Figure 5.1 A). L'activité hémolytique est mise en évidence par étalement sur gélose au sang de mouton (gélose columbia additionnée de 5% de sang de mouton défibriné) et se manifeste par une zone de lyse caractéristique aux abords de la bactérie (Figure 5.1 B).

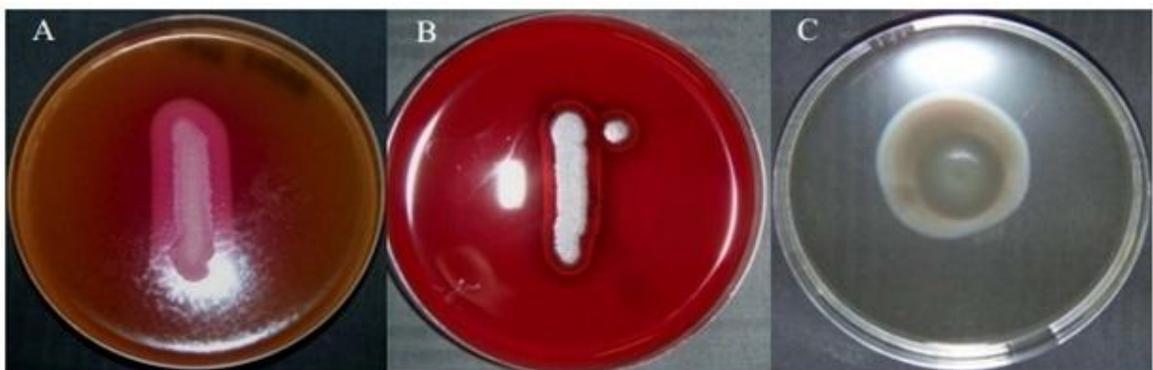


Figure 5.1. Colonies de *B. cereus* ATCC 14579 après 24h d'incubation à 30°C sur milieu MYP (A), gélose au sang de mouton (B), milieu de mobilité (C).

La mobilité importante de *B. cereus* est étudiée sur un milieu dit de mobilité (Peptone pancréatique de caséine : 20 g ; Peptone de viande : 6,1 g ; Agar-agar : 3 à 6 g ; Eau : 1000 ml) (Figure 5.1 C). L'hémolyse et le test de la mobilité correspondent à la norme V08-058 (1996).

- La Tryptone et l'extrait de viande favorisent la croissance de *Bacillus cereus*.
- L'émulsion stérile de jaune d'œuf utilisée comme additif permet de mettre en évidence la présence d'une lécithinase chez la majorité des souches de *Bacillus cereus*. Les produits insolubles résultant de la dégradation de la lécithine du jaune d'œuf s'accumulent autour des colonies pour former un précipité blanchâtre.
- La présence de mannitol permet de différencier les microorganismes contaminants qui le fermentent. Ils sont identifiés par le virage au jaune du rouge de phénol.
- La polymyxine permet d'inhiber la microflore secondaire lorsque l'échantillon à tester est fortement contaminé.

2. Méthodologie

2.1. Ensemencement et incubation

- Transférer avec une pipete stérile 1 ml de la suspension mère à la surface de 3 boîtes de Pétri du milieu de culture MYP complet préalablement coulé.
- Répéter l'opération avec les dilutions décimales suivantes.
- Etaler soigneusement l'inoculum le plus rapidement possible à la surface du milieu en évitant de toucher les bords de la boîte avec l'étaleur.
- Laisser les boîtes couvercle fermé pendant environ 15 mn à la température ambiante pour permettre à l'inoculum d'être absorbé dans la gélose.
- Retourner les boîtes préparées et les faire incuber pendant 24h à 30°C.

FORMULE-TYPE du milieu complet

(Pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....10,0 g
- Extrait de viande1,0 g
- D-mannitol10,0 g
- Chlorure de sodium10,0 g
- Rouge de phénol25,0 mg
- Emulsion stérile de jaune d'œuf100,0 mL

- Agar agar bactériologique.....13,5 g
 - Polymyxine B 10⁵ UI (0.1mL à 0.15% dans 15mL de milieu Mossel). (Rhodehamel et Stanley, 1998).
- pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2.

2.2. Comptage des colonies

Après l'incubation, on retient les boîtes contenant moins de 150 colonies, et si possible, sur deux dilutions successives. Compter sur chaque boîte les colonies présumées de *Bacillus cereus*. Celles-ci sont de couleur rose (mannitol-négatif) et presque toujours entourées d'un halo de précipité, indiquant la production de lécithinase.

2.3. Epreuves de confirmation

2.3.1. Sélection et purification des colonies

Choisir les colonies présumées être *B.cereus* à partir de chaque boîte sélectionnée pour confirmation par des tests biochimiques appropriés.

Il est recommandé d'ensemencer en stries les colonies suspectes sur une gélose non sélective pour les purifier.

2.3.2. Mise en évidence de l'hémolyse

A la surface d'une gélose au sang, ensemencer les différentes colonies en stries parallèles et incuber pendant 24 h à 30°C.

2.3.3. Examen de la mobilité

Inoculer le milieu mobilité par piqûre profonde au centre du tube à l'aide d'un fil droit portant les colonies suspectes. Incuber les tubes pendant 24h à 30°C et examiner le type de croissance le long de la ligne d'ensemencement.

2.3.4. Mise en évidence de la croissance rhizoïde

Inoculer une boîte de gélose nutritive en touchant la surface de la gélose, au centre de celle-ci. Incuber la gélose pendant 24 à 48h à 30°C.

2.3.5. Présence de cristaux de toxines protéiques

Inoculer une gélose nutritive inclinée et incuber celle-ci pendant 24h à 30°C, puis à la température du laboratoire pendant 2 à 3 jours. Préparer un frotis de la culture et

effectuer la coloration de Gram. Examiner les lames à l'immersion pour déceler la présence de spores libres et de cristaux tétraogonaux (en forme de diamant) de toxines.

Avec la coloration de Gram, les cristaux sont colorés en rose foncé et sont plus petits que les spores qui sont rose pâle ; les cellules végétatives sont d'une couleur bleu violet.

Ces tests permettent de différencier les souches typiques de *B. cereus* des autres membres du groupe *B. cereus*, incluant *B. mycoides*, *B. anthracis* et *B. thuringiensis*.

3. Expression des résultats

Le dénombrement est effectué à l'aide de l'équation suivante de calcul de la concentration de *Bacillus cereus* :

$$X = \frac{\text{Nombre total de colonies}}{\text{Volume d'inoculum}} \times \frac{1}{(1,1 \times \text{dilution})}$$

Lorsqu'on procède à l'identification des colonies, on ne retiendra que la fraction totale des colonies correspondant à la fraction observée des colonies confirmées sur les colonies prélevées et contrôlées.

4. Résultats et discussion

Les souches sélectionnées et confirmées ont été détectées dans toutes les boîtes de conserves de petits pois analysées. Ces isolats se caractérisent par la production d'une lécithinase extrêmement active, l'absence de fermentation du mannitol, une grande mobilité et une activité hémolytique intense. Dans les isolats précités, beaucoup de spores libres ont été observées mais aucun cristal parasporal coloré en rose foncé n'a été décelé. Ces isolats n'ont pas présenté d'aspect rhizoïde.

Le groupe B. cereus dont Bacillus cereus a été présent à des taux variant entre 1,1.10⁴ UFC (Unité Formant Colonie)/g de produit et 3,9.10⁴UFC/g avec une moyenne de 2,7. 10⁴UFC/g pour un total de 60 dénombrements.

Les bactéries du groupe *B. cereus* sont facilement distincts des autres *Bacillus* par leur incapacité à fermenter le mannitol et leur production de lécithinase (Fritze, 2004; Logan et Berkeley, 1984). Ainsi, les cultures à l'étude ont été identifiées au groupe *B. cereus*.

L'étape de confirmation est en partie présomptive car elle ne permet pas de faire la différence entre *B. cereus sensu stricto* et d'autres espèces proches mais néanmoins moins rencontrées comme *B. thuringiensis* et *B. mycoïdes*. Le caractère hémolytique et la mobilité sont très souvent identiques ou variables. Ainsi, *B. cereus* est mobile une fois sur deux, comme *Bacillus thuringiensis*, alors que *Bacillus mycoïdes* et *Bacillus anthracis* sont immobiles (*Bacillus mycoïdes* est parfois mobile).

Il faut mettre à part le cristal parasporal pour *Bacillus thuringiensis*, la croissance rhizoïde pour *Bacillus mycoïdes*, et l'hémolyse pour *Bacillus anthracis* (qui donne en règle générale une absence d'hémolyse).

Toutefois, il est possible de distinguer *B. cereus* par la production d'une lécithinase extrêmement active (Guinebretière et Sanchis, 2003) et tel est le cas des souches isolées dans les conserves à l'étude.

La grande mobilité et la production intense d'hémolyse interne qui ont caractérisé les isolats obtenus sur gélose MYP permettent d'éliminer la présence de *B. anthracis* qui est le seul à être immobile et non hémolytique (Vilas-Boas *et al.*, 2007). *B. thuringiensis* et *B. mycoïdes* sont souvent faiblement hémolytiques

Les hémolysines sont responsables de l'activité hémolytique de *Bacillus cereus*, et elles ont un rôle dans les infections (Turnbull *et al.*, 1979)

L'absence de cristal parasporal décelée par microscopie optique après coloration de Gram a confirmé l'absence de *B. thuringiensis* qui est le seul à en produire parmi les souches sélectionnées.

L'aspect envahissant et rhizoïde qui caractérise *B. mycoïdes* et *B. pseudomycoïdes* sur gélose nutritive n'a pas été observé. Ceci a permis d'écarter ces deux espèces du groupe *B. cereus*.

Les isolats obtenus sur milieu MYP par méthode standard (ISO7932) et confirmés appartiennent au groupe *B. cereus* et seraient des souches de *B. cereus sensu stricto*. Cette affiliation a été appuyée par le séquençage de l'ADNr 16S de l'une des souches identifiées par cette méthode.

Les spores du groupe *B. cereus* dont *B. cereus* ayant survécu au traitement thermique qui leur a été appliqué ont germé et se sont multipliées probablement pendant le stockage à température ambiante pour atteindre un niveau dangereux, pouvant provoquer des diarrhées en présence de souches à potentiel diarrhéique (EFSA, 2005).

La présence d'un taux moyen de $2,7 \cdot 10^4$ *B. cereus*/g de conserves de petits pois est tout de même alarmante. Ce constat est renforcé par les travaux de King *et al.*, 2007.

En ce qui concerne *B. cereus*, des chiffres de l'ordre de 10^4 à 10^5 *B. cereus*/g sont régulièrement cités.

Dans le cas des toxi-infections diarrhéiques, la quantité de cellules ou spores de *B. cereus* pathogènes retrouvée dans les aliments incriminés est généralement égale ou supérieure à 10^5 par gramme ou millilitre (Tsigarida *et al.*, 2009) bien que des épidémies associées à des aliments contenant 10^3 par gramme ou millilitre aient été décrites (EFSA, 2005; Kramer et Gilbert, 1989; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

Dans le cas des intoxications émétiques, les toxines peptidiques sont très stables et peuvent persister dans l'aliment même si les bactéries ont disparu (EFSA, 2005). Un minimum de 10^5 cellules de *B. cereus* par gramme ou millilitre de l'aliment, à un stade de sa production, est nécessaire pour produire suffisamment de toxines et provoquer une intoxication.

On a cependant observé des syndromes émétiques avec peu de cellules de *B. cereus* dans l'aliment (10^2 par gramme).

1. Introduction

La résistance bactérienne est un concept qui fait de plus en plus parler de lui depuis quelques années. Les conséquences de la résistance bactérienne aux antibiotiques sont considérables: augmentation de la morbidité et, dans certains cas, de la mortalité, augmentation des coûts du système de santé.

On distingue trois types de résistance microbienne : génétique, microbiologique et clinique.

La résistance génétique peut être définie comme un changement dans le code génétique du micro-organisme, codant ainsi un gène altéré.

La résistance microbiologique se traduit par la croissance ou l'absence de croissance d'une souche bactérienne en présence d'un antibiotique. La notion de souche sensible ou résistante est toujours en relation avec la concentration sanguine que peut atteindre l'antibiotique prescrit. Il faut ! par ailleurs savoir que c'est la résistance nouvelle ou acquise qui est problématique. Cette résistance tend plus à se transmettre au sein de la même espèce, ou parfois à d'autres espèces bactériennes.

La résistance clinique est la plus pertinente dans le cadre de la pratique médicale courante, puisqu'elle se traduit par l'échec clinique d'une antibiothérapie. Dans la majorité des infections, un échec clinique se traduit par l'absence d'amélioration (fièvre, état général.....) après 72h de traitement.

2. Principe de l'antibiogramme : Méthode des disques

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques.

L'antibiogramme est un outil validé par un biologiste médical qui permet à un médecin de choisir le bon antibiotique, ou l'association d'antibiotiques permettant de traiter efficacement un patient.

Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence du ou des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci. Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique : souche ou bactérie sensible, intermédiaire ou résistante.

3. Méthodologie

3.1. Réalisation pratique de l'antibiogramme

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques en milieu Mueller-Hinton, selon la méthode NCCLS (méthode de Kirby-Bauer préconisée par le National Committee for Clinical Laboratory Standards). Les antibiotiques suivants ont été testés : Pénicilline, Ampicilline, Triméthoprime, Streptomycine, Erythromycine, Imipénème, Vancomycine, Chloramphénicol, Gentamycine, Ciprofloxacine, Tétracycline, Amoxicilline, Clindamycine, Colistine.

3.2. Lecture et interprétation

Il n'existe pas actuellement de recommandation spécifique du comité de l'Antibiogramme de la Société Française de la Microbiologie pour l'interprétation de l'Antibiogramme, ni de diamètres critiques spécifiques pour *Bacillus*.

Mesurer le diamètre de la zone d'inhibition et interpréter les résultats suivant les diamètres critiques pour les diverses classes d'antibiotiques utilisés lors de notre étude (voir Tableau 6.1).

- Une **souche sensible** est une souche qui peut être atteinte par un traitement local à dose habituelle par voie générale ;
- Une **souche intermédiaire** est une souche qui peut être atteinte par un traitement local, une augmentation des doses par voie générale ou une concentration physiologique particulière (urine, bile...);

- Une **souche résistante** est une souche qui ne répondra probablement pas, quel que soit le type de traitement.

Tableau 6.1. Diamètres critiques pour les diverses classes d'antibiotiques (SFM, 2010)

ANTIBIOTIQUE	CHARGE DU DISQUE	DIAMETRE CRITIQUE (mm)	
		S	R
PENICILLINES			
Pénicilline G	15 µg (10 UI)	≥29	<18
Ampicilline	10 µg	≥21	<16
Amoxycilline	25 µg	≥23	<16
CARBAPENEMES			
Imipénème	10 µg	≥24	<17
AMINOSIDES			
Streptomycine	10 UI	≥15	<13
Gentamycine	15 µg (10 UI)	≥18	<16
PHENICOLES			
Chloramphénicol	30 µg	≥23	<19
TETRACYCLINES			
Tétracycline	30 UI	≥19	<17
MACROLIDES			
Erythromycine	15 UI	≥22	<17
LINCOSAMIDES			
Clindamycine	2 UI	≥15	<15
GLYCOPEPTIDES			
Vancomycine	30 UI	≥17	-
POLYPEPTIDES			
Colistine	50 µg	≥15	<15
FLUOROQUINOLONES			
Ciprofloxacine	5 µg	≥25	<22
SULFAMIDES TRIMETHOPRIME			
Triméthoprim	5 µg	≥16	<10

4. Résultats et discussion

50 souches du groupe *Bacillus cereus* de type AL1 confirmé ont subi le test d'antibiorésistance. Tous ces isolats sont résistants aux antibiotiques β-lactamates, telles que la pénicilline (100%) et l'ampicilline (100%), et sensibles à la gentamycine (100%), la ciprofloxacine (100%), l'imipénème (100%), la vancomycine (100%) et le chloramphénicol (100%) suivis de la streptomycine (78%).

Un nombre important de souches ont manifesté une résistance élevée à la colistine (94%) et à la triméthoprine (92%). Une résistance intermédiaire a été observée vis-à-vis de la clindamycine (84%), la tétracycline (78%), l'érythromycine (64%) et l'amoxicilline (52%) Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau 6.2 et sont représentés par les Figures 6. 1 et 6.2.

Tableau 6.2. Antibiorésistance des souches AL1 isolées des conserves de petits pois

Antibiotiques	Nombre et pourcentage (%) correspondant de souches		
	Résistant	Intermédiaire	Sensible
Pénicilline	50 (100)	-	-
Ampicilline	50 (100)	-	-
Colistine	47 (94)	3 (6)	-
Triméthoprine	46 (92)	4 (8)	-
Clindamycine	-	42 (84)	8 (16)
Amoxicilline	22 (44)	26 (52)	2 (4)
Tétracycline	-	39 (78)	11 (22)
Erythromycine	-	32 (64)	18 (36)
Gentamycine	-	-	50 (100)
Ciproflaxacine	-	-	50 (100)
Imipenème	-	-	50 (100)
Vancomycine	-	-	50 (100)
Chloramphénicol	-	-	50 (100)
Streptomycine	-	11 (22)	39 (78)

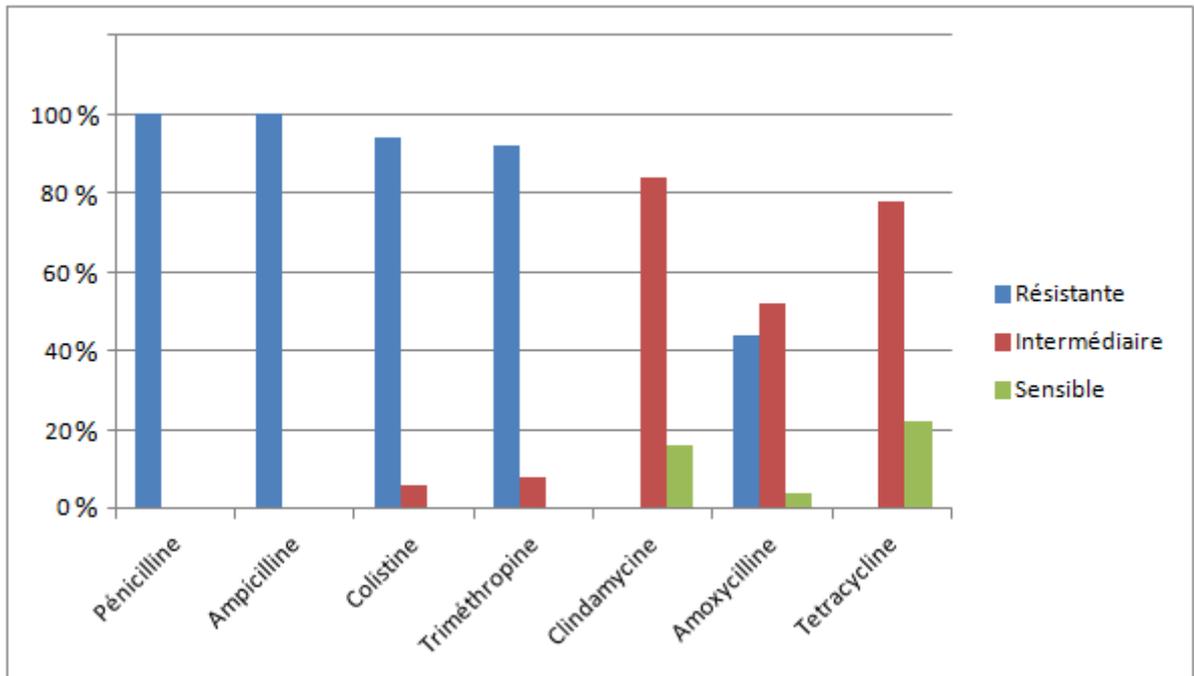


Figure 6.1. Antibiorésistance des souches du groupe *Bacillus cereus* (AL1) isolées des conserves de petits pois

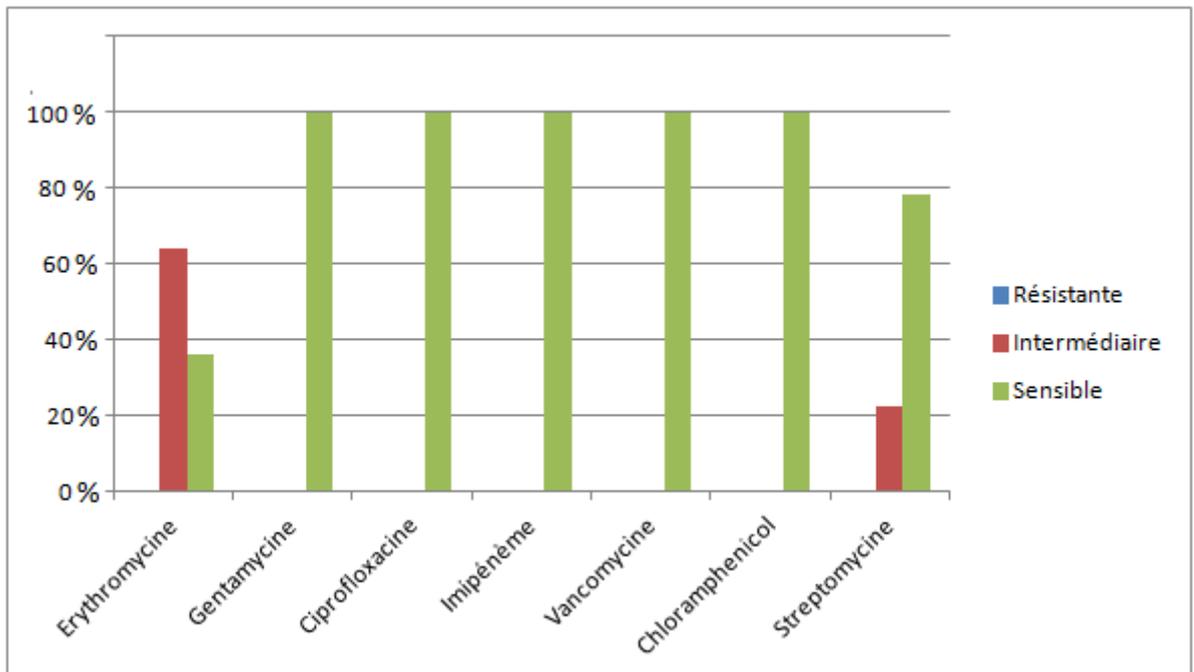


Figure 6.2. Antibiorésistance des souches du groupe *Bacillus cereus* (AL1) isolées des conserves de petits pois

Les *Bacillus* figurent parmi les bacilles Gram+ aéro-anaérobies, d'intérêt médical. Mais si l'on excepte le cas de *Bacillus anthracis*, peu d'études ont été consacrées à la sensibilité des *Bacillus* aux agents antimicrobiens.

Bacillus cereus est une bactérie toxigène dont la symptomatologie est due à des entérotoxines entraînant soit des diarrhées, soit des vomissements, ou les deux à la fois. Dans les formes les plus graves, une antibiothérapie s'impose.

Les profils de résistance des souches de type AL1 sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature (Drobniewski, 1993 ; Kim *et al.*, 2011 ; Luna *et al.*, 2007), quant à leur résistance à la pénicilline et à l'ampicilline et leur sensibilité à la gentamycine et à la vancomycine. La résistance élevée pour la plupart des souches à la colistine et à la triméthoprima a été citée par (Hafiz *et al.*, 2012). L'érythromycine a manifesté une résistance intermédiaire vis-à-vis de plus de la moitié des souches testées. Ce résultat concorde avec celui de (Kim *et al.*, 2011; Hafiz *et al.*, 2012), mais ne reflète pas les résultats des travaux d'autres auteurs qui indiquent une sensibilité élevée pour cet antibiotique (David *et al.*, 1994 ; Rusul et Yaacoub, 1995 ; Logan et Rodriguez-Diaz, 2006 ; Murray *et al.*, 2007 ; Rosovitz *et al.*, 1998).

La résistance de toutes les souches aux antibiotiques β -lactamates telles que la pénicilline et l'ampicilline, résulte de la production d'enzymes inactivantes par brouillage, qui constitue le mécanisme de résistance le plus répandu dans la nature (Recherche, 1998).

Les β -lactamases produites par les souches de *B. cereus* illustrent bien ce concept. La bactérie synthétise une enzyme qui modifie l'antibiotique et le rend inoffensif. En revanche, les β -lactamines visent des cibles extracellulaires, et doivent donc être inactivées avant leur contact avec la cellule. Des enzymes appropriées appelées β -lactamases sont excrétées dans le milieu de culture bactéries à Gram positif et interceptent l'antibiotique avant même qu'il atteigne sa cible.

La pénicilline G, qui est le premier antibiotique à avoir été largement utilisé en médecine (Fluit *et al.*, 2001) est à proscrire pour traiter les toxi-infections alimentaires provoquées par *B. cereus*.

Les pénicillines du groupe G sont actives sur les bactéries Gram positives dont les bacilles Gram positifs mais inactives sur les bacilles Gram négatif. Après de fréquentes utilisations d'antibiotiques, les germes développent des mécanismes de défense et deviennent résistants à ces antibiotiques.

L'érythromycine est un antibiotique d'origine naturelle de la classe des macrolides, seulement actifs contre les bactéries Gram positives.

Ainsi, une souche de *B. cereus* sensible aux macrolides telle que l'érythromycine peut, par camouflage (Recherche, 1998), devenir résistante à ce même antibiotique par modification de sa cible pour la rendre insensible à son action. La cible du médicament est une composante des ribosomes, l'ARN ribosomal 23S, qui est indispensable à la synthèse des protéines. Dans ce cas, les bactéries synthétisent une méthylase qui modifie l'ARN ribosomal 23S du ribosome bactérien. L'antibiotique n'a plus d'affinité pour le ribosome ainsi modifié.

Enfin, une bactérie comme *B. cereus* peut devenir résistante aux macrolides (érythromycine) par un deuxième mécanisme dit d'efflux, où une pompe, agissant comme une porte tournante, expulse l'antibiotique dès son entrée à l'intérieur de la bactérie, l'empêchant ainsi d'atteindre sa cible (Weiss *et al.*, 2001).

Cet efflux conduit à une diminution de la concentration initiale de l'antibiotique (Lozniewsky et Rabaud, 2010).

Dans la grande majorité des cas, l'apparition d'une résistance nouvelle correspond à un nouveau gène. Or l'émergence de nouveaux gènes nécessite parfois plusieurs millions d'années. La rapidité avec laquelle les gènes de résistance sont apparus indique donc qu'ils préexistaient dans les populations bactériennes (Weiss *et al.*, 2001).

La résistance aux antibiotiques est un problème de santé publique de plus en plus grave dans le monde.

L'utilisation inappropriée d'antibiotiques est l'un des facteurs favorisant la résistance aux antibiotiques.

L'utilisation inappropriée d'antibiotiques peut comprendre (Gyssens *et al.*, 1992):

- la prescription d'antibiotiques lorsque ceux-ci ne sont pas nécessaires;
- l'utilisation trop généreuse d'antibiotiques à large spectre ou l'utilisation incorrecte d'antibiotiques à spectre étroit;
- une dose d'antibiotiques plus faible ou plus forte que nécessaire chez le patient traité;
- une durée du traitement antibiotique trop courte ou trop longue;
- un traitement antibiotique non rationalisé en fonction des résultats des cultures microbiologiques.

L'utilisation prudente des antibiotiques peut prévenir l'émergence et la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques (Davey et al., 2005 ; Lepper et al., 2002 ; Carling et al., 2003 ; de Man et al., 2000).

CONCLUSION

Les micro-organismes présents dans les denrées alimentaires peuvent provoquer des modifications organoleptiques et altérer la qualité marchande des produits, ou constituer un danger pour la santé publique en raison de leur pouvoir pathogène pour l'Homme. Les aliments prêts à être consommés, comme les conserves, sont de plus en plus populaires ; or, ils sont susceptibles d'héberger de tels micro-organismes. Ces aliments proviennent de notre environnement immédiat, mais, de plus en plus, de pays divers...

Le travail entrepris dans le cadre de cette thèse nous a permis d'explorer et de quantifier la flore de 10 lots de boîtes de conserve végétales (petits pois) de l'importation dans le but de vérifier leur conformité relativement aux normes réglementaires. Un profil de résistance vis-à-vis des antibiotiques couramment utilisés a été établi pour l'espèce qui pourrait être incriminée dans les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC).

Au terme de notre étude, nous avons pu constater que l'exposition des boîtes de conserves de petits pois, à 30°C pendant 21 jours et à 55°C pendant 7 jours n'a entraîné aucune modification visible du contenant et du contenu. L'emballage n'a subi aucune déformation, le pH et les caractéristiques organoleptiques ont été préservés.

Des formes bacillaires plus au moins longues, parfois sporulées, colorées en violet foncé et des cultures abondantes et variées ont caractérisé le microbiote des conserves incubées à 30°C pendant 21 jours.

Une analyse microbiologique classique, a permis d'avancer que les conserves de petits pois étudiées ont constitué un véritable bouillon de culture pour les bactéries sporulées mésophiles du genre *Bacillus*.

Deux caractérisations biochimiques par méthodes numérisées ont permis d'identifier *B. cereus* sous trois profils différents ainsi que d'autres espèces du même genre. La fréquence d'apparition de *B. cereus* à pouvoir pathogène incontournable a été de loin la plus élevée (42,50%), relativement à celle des autres espèces à pouvoir pathogène opportuniste.

La multiplication de *B. cereus* et autres espèces de *Bacillus* potentiellement pathogènes pendant le stockage et la manipulation des aliments (conservation) est possible et peut conduire à des niveaux dangereux de bactéries au moment de la consommation. De plus l'analyse moléculaire a révélé la présence de bactéries du groupe *B. cereus* apparentées à *B. cereus*.

Les bactéries du groupe *B. cereus* dont *B. cereus* ont été détectées dans toutes les boîtes analysées à un taux moyen de $2,7 \cdot 10^4$ UFC par gramme de conserves de petits pois.

Nos expérimentations nous ont permis de vérifier certains résultats rapportés dans la littérature. En effet, nous avons pu constater que:

- Dans l'analyse d'une conserve alimentaire, il ne faut jamais dissocier le couple contenant et contenu car les résultats obtenus nous mettent en garde, quant aux boîtes de conserve d'apparence normale.
- Les bactéries sporulées représentent le problème numéro un de l'industrie de la conserve. La microflore sporulée contaminante détectée dans nos boîtes de conserve de petits pois, a pour origine une matière première de mauvaise qualité bactériologique et une hygiène non respectée au cours des traitements technologiques de conservation. Celle-ci a été sélectionnée par un traitement thermique défectueux. La germination des spores a été favorisée par :
 - Le pH des petits pois, voisin de la neutralité, et leur richesse en amidon.
 - Les conditions de stockage et de distribution de ces conserves à une température ambiante.

La santé du consommateur constitue un défi majeur pour l'industrie agroalimentaire et plus particulièrement la conserverie. Au stade ultime de la fabrication, le produit fini, la conserve de petits pois dans notre cas, contient une microflore qui est la résultante de son « histoire ». L'obtention de produits de bonne qualité sanitaire impose donc :

- Une mise en boîtes de légumes fraîchement cueillis.
- Une mise en œuvre de matières premières de bonne qualité microbiologique.
- Une hygiène rigoureuse au niveau de toutes les opérations technologiques.
- L'application d'un traitement optimisé prenant en compte l'ensemble des données relatives à la thermorésistance des flores pathogènes et d'altération, ainsi que celles de la composition du produit.

- Un stockage à une température et une humidité convenables durant toute la durée de vie du produit afin d'éviter son altération du point de vue organoleptique et son oxydation.

Grave, est le cas des boîtes de conserves de petits pois analysées relativement à une conserve altérée qui est habituellement dissuasive vis-à-vis du consommateur. Bien que d'apparence normale, et ne relevant aucune modification du contenant et du contenu, celles-ci ont été le siège d'un développement microbien dangereux. La contamination des conserves à l'étude par des *Bacillus* mésophiles, constitue donc une problématique importante pour ces conserves ayant subi un traitement thermique insuffisant et stockées longtemps à une température ambiante, favorable à leur prolifération.

La principale voie de transmission de *B. cereus* à l'Homme est alimentaire. En effet, par son abondance dans le sol et la résistance de ces spores, *B. cereus* peut contaminer pratiquement toutes les catégories d'aliments et particulièrement les végétaux.

B. cereus possède une grande capacité d'adaptation aux nombreux stress qu'il rencontre au cours de différentes étapes de fabrication des aliments, notamment la stérilisation. Dans toutes les boîtes de conserves analysées, l'abondance des bactéries *B. cereus*, peut donc être considérée comme un indicateur d'une contamination tellurique et/ou environnementale (formation de biofilms), non maîtrisée par le traitement thermique qui leur a été appliqué.

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

Au terme de notre étude, il apparaît que les dangers microbiens les plus pertinents dans les conserves de légumes à $pH > 4,5$, en particulier les petits pois, sont les bactéries sporulées du genre *Bacillus* et principalement celles du groupe *B. cereus*. Ces dernières, recouvrent une grande diversité de comportement et virulence, ce qui rend très difficile l'identification et la maîtrise du danger qu'il représente dans les aliments.

En conclusion, la présence de *B. cereus*, avec risques pour la santé, est utilisée aujourd'hui comme indicateur de l'hygiène des lignes de transformation (process). Leur première caractéristique est que le traitement thermique d'appertisation s'avère

parfois insuffisant pour stabiliser le produit. D'où l'importance de maîtriser la contamination en spores avant le traitement assainissant, cette contamination provient de la matière première ou résulte d'accumulation et/ou prolifération microbactérienne sur la ligne, par exemple dans les zones chaudes ou difficiles à nettoyer. C'est pourquoi les entreprises devraient suivre ces contaminations dans les matières premières et sur les lignes de production pour identifier les sources de contaminations et procéder, si besoin, à des actions correctives, d'où l'importance du HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point).

La présence de *Bacillus* revivifiables, non tolérés par la législation des conserves alimentaires, certifie que les boîtes de petits pois analysées, non stables sur le plan microbiologique, sont donc commercialement non stériles et par là même, impropres à la consommation.

La sécurité alimentaire est une priorité de santé publique et un enjeu économique majeur. Pour ces raisons, avant leur mise en vente sur le marché national, il est impératif, pour les laboratoires d'expertise, de renforcer les contrôles de qualité des produits finis et les barrières aux importations de ces produits à risques.

Dans un contexte où l'assurance qualité est un élément incontournable de la stratégie du développement industriel, l'intérêt de *Bacillus cereus* réside dans le fait qu'il est présent sur toute la chaîne alimentaire dans des conditions variables. Il est donc un bon marqueur pour estimer l'influence des procédés de fabrication alimentaire dans l'émergence de micro-organismes sporulés, qui peuvent éventuellement acquérir des propriétés pathogènes. En ce sens, *B. cereus* n'est pas qu'un problème de santé publique potentiel, c'est aussi un modèle susceptible de caractériser les bactéries pouvant gêner l'innovation des procédés de fabrication industriels.

En présence de pression sélective due à l'utilisation d'antibiotiques, les bactéries ont la capacité d'acquérir et d'échanger entre elles des gènes de résistance à certains antibiotiques. Ce potentiel d'échange de gènes n'est pas exclu chez les bacilles du groupe *cereus* tels que *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* et *B. anthracis* qui sont des espèces phylogénétiquement très proches. Lors d'infections bactériennes graves, un traitement rapide et ciblé avec des antibiotiques appropriés peut être vital. Il est donc important de connaître et de suivre l'évolution des résistances aux antibiotiques, afin de prévenir l'émergence de résistances multiples au sein de familles de bactéries aujourd'hui encore traitables par antibiotiques.

Au niveau scientifique (recherche)

Avant d'être reconnu comme un agent d'intoxication alimentaire, *Bacillus cereus* était connu comme un agent d'altération des denrées alimentaires. C'est une bactérie particulièrement nuisible pour la qualité gustative du lait et des œufs. Même si ces informations laissent penser que d'autres types d'aliments peuvent être altérés par *B. cereus*, ceci n'a cependant jamais été relaté dans la littérature scientifique. Il serait donc intéressant de voir quels seraient les effets sur les légumes pour ne citer qu'eux.

Les bactéries sporulées pathogènes renferment une grande diversité. La virulence, l'adhésion aux surfaces dans les ateliers de production et la résistance à la chaleur sont extrêmement variables au sein d'une même espèce. Pour cela, une meilleure connaissance de l'écologie et de la physiologie de ces bactéries permettra de mieux adapter les traitements thermiques de conservation à chaque type de produit et éviter ainsi tout problème de santé publique.

Contrairement à d'autres bactéries (comme les staphylocoques et les entérocoques) dont on connaît aujourd'hui de nombreux mécanismes de résistance et leur mode de transmission, les mécanismes de résistance aux antibiotiques sont encore très mal connus chez les *Bacillus*. Des connaissances plus approfondies sur la biologie moléculaire et les systèmes de résistance devraient permettre de détecter les gènes de résistance spécifiques aux *Bacillus* ainsi que de déterminer le potentiel d'acquisition et de propagation des résistances aux antibiotiques de ces *Bacillus*.

Au niveau industriel

En conserverie, au lieu de « matraquer » les produits par des traitements thermiques trop sévères, entraînant une dégradation des qualités nutritives et organoleptiques des aliments, l'avenir de l'Appertisation est probablement de jouer sur l'application de la théorie des barrières (Hurdle Technology). Cette piste vise à combiner plusieurs traitements modérés (acidification de l'aliment combinée à un traitement thermique,

par exemple) dont l'action simultanée est plus importante que la somme des effets individuels.

Au niveau du contrôle au laboratoire

Le recours aux examens microbiologiques de lots de produits finis a longtemps constitué l'un des fondements pour assurer la sécurité alimentaire.

Une analyse microbiologique rigoureuse peut se révéler longue et l'interprétation parfois difficile. Pour améliorer ces techniques classiques, les outils de la biologie moléculaire devraient permettre de développer des tests diagnostiques rapides, sensibles et quantitatifs pour venir confirmer les résultats obtenus par les méthodes traditionnelles.

La présence d'un germe potentiellement dangereux constitue un risque qu'il est important d'évaluer avec précision par la recherche et le dosage des toxines.

Des prélèvements microbiologiques doivent être effectués avant l'instauration d'un traitement antibiotique empirique ainsi que la surveillance des résultats des cultures et une rationalisation du traitement antibiotique en fonction des résultats des cultures.

Au niveau épidémiologique

La recherche et la prévalence des bactéries sporulées du genre *Bacillus cereus* dans les aliments suspects ne sont pas effectuées au cours d'épisodes de toxi-infection alimentaire collective (TIAC) en Algérie, au même titre que d'autres pathogènes.

Chaque foyer de TIAC doit faire l'objet d'une enquête épidémiologique précoce et méthodique nécessitant un recueil soigneux des données cliniques, bactériologiques et alimentaires, suivie d'une analyse statistique de ces données facilitée par l'informatique.

L'identification de l'agent responsable, de l'aliment vecteur, de l'origine de sa contamination permet de prendre rapidement les mesures qui empêcheront les récurrences. La déclaration obligatoire de tout foyer de TIAC à l'autorité sanitaire est une condition indispensable pour qu'une surveillance épidémiologique soit réalisée au plan national.

BIBLIOGRAPHIE

- ADRIA, 2010, Les bactéries thermorésistantes, [http://www.bretagne-innovation.tm.fr/Agenda/Les bactéries Thermorésistantes](http://www.bretagne-innovation.tm.fr/Agenda/Les_bactéries_Thermorésistantes)
- 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. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 165-173.
- AFNOR, 1976, Normes, Volume 401, 1^{ère} édition.
- AFSSA, 2003, Avis de l'AFSSA relatif à la révision de l'arrêté ministériel du 21 Décembre 1979, relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées animales ou d'origine animale – AFSSA saisine n° 2003-SA-0039. Agence française de sécurité sanitaire des aliments, 1-34
- Agata N., Ohta M., Arakawa Y., Mori M., 1995, The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxin protein. *Microbiology*, 141: 983-988.
- Aguirre J. S., Pin C., Rodriguez M. R., Fernando G. D., 2009, Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food, *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 6992-6997.
- Albert I., Couvert O., De Buyser M. L., Denis C., Fail C., Gohar M., Leguerinel I., Lereclus D., Nguyen-The C., Sorokine A., Torny D., 2009, Etude de l'émergence d'une bactérie pathogène dans les filières alimentaires. Le cas de *Bacillus cereus* dans les produits non stériles traités thermiquement, *Bulletin de la Société Française de Microbiologie*, 24 (4): 507-514
- Al-Jamali J., Felmerer G., Alawadi K., Kalash Z., Stark G. B., 2008, Flexor tendon sheath infection due to *Bacillus cereus* after penetrating trauma, *Eur. J. Plastic Surg.*, 31: 201-203
- Al-Shabibi M. M. A., Langner E. H., Tobias J., Tuckey S. L., 1964, Effect of Added Fatty Acids on the Flavor of Milk, *Journal of Dairy Science*, 47: 295-296.
- Altıparmak U. E., Ozer P. A., Ozkuyumcu C., Us A. D., Aslan B.S., Duman S., 2007, Postoperative endophthalmitis caused by *Bacillus cereus* and *Chlamydia trachomatis*, *J. Cataract. Refract. Surg.*, 33: 1284-1287.
- Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K. H., 1995, Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59 (1): 143-169
- Andersson A., Ronner U., Granum P. E., 1995, What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?, *Int. J. Food Microbiol.*, 28 (2): 145-155.
- ANKOLEKAR C., LABBÉ R. G., 2010, Physical characteristics of spores of food-associated isolates of the *Bacillus cereus* group, *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 982-984.

- ANSES, 2011, Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments/*Bacillus cereus*, Septembre 2011, <http://www.anses.fr>
- Appert N., 1810, L'Art de conserver pendant plusieurs années, toutes les substances animales et végétales, Paris.
- Ash C., Farrow J. A. E., Wallbanks S., Collins M. D., 1991, Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. Lett. Appl. Microbiol., 13 : 202-206.
- Auger S., Galleron N., Bidnenko E., Ehrlich S. D., Lapidus A., Sorokin A., 2008, The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is representative of a cluster of thermophilic strains, Applied and Environmental Microbiology, 74(4) : 1276-1280.
- Austin J.W., Bergeron G., 1995, Development of bacterial biofilms in dairy processing lines, Journal of dairy research, 62 : 509-519.
- Awad K. M., Saadaoui I., Rouis S., Tounsi S., Jaoua S., 2006. Differentiation Between *B. thuringiensis* strains by gyrB PCR-Sau3AI Fingerprinting, Mol. Biotechnol., 35 : 1-7
- Bagge-Ravn D., Hjelm M., Johansen C., Huber I., Gram L., 2001, *Shewanella putrefaciens* Adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. Applied and environmental microbiology, 67: 2319-2325.
- Bagge-Ravn D., Ng Y., Hjelm M., Christansen J. N., Johansen C., Gram L., 2003. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries - analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. Int. J. Food Microbiol., 87: 239-250.
- Baron F., Cochet M. F., Grosset N., Madec M. N., Briandet R., Dessaigne S., Chevalier S., Gautier M., Jan S., 2007, Isolation and characterization of a psychrotolerant toxin producer, *Bacillus weihenstephanensis*, in liquid egg products, J. Food Prot., 70(12) : 2782-2791.
- Bartoszewicz M., Hansen B. M., Swiecicka I., 2008, The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk, Food Microbiol., 25: 588-96.
- Bavykin S. G., Lysov Y. P., Zakharev V., Kelly J. J., Jackman J., Stahl D. A., Cherni A., 2004, Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and gyrB gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms, J. Clin. Microbiol. 42 : 3711-3730.
- Bédard R., 2006, Pois vert, L'encyclopédie canadienne, Fondation Historica du Canada, <http://www.passeportsante.net/fr>
- Beecher D. J., Schoeni J.L., Wong A. C. L., 1995, Enterotoxic activity of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*, Infect. Immun., 63: 4423-4428.
- Beecher D. J., Wong A. C. L., 1997, Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*: hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon, J. Biol. Chem., 272: 233-239.
- Beecher D. J., Wong A. C. L., 2000, Tripartite haemolysin BL: isolation and characterization of two distinct homologous sets of components from a single *Bacillus cereus* isolate, Microbiology, 146: 1371-1380.
- Bièche C., De Lamballerie M., Chevret D., Federighi M., Tresse O., 2012, Dynamic proteome changes in *Campylobacter jejuni* 81-176 after high pressure shock and subsequent recovery, Journal of

Proteomics, 75: 1144-1156.

- Bielaszewska M., Mellmann A., Zhang W., Köck R., Fruth A., Bauwens A., Peters G., Karch H., 2011, Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study, *The Lancet Infectious Diseases*, 11: 671-676.
- Bottone E.J., 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen, *Clin. Microbiol. Rev.*, 23: 382-398.
- Brooks J. D., Flint S. H., 2008, Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International journal of food and science technology*, 43 (12): 2163-2176.
- Brossard H., Leyral G., Terry O., 2008, Activités technologiques en microbiologie, Tome 2: Bactériologie systématique, Collection Biologie Technique, CRDP Aquitaine.
- Burgess S. A., Lindsay D., Flint S. H., 2010, *Thermophilic bacilli* and their importance in dairy processing, *International Journal of Food Microbiology*, 144: 215-225.
- Cadot C., Tran S.L., Vignaud M.L., De Buyser M.L., Kolsto A.B., Brisabois A., Nguyen-The C., Lereclus D., Guinebretière M. H., Ramarao N., 2010. InhA1, NprA, and HlyII as candidates for markers to differentiate pathogenic from nonpathogenic *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 48: 1358-1365.
- Callegan M. C., Kane S. T., Cochran D. C., Gilmore M. S., Gominet M., Lereclus D., 2003, Relationship of plcR-regulated factors to *Bacillus endophthalmitis* virulence, *Infect. Immun.*, 71: 3116-24.
- Carlin F., Guinebretière M. H., Choma C., Pasqualini R., Braconnier A., Nguyen-The C., 2000, Spore-forming bacteria in commercial cooked, pasteurized and chilled vegetable purées, *Food Microbiol.*, 17: 153-165.
- 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.
- Carlin F., Brillard J., Broussolle V., Clavel T., Duport C., Jobin M., Guinebretière M. H., Auger S., Sorokine A., Nguyen-The C., 2009. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment, *Food research international*, 43: 1885-1894.
- Carlin F., 2011, Origin of bacterial spores contaminating foods, *Food Microbiology*, 28: 177-182.
- Carling P., Fung T., Killion A., Terrin N., Barza M., 2003, Favorable impact of a multidisciplinary antibiotic management program conducted during 7 years, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 24(9): 699-706.
- Carrera M., Zandomeni R. O., Fitzgibbon J., Sagripanti J. L., 2007, Difference between the spore sizes of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species, *Journal of Applied Microbiology*, 102(2): 303-312.
- Castanha E. R., Fox A., Fox K. F., 2006, Rapid discrimination of *Bacillus anthracis* from other members of the *B. cereus* group by mass and sequence of "intact" small acid soluble proteins (SASPs) using mass spectrometry, *J. Microbiol. Methods*, 67: 230-240.
- Ceuppens S., Van de Wiele T., Rajkovic A., Ferrer-Cabaceran T., Heyndrickx M., Boon N., Uyttendaele M., 2012, Impact of intestinal microbiota and gastrointestinal conditions on the *in vitro* survival and growth of *Bacillus cereus*, *Int. J. Food Microbiol.*, 155: 241-246.

- Chaves J. Q., Pires E. S., Vivoni A. M., 2011, Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *B. cereus* isolated from food in Brazil over three decades, *Int. J. Food Microbiol.*, 147: 12-16.
- Cheftel J. C., Cheftel H., Besançon P., 1999, Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments, Ed. Lavoisier Tec & Doc.
- Chen M. L., Tsen H. Y., 2002, Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites, *J. Appl. Microbiol.*, 92: 912-919.
- Chen L., Daniel R. M., Coolbear T., 2003, Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders, *International Dairy Journal*, 13: 255-275.
- Chen L., Coolbear T., Daniel R. M., 2004, Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus sp.* isolated from milk powder production lines, *International Dairy Journal*, 14: 495-504.
- Chen W. M., Tseng Z. J., Lee K. S., Chang J. S., 2005, Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge, *Int. J. Hydrogen Energy*, 30: 1063-1070.
- Cherif A., Brusetti L., Borin S., Rizzi A., Boudabous A., Khyami-Horani H., Daffonchio D., 2003, Genetic relationship in the '*Bacillus cereus* group' by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment, *J. Appl. Microbiol.*, 94: 1108-1119.
- Chmielewski R. A. N., Frank J. F., 2003, Biofilm formation and control in food processing facilities, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2: 23-32.
- Chun J., Lee J. H., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B. K., Lim Y. W., 2007, EzTaxon: a webbased tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57: 2259-2261.
- Clair G., Roussi S., Armengaud J., Duport C., 2010, Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions, *Mol. Cell. Proteomics*, 9: 1486-1498.
- Clavel T., Carlin F., Lairon D., Nguyen-The C., Schmitt P., 2004, Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach, *Journal of Applied Microbiology*, 97: 214-219.
- Clavel T., Carlin F., Dargaignaratz C., Lairon D., Nguyen-The C., Schmitt P., 2007, Effects of porcine bile on survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and Haemolysin BL enterotoxin production in reconstituted human small intestine media, *Journal of Applied Microbiology*, 103(5): 1568-1575.
- Codex Alimentarius, 2003, Codex Stan 106-1983. rev 1-2003. General standard for irradiated foods
- Colmer A. R., 1948, The Action of *Bacillus cereus* and Related Species on the Lecithin Complex of Egg Yolk, *Journal of Bacteriology*, 55: 777-785.
- Coorevits A., De Jonghe V., Vandroemme J., Reekmans R., Heyrman J., Messens W., De Vos P., Heyndrickx M., 2008, Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional farms, *Syst. Appl. Microbiol.*, 31: 126-40.
- Coorevits A., Dinsdale A. E., Halket G., Lebbe L., De Vos P., Van Landschoot A., Logan N. A., 2012, Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*,

- G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly '*thermoglucosidasius*'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 62(7): 1470-1485
- Cortezzo D. E., Koziol-Dube K., Setlow B., Setlow P., 2004, Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes spores to subsequent stress, Journal of Applied Microbiology, 97: 838-852.
- Couvert O., 2002, Prise en compte de l'influence du pH dans l'optimisation des Traitements thermiques, Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, France.
- Crane P. K., Crane H. M., 2007, Indwelling intravenous catheter-associated *Bacillus cereus* sepsis in an immunocompetent patient, Infect. Med., 24:40-42.
- Daryaei H., Balasubramaniam V. M., Legan J. D., 2013, Kinetics of *Bacillus cereus* spore inactivation in cooked rice by combined pressure-heat treatment, Journal of Food Protection, 560-735.
- Davey P., Brown E., Fenelon L., Finch R., Gould I., Hartman G., Holmes A., Ramsay C., Taylor E., Wilcox M., Wiffen P., 2005, Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital inpatients, The Cochrane Database of Systematic Reviews, (4):CD003543.
- David D. B., Kirkby G. R., Noble, B. A., 1994, *Bacillus cereus* endophthalmitis, The British Journal of Ophthalmology, 78(7): 577-580.
- De Jonghe, V. Coorevits A., De Block J., Van Coillie E., Grijspeerdt K., Herman L., De Vos P., Heyndrickx M., 2010, Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk, International Journal of Food Microbiology, 136(3): 318-325.
- De Man P., Verhoeven B. A. N., Verbrugh H. A., Vos M. C., Van Den Anker J. N., 2000, An antibiotic policy to prevent emergence of resistant bacilli, Lancet, 355(9208): 973-978.
- De Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B., 2009, Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 3. The Firmicutes. 2nd edition, Springer, Dordrecht.
- Delarras C., 2014. Pratique en microbiologie de laboratoire : Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Ed. Lavoisier Tec & Doc.
- Delmas G., Gallay A., Espié E., Haeghebaert S., Pihier N., Weill F. X., De Valk H., Vaillant V., Désenclos J. C., 2006, Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 51-52: 418-422.
- Delmas G., Jourdan da Silva N., Pihier N., Weil F. X., Vaillant V., De Valk H., 2010, Les toxi infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008, Bulletin épidémiologique hebdomadaire, 31-32: 344-348
- Di Franco C., Beccari E., Santini T., Pisaneschi G., Tecce G., 2002, Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*, BMC Microbiology, 2(1): 33-47.
- Didelot X., Barker M., Falush D., Priest F. G., 2009, Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group, Syst. Appl. Microbiol., 32: 81-90.
- 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, *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8): 4277-4279.
- Doyle R. J., Nedjat-Haiem F., Singh J. S., 1984, Hydrophobic characteristics of *Bacillus spores*, *Curr. Microbiol.*, 10: 329-332.
- Drancourt M., Bollet C., Carlioz A., Martelin R., Gayral J. P., Raoult D., 2000, 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates, *Journal of clinical microbiology*, 38(10): 3623–3630.
- Driks A., 2007, Surface appendages of bacterial spores, *Mol. Microbiol.*, 63: 623-625.
- Drobniewski F. A., 1993, *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6(4): 324-338
- EFSA, 2005, Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp* in foodstuffs, *The EFSA Journal*, 175: 1-48.
- EFSA, 2011, Technical Guidance on the assessment of the toxigenic potential of *Bacillus* species used in animal nutrition, *The EFSA Journal*, 9(11): 2445-2457.
- Eichenberger P., 2007, Genomics and cellular biology of endospore formation. In *Bacillus, cellular and molecular biology*, pp. 375-409, Edited by P. Graumann. Norfolk, U.K: Caister Academic Press.
- El-Banna A. A., 2009, Bacterial food intoxication: an overview, *Alex. J. Fd. Sci. Technol.*, 6 : 3-43.
- Euzéby J. P., 2002, Dictionnaire de bactériologie vétérinaire, <http://www.bacterio.cict.fr>
- Euzéby J. P., 2010, Systématique bactérienne, <http://www.bacterio.cict.fr>
- Evreux F., Delaporte B., Leret N., Buffet-Janvresse C., Morel A., 2007, Méningite néonatale à *Bacillus cereus*, à propos d'un cas, *Archives de Pédiatrie*, 14: 265-368.
- Fagerlund A., Brillard J., Fürst R., Guinebretière M. H., Granum P. E., 2007, Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group, *BMC Microbiology*, 7:43.
- Fagerlund A., Lindback T., Storset A. K., Granum P. E., Hardy S. P., 2008, *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia, *Microbiology*, 154: 693-704.
- Fagerlund A., Lindback T., Granum P. E. 2010, *Bacillus cereus* cytotoxins Hbl, Nhe and CytK are secreted via the Sec translocation pathway, *BMC Microbiol.*, 10: 304-311.
- Faille C., Membré J. M., Tissier J. P., Bellon-Fontaine M. N., Carpentier B., Laroche M. A., Bénézech T., 2000, Influence of physicochemical properties on the hygienic status of stainless steel with various finishes, *Biofouling*, 15: 261-274.
- Faille C., Fontaine F., Bénézech T., 2001, Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines, *Journal of applied microbiology*, 90: 892-900.
- Faille C., Sylla Y., Le Gentil T., Benezech C., Slomianny Y., 2010, Viability and surface properties of spores subjected to a cleaning-in-place procedure: Consequences on their ability to contaminate surfaces of equipment, *Food Microbiology*, 27: 769-776.
- Faille C., Lequette Y., Ronse A., Slomianny C., Garénaux E., Guérardel Y., 2010a, Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus cereus* spores surrounded or not with an exosporium

- Consequences on their ability to adhere to stainless steel, *Int. J. Food Microbiol.*, 143: 125-135.
- Farkas J., 2007, Physical methods of food preservation. In *Food microbiology fundamentals and frontiers*, pp. 685-712.
- Fasanella A., Galante D., Garofolo G., Jones M. H., 2010, Anthrax undervalued zoonosis, *Veterinary Microbiology*, 140(3-4): 318-331.
- Feijoo S. C., Cotton L. N., Watson C. E., Martin J. H., 1997, Effect of storage temperatures and ingredients on growth of *Bacillus cereus* in coffee creamers, *J. Dairy Sci.*, 80(8): 1546-1553.
- Feinberg L., Jorgensen J., Haselton A., Pitt A., Rudner R., Margulis L., 1999, Arthromitus (*Bacillus cereus*) symbionts in the cockroach *Blaberus giganteus*: dietary influences on bacterial development and population density, *Symbiosis*, 27(2): 109-123.
- Flavelle S., Tyrrell G. J., Forgie S. E., 2007, A 'serious' bloodstream infection in an infant, *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, 18: 311-312.
- Fluit A. C., Maarten R. V., Schmitz F. J., 2001, Molecular Detection of Antimicrobial Resistance, *Clin. Microbiol. Rev.*, 14: 836-871
- Forsyth G., Logan N. A., De Vos P., 1998. Revue taxonomique du genre *Bacillus*, *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 13: 114-129.
- Frankland G. C., Frankland P. F., 1887, Studies of some new micro-organisms obtained from air, *Proceedings of the Royal Society of London*, 42: 150-151
- Fredricks D. N., Myerson D., 2006, Pneumonia in a neutropenic patient with leukemia, *Inf. Dis. Clin. Pract.*, 14: 107-109.
- Fricker M., Reissbrodt R., Ehling-Schulz M., 2008, Evaluation of standard and new chromogenic selective plating media for isolation and identification of *Bacillus cereus*, *International Journal of Food Microbiology*, 121(1): 27-34.
- Fritze D., 2004, Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera : The aerobis endospore-forming bacteria, *The American Phytopathology Society*, 94(11): 1245-1248.
- From C., Pukall R., Schumann P., Hormazabal V., Granum P. E., 2005, Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3): 1178-1183.
- Gaillard S., Leguérinel I., Mafart P., 1998, Modelling combined effect of the temperature and pH on the heat resistance of spores of *Bacillus cereus*, *Food Microbiology*, 15: 625-630.
- Gaillard S., 2003, Modélisation de la thermorésistance, de la viabilité et du comportement à la recroissance de *Bacillus cereus*, en fonction de la température, du pH et de l'activité aqueuse., Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, France.
- Gerhardt P., Ribi E., 1964, Ultrastructure of the exosporium enveloping spores of *Bacillus cereus*, *J. Bacteriol.*, 88: 1774-1789.
- Ghelardi E., Celandroni F., Salvetti S., Barsotti C., Baggiani A., Senesi S., 2002, Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks, *FEMS Microbiology Letters*, 208(1): 129-134.
- Ginsburg A. S., Salazar L. G., True L. D., Disis, M. L., 2003, Fatal *Bacillus cereus* sepsis following

- resolving neutropenic enterocolitis during the treatment of acute leukemia, *Am. J. Hematol.*, 72: 204-208.
- Girisch M., Ries M., Zenker M., Carbon R., Rauch R., Hofbeck M., 2003, Intestinal perforations in a premature infant caused by *Bacillus cereus*, *Infection*, 31: 192-193.
- Gordon R. E., Haynes W. C., Pang, H. N., 1973, The genus *Bacillus*, Agriculture Handbook No. 427, U.S.D.A., Washington D.C.
- Granum P. E., 1994, *Bacillus cereus* and its toxins, *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.*, 23: 61S-66S.
- 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(2): 129-144.
- Granum P. E., Anderson A., Gayther C., Te Giffel M., Larsen H., Lund T., O'Sullivan K., 1996, Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*, *FEMS. Microbiol. Lett.*, 141: 145-149.
- Granum P. E., Lund T., 1997, *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins, *FEMS Microbiology Letters*, 157: 223-228.
- Granum P.E., 2007, *Bacillus cereus*. In: Doyle M., Beuchat L. (Eds), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 3rd Ed., ASM Press, Washington, 445-456.
- Green H., Furuno J., Horneman A., Morris J. G., 2009, Bacterial Foodborne Disease, In Evans A.S., Brachman P.S. (Eds.), *Bacterial Infections of Humans*, Springer, 121-158
- Guillemet E., Cadot C., Tran S. L., Guinebretière M. H., Lereclus D., Ramarao N., 2010, The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence, *J. Bacteriol.*, 192: 286-294.
- Guinebretière M. H., Berge O., Normand P., Morris C., Carlin F., Nguyen-The C., 2001, Identification of bacteria in pasteurized Zucchini purée stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purées, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 4520-4530.
- Guinebretière M. H., Girardin H., Dargaignaratz C., Carlin F., Nguyen-The C., 2003, 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(3): 223-232.
- Guinebretière M. H., Nguyen-The C., 2003, Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43: 207-215
- Guinebretière M. H., Sanchis V., 2003, *Bacillus cereus* sensu lato, *Bulletin de la société Française de Microbiologie*, 18: 95-103.
- 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, *Environmental Microbiology*, 10 : 851-865.
- Guinebretière 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. of Clinical microbial*, 48: 3388-3391.
- Guinebretière M. H., Auger S., Galleron N., Contzen M, De Sarrau B, De Buyser ML, Lamberet

- G, Fagerlund A, Granum PE, Lereclus D, De Vos P, Nguyen-The C, Sorokin A., 2012, *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63: 31-40.
- Guiraud J.P., 2003, *Microbiologie alimentaire*, Ed. Dunod.
- Giraud J.P., Rosec J.P., 2004, *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. Ed. AFNOR.
- Gyssens I. C., Van Den Broek P. J., Kullberg B. J., Hekster Y., Van Der Meer J. W., 1992, Optimizing antimicrobial therapy: A method for antimicrobial drug use evaluation, *J. Antimicrob. Chemother.*, 30(5): 724-727.
- Hafiz Y., Iqbal A., Ahmad M., Ali A., 2012, Antibiogram of *Bacillus cereus* isolated from street vended foods in Srinagar area of Kashmir valley, *Indian Journal of Field Veterinarians*, 8(1): 34-37.
- Hansen B. M., Hendriksen N. B., 2001, Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(1): 185-189.
- Haque A., Russell N. J., 2005, Phenotypic and genotypic characterisation of *Bacillus cereus* isolates from Bangladeshi rice, *International Journal of Food Microbiology*, 98(1): 23-34
- Harmon S. M., Kautter D. A., Lancette G., 1991, Lipid globule staining to aid in differentiating *Bacillus* species, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74 :649-651.
- Haug T. M., Sand S. L., Sand O., Phung D., Granum P. E., Hardy S. P., 2010, Formation of very large inherent pore-forming structure, *J Membr Biol*, 237: 1-11.
- Hauge S., 1955, Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli, *J. appl. Bacteriol.*, 18: 59-51
- Heinrichs J. H., Beecher D. J., Macmillan J. D., Zilinskas B. A., 1993, Molecular cloning and characterization of the gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*, *J. Bacteriol.*, 175: 6760-6766.
- Helgason E., Caugant D. A., Lecadet M. M., Chen Y., Mahillon J., Lovgren A., Hegna I., Kvaloy K., Kolsto A. B., 1998, Genetic diversity of *Bacillus cereus*/*B. thuringiensis* isolates from natural sources, *Curr. Microbiol.* 37: 80-87.
- Helgason E., Okstad O. A., Caugant D. A., Johansen H. A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolsto A. B., 2000, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* - one species on the basis of genetic evidence, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2627-2630.
- Helgason E., Caugant D. A., Olsen I., Kolsto A. B., 2000a, Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections, *J. Clin. Microbiol.*, 38: 1615-1622.
- Helgason E., Tourasse N. J., Meisal R., Caugant D. A., Kolsto A. B., 2004, Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 191-201.
- Henriques A. O., Moran, C. P., 2007, Structure, assembly, and function of the spore surface layers, *Annu. Rev. Microbiol.*, 61: 555-588.
- Hilbert L. R., Bagge-Ravn D., Kold J., Gram L., 2003, Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance, *International journal of biodeterioration and biodegradation*, 52: 175-185.
- Hill K. K., Ticknor L. O., Okinaka R. T., Asay M., Blair H., Bliss K. A., Laker M., Pardington P.

- E., Richardson A. P., Tonks M., Beecher D. J., Kemp J. D., Kolsto A. B., Wong A. C., Keim P., Jackson P. J., 2004, Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2): 1068-1080.
- Hirabayashi K., Shiohara M., Saito S., Tanaka M., Yanagisawa R., Tsuruta G., Fukuyama T., Hidaka Y., Nakazawa Y., Shimizu T., Sakashita K., Koike K., 2010, Polymyxin-direct hemoperfusion for sepsis-induced multiple organ failure, *Pediatr. Blood Cancer*, 55(1): 202-205.
- Hoffmaster A. R., Ravel J., Rasko D. A., Chapman G. D., Chute M. D., Marston C. K., De B.K., Sacchi C. T., Fitzgerald C., Mayer L.W., Maiden M. C., Priest F. G., Barker M., Jiang L., Cer R. Z., Rilstone J., Peterson S. N., Weyant R. S., Galloway D. R., Read T. D., Popovic T., Fraser C. M., 2004, Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 101(22): 8449-8454.
- Holbrook R., Anderson J. M., 1980. An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods, *Canadian Journal of Microbiology*, 26: 753-759.
- Holmes B., Willcox W. R., Lapage S. P., 1978, Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E system, *Journal of Clinical Pathology*, 31: 22-30
- Houry A., Briandet R., Aymerich S., Gohar M., 2010, Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation *Microbiology*, 156: 1009-1018.
- Hsueh Y. H., Somers E. B., Lereclus D., Wong A. C. L., 2006, Biofilm Formation by *Bacillus cereus* is Influenced by PlcR, a Pleiotropic Regulator, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 5089-5092.
- Husmark U., Ronner U., 1992, The influence of hydrophobic, electrostatic and morphologic properties on the adhesion of *Bacillus* spores, *Biofouling*, 5: 335-344.
- Hutchens A., Gupte A., McAuliffe P. F., Schain D., Soldevila-Pico C., Knapik J. A., Fujita S., Mazingo D. W., Richards W. T., 2010, *Bacillus cereus* necrotizing fasciitis in a patient with end-stage liver Disease. *Surg. Infect. (Larchmt)*, 11: 469-474.
- INRA, 1998. Bactéries sporulées et sécurité des aliments. Dossier de l'INRA: Alimentation, sécurité et santé : Une priorité pour l'INRA, <http://www.inra.fr/internet/directions/dic/actualites/dossiers/doc/secualim>
- INVS, 2004, Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France, Rapport de l'Institut National de Veille Sanitaire, http://www.invs.sante.fr/publications/2004/inf_origine_alimentaire
- INVS, 2007, Données relatives aux toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) déclarées en France en 2006 et 2007. Institut National de Veille Sanitaire, 1-8.
- INVS, 2009, Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives : Données de la déclaration obligatoire, Institut National de Veille Sanitaire : Données relatives aux toxi-infections alimentaires collectives en France en 2008.
- Iurlina M. O., Saiz A. I., Fuselli S. R., Fritz R., 2006, Prevalence of *Bacillus spp.* in different food products collected in Argentina, *LWT - Food Science and Technology*, 39: 105-110.
- Ivanova N., Sorokin A., Anderson I., Galleron N., Candelon B., Kapatral V., Bhattacharyya A., Reznik G., Mikhailova N., Lapidus A., Chu L., Mazur M., Goltsman E., Larsen N., D'Souza M., Walunas T., Grechkin Y., Pusch G., Haselkorn R., Fonstein M., Ehrlich S. D., Overbeek R., Kyrpides N., 2003,

- Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*, *Nature*, 423(6935): 87-91.
- Jensen G. B., Hansen B. M., Eilenberg J., Mahillon J., 2003, The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives, *Environ. Microbiol.*, 5(8): 631-640.
- Joffin J. N., Leyral G., 2006, *Microbiologie technique*, Tome 2: Documentation Technique, Collection Biologie Technique. Ed. Doin, CRDP Aquitaine.
- John A. B., Razak E. A., Razak E. E., Al-Naqeeb N., Dhar R., 2007, Intractable *Bacillus cereus* bacteremia in a preterm neonate, *J. Trop. Pediatr.*, 53: 131-132.
- JORADP, 1998, *Journal Officiel de La République Algérienne Démocratique et Populaire*, No. 35 du 27/05/1998
- JORF, 1987, Brochure 1487 du *Journal officiel de la République Française (JORF)- Toxi-infections alimentaires collectives (TIAC)*
- Jung M. Y., Kim J. S., Paek W. K., Lim J., Lee H., Kim P., Ma J. Y., Kim W., Chang Y. H., 2011, *Bacillus manliponensis* sp. nov., a New Member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment, *The Journal of Microbiology*, 49: 1027-1032.
- Katsuya H., Takata T., Ishikawa T., Sasaki H., Ishitsuka K., Takamatsu Y., Tamura K., 2009, A patient with acute myeloid leukemia who developed fatal pneumonia caused by carbapenem-resistant *Bacillus cereus*, *J. Infect. Chemother.*, 15: 39-41.
- Katzin L. I., Sandholzer L. A., Stron M. E., 1943, Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurization, *Journal of Bacteriology*, 45: 256-272.
- Keim P., Kalif A., Schupp J., Hill K., Travis S. E., Richmond K., Adair D. M., Hugh-Jones M., Kuske C. R., Jackson P., 1997, Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers, *J. Bacteriol.*, 179(3): 818-824.
- Kim B. S., Lee C. S., Yun C. Y., Yeo S. M., Park W. M., Kim H. R., 2001, Characterization and immunological analysis of ferritin from the hemolymph of *Galleria mellonella*, *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 129: 501-509.
- Kim J. B., Park J. S., Kim M. S., Hong S. C., Park J. H., Oh D. H., 2012, Genetic diversity of emetic toxin producing *Bacillus cereus* Korean strains, *International Journal of Food Microbiology*, 150(1): 66-72
- King N. J., Whyte R., Hudson J. A., 2007, Presence and significance of *Bacillus cereus* in dehydrated potato products. *J. Food Prot.*, 70: 514-520.
- Kiyomizu K., Yagi T., Yoshida H., Minami R., Tanimura A., Karasuno T., Hiraoka A., 2008, Fulminant septicemia of *Bacillus cereus* resistant to carbapenem in a patient with biphenotypic acute leukemia, *J. Infect. Chemother.*, 14: 361-367.
- Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M., 2000, Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections, *Microbes Infect.*, 2: 189-198.
- Kramer J. M., Gilbert R. J., 1989, *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species, Ch. 2, In *Foodborne Bacterial Pathogens*, M.P.Doyle (Ed.), 21-70. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Kusumaningrum H. D., Riboldi G., Hazeleger W. C., Beumer R. R., 2003, Survival of foodborne

- pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods, *International journal of food microbiology*, 85: 227-236.
- Lapidus A., Goltsman E., Auger S., Galleron N., Ségurens B., Dossat C., Land M. L., Broussolle V., Brillard J., Guinebretière M. H., Sanchis V., Nguen-The C., Lereclus D., Richardson P., Wincker P., Weissenbach J., Ehrlich S. D., Sorokin A., 2008. Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity, *Chem. Biol. Interact.*, 171: 236-49.
- Larpent J. P., 2000, Introduction à la nouvelle classification bactérienne- Les principaux groupes bactériens, Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- Latsios G., Petrogiannopoulos C., Hartzoulakis G., Kondili L., Bethimouti K., Zaharof A., 2003, Liver abscess due to *Bacillus cereus*: a case report, *Clin. Microbiol. Infect.*, 9: 1234-1237.
- Le Scanff J., Mohammedi I., Thiebaut A., Martin O., Argaud L., Robert D., 2006, Necrotizing gastritis due to *Bacillus cereus* in an immunocompromised patient, *Infection*, 34: 98-99.
- Lebessi E., Dellagrammaticas H. D., Antonaki G., Foustoukou M., Lacovidou N., 2009, *Bacillus cereus* meningitis in a term neonate, *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, 22: 458-461.
- Lechner S., Mayr R., Francis K. P., Prub B. M., Kaplan T., Wiebner-Gunkel E., Stewart G. S. A. B., Scherer S., 1998, *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1373-1382.
- Lee S. Y., Chung H. J., Shin J. H., Dougherty R. H., Kangi D. H., 2006, Survival and growth of foodborne pathogens during cooking and storage of oriental-style rice cakes, *J. Food Prot.*, 69: 3037-3042
- Lee M. J., Ha J. H., Kim Y. S., Ryu J. H., Ha S. D., 2010, Reduction of *Bacillus cereus* contamination in biofilms on stainless steel surfaces by application of sanitizers and commercial detergent, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 53: 89-93
- Leguerinel I., Couvert O., Mafart P., 2007, Modelling the influence of the sporulation temperature upon the bacterial spore heat resistance, application to heating process calculation, *Int. J. Food Microbiol.*, 114(1): 100-104.
- Lepper P. M., Grusa E., Reichl H., Hogel J., Trautmann M., 2002, Consumption of imipenem correlates with beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46(9): 2920-2925.
- Lequette Y., Boels G., Clarisse M., Faille C., 2010, Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry, *Biofouling*, 26: 421-431.
- Lequette Y., Garénaux E., Tauveron G., Dumez S., Perchat S., Slomianny C., Lereclus D., Guérardel Y., Faille C., 2011, Role played by exosporium glycoproteins in the surface properties of *Bacillus cereus* spores and in their adhesion to stainless steel, *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 4905-4911.
- Lereclus D., Sorokine A., Faille C., Schmitt P., Nguyen-The C., 2004, *Bacillus cereus*, le bon, la brute et le truand, *Mensuel INRA*, 119: 28-35
- Levin M.R., D'Amico D.J., 1991, Traumatic endophthalmitis. In: Shingleton, B.J., Hersh, P.S., Kenyon, K.R. (Eds.) *Eye trauma*. St. Louis (MO) : Mosby Year Book, 242-252.
- Liaqat I., Saiyed I. A., Nusrat J., 2013, Biofilm formation and sporulation in *Bacillus subtilis*, *International Journal of Microbiology Research and Reviews*, 1: 61-67.

- Lindback T., Fagerlund A., Rodland M. S., Granum P. E., 2004, Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin, *Microbiology*, 150: 3959-3967.
- Liu G., Shen J., 2004, Effects of culture medium and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria, *J. Biosci. Bioeng.*, 98: 251-256.
- Logan N. A., Berkeley R. C. W., 1984, Identification of *Bacillus* strains using the API system, *J. Gen. Microbiol.* 130: 1871-1882.
- Logan N. A., Turnbull P. C. B., 2000, Bactéries aérobies sporulées. In Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. (Eds) : Précis de bactériologie clinique, Editions ESKA, Paris, 965-981
- Logan N. A., Rodriguez-Diaz M., 2006, *Bacillus* spp. and Related Genera. In Gillespie S. H., Hawkey P. M. (Eds.): Principles and Practice of Clinical Bacteriology, 2nd edition, John Wiley and Sons Ltd., 139-158
- Logan N. A., De Vos, P., 2009. Genus I. *Bacillus*. In: De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B.E. (Eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes, Springer.
- Logan N. A., 2012, *Bacillus* and relatives in foodborne illness, *J. Appl. Microbiol.*, 112: 417-429.
- Loysance C., 1999, Détection, identification et écologie des *Bacillus* et des moisissures, agents d'altérations des produits laitiers frais, Thèse de doctorat, Brest: Université de Bretagne Occidentale, France.
- Lozniewski A., Rabaud C., 2010, Résistance bactérienne aux antibiotiques, Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux - Infections associées aux soins, CCLIN Sud-Est, Coordination de la lutte contre les infections nosocomiales et associées aux soins, <http://cclin-sudest.chu-lyon.fr/>
- Luna V. A., King D. S., Gullede J., Cannons A. C., Amuso P. T., Cattani J., 2007, Susceptibility of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycooides* and *Bacillus thuringiensis* to 24 antimicrobials using Sensititre automated microbroth dilution and Etest agar gradient diffusion methods, *J. Antimicrob. Chemother.*, 60(3): 555-67.
- Lund T., Granum P.E., 1997, Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*, *Microbiology*, 143: 3329-3336.
- 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.
- Manickam N., Knorr A., Muldrew K. L., 2008, Neonatal meningoencephalitis caused by *Bacillus cereus*, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 27: 843-846.
- Martinez M. F., Haines T., Waller M., Tingey D., Gomez W., 2007, Probable occupational endophthalmitis from *Bacillus cereus*, *Arch. Environ. Occup. Health*, 62: 157-160.
- Meer R. R., Baker J., Bodyfelt F. W., Griffiths M. W., 1991, Psychotropic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review, *Journal of Food Protection*, 54: 969-979.
- Meldrum R. J., Little C. L., Sagoo S., Mithani V., McLauchlin J., De Pinna E., 2009, Assessment of the microbiological safety of salad vegetables and sauces from kebab take-away restaurants in the United Kingdom, *Food Microbiol.*, 26: 573-577
- Moulder E. H., Sharma H. K., Howell F. R., 2008, Traumatic osteomyelitis of the femur treated with

- distraction osteogenesis without surgical bone resection: a case report, *J. Trauma*, 65: E39-E42.
- Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Landry M. L., Pfaller M. A., 2007, *Manual of Clinical Microbiology*, 9th edition, American Society of Microbiology Press.
- Nakamura L. K., 1994, DNA relatedness among *Bacillus thuringiensis* serovars, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 125-129.
- Nakamura L. K., 1998, *Bacillus pseudomycooides* sp. nov, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1031-1035.
- Naranjo M., Denayer S., Botteldoorn N., Delbrassinne L., Veys J. L., Waegenaere J., Sirtaine N., Driesen, R. B., Sipido K. R., Mahillon J., Dierick K., 2011, Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning, *Journal of Clinical Microbiology*, 49: 4379-4381.
- Nauta M. J., Litman S., Barker G. C., Carlin F., 2003, A retail and consumer phase model for exposure assesment of *Bacillus cereus*, *Int. J. Food Microbiol.*, 83(2): 205-218.
- NF EN ISO 7932 (V 08-023), Juillet 2005, Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présomptifs. Technique par comptage des colonies à 30 °C.
- Nguyen Thi Minh H., 2009, Compréhension des mécanismes de résistance des spores bactériennes à la chaleur et à la pression, Thèse de doctorat, Dijon, Université de Bourgogne, France.
- Nguyen Thi Minh H., Durand A., Loison P., Perrier-Cornet J. M., Gervais P., 2011, Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90: 1409-1417.
- Nguyen-The C., Carlin F., Guinebretière M. H., 2003, *Bacillus cereus* et sécurité des aliments. Bulletin de la société française de microbiologie, 18 : 104-112.
- Nicholson W. L., Munakata N., Horneck G., Melosh H. J., Setlow P., 2000, Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 548-572.
- Nicolas G. G., Lavoie M. C., 2011, *Streptococcus mutans* et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire, *Rev. Can. Microbiol*, 57(1) :1-20.
- Nishikawa T., Okamoto Y., Tanabe T., Kodama Y., Shinkoda Y., Kawano Y., 2009, Critical illness polyneuropathy after *Bacillus cereus* sepsis in acute lymphoblastic leukemia, *Intern. Med.*, 48: 1175-1177.
- Oh M. H., Ham J. S., Cox J. M., 2012, Diversity and toxigenicity among members of the *B. cereus* group, *Int. J. Food Microbiol.*, 152: 1-8.
- Oliveira R., Azeredo J., Teixeira P., Fonseca A. P., 2001, The role of hydrophobicity in bacterial adhesion, In: Gilbert P., Allison D., Brading M., Verran J., Walker J. (Eds), *Biofilm community interactions: chance or necessity? Contributions made at the Meeting of the Biofilm Club*, 5, Powys, UK, 2001". Cardiff : BioLine. 11-22.
- Oomes S. J. C. M., Van Zuijlen A., Hehenkamp J. O., Witsenboer H., Van der Vossen J., Brul S., 2007, The characterisation of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products, *International Journal of Food Microbiology*, 120: 85-94.
- Ostensvik O., From C., Heidenreich B., O'Sullivan K., Granum P. E., 2004, Cytotoxic *Bacillus* spp. belonging to the *B-cereus* and *B-subtilis* groups in Norwegian surface waters, *Journal of Applied*

- Microbiology, 96: 987-993.
- Pace L. J., Park Rupp E., Roger G., 2006, Biofilms, infection and antimicrobial therapy “ , CRC Press Taylor and Francis Group.
- Pavic S., Brett M., Petric I., Lastre D., Smoljanovic M., Atkinson M., Kovacic A., Cetinic E., Ropac D., 2005, An outbreak of food poisoning in a kindergarten caused by milk powder containing toxigenic *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*, Lebensmittelhygiene, 56: 20-22.
- Peng J. S., Tsai W. C., Chou C. C., 2001, Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel, Int. J. Microbiol., 65(1-2): 105-111.
- Pérez-Rodríguez F., Valero A., Carrasco E., Garcia R. M., Zurera G., 2008, Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review, Trends in Food Science & Technology, 19: 131-144
- Pirhonen T. I., Andersson M. A., Jaaskelainen E. L., Salkinoja-Salonen M. S., Honkanen-Buzalski T., Johansson T. M. L., 2005, Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food-poisoning case, Food Microbiol., 22: 87-91.
- Posfay-Barbe K. M., Schrenzel J., Frey J., Studer R., Korff C., Belli D. C., Parvex P., Rimensberger P. C., Schächli M. G., 2008, Food poisoning as a cause of acute liver failure, Pediatr. Infect. Dis. J., 27(9): 846-847.
- Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A., 2007, Microbiologie, de Boeck, 3^{ème} édition française.
- Prevost S., Andre S., Remize F., 2010, PCR Detection of thermophilic spore-forming bacteria involved in canned food spoilage, Current Microbiology, 61(6): 525-533.
- Priest F. G., Barker M., Baillie L. W., Holmes E. C., Maiden M. C., 2004, Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group, J. Bacteriol., 186: 7959-7970
- Qiu W., 2004, Lecture schedule of Microbiology in the Hunter College of the city University of New York, <http://diverge.hunter.cuny.edu/~weigang/>
- Radnedge L., Agron P. G., Hill K. K., Jackson P. J., Ticknor L. O., Keim P., Andersen G. L., 2003, Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*, Appl. Environ. Microbiol., 69: 2755-2764.
- Rahmati T., Labbé R., 2008, Levels and toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from retail seafood, J. Food Prot., 71: 1178-1185.
- Rajkovic A., Uyttendaele M., Vermeulen A., Andjelkovic M., Fitz-James I., In't Veld P., Denon Q., Verhe R., Debevere J., 2008, Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide, Lett. Appl. Microbiol., 42: 103-105.
- Raju D., Waters M., Setlow P., Sarker M. R., 2006, Investigating the role of small, acid-soluble spore proteins (SASPs) in the resistance of *Clostridium perfringens* spores to heat, BMC Microbiol., 6: 50-63.
- Raju D., Setlow P., Sarker M. R., 2007, Antisense-RNA-mediated decreased synthesis of small, acid-soluble spore proteins leads to decreased resistance of *Clostridium perfringens* spores to moist heat and UV radiation, Appl. Environ. Microbiol., 73: 2048-2053.
- Rangasamy P. N.; Iyer M.; Roginski H., 1993, Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* in milk and dairy products manufactured in Victoria, Aust. J. Dairy Technol., 48: 93-95.

- Ranieri M. L., Boor K. J., 2009, Bacterial ecology of high-temperature, short-time pasteurized milk processed in the United States, *Journal of Dairy Science*, 92(10): 4833-4840.
- Rasko D. A., Altherr M. R., Han C. S., Ravel J., 2005, Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms, *FEMS Microbiol. Rev.*, 29(2): 303-329
- Rasko D. A., Rosovitz M. J., Okstad O. A., Fouts D. E., Jiang L., Cer R. Z., Kolsto A. B., Gill S. R., Ravel J., 2007, Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1, *J. Bacteriol.*, 189: 52-64.
- Ray C. G., 2004, Enteric infections and food poisoning, In Ryan K. J., Ray C. G. (Eds.), *Sherris Medical Microbiology*, 4th edition, USA : Mcgraw Hill, 857-865.
- Recherche, 1998, Dossier Antibiotiques : la résistance des bactéries, *La Recherche*, No. 314.
- Reyes J. E., Bastias J. M., Gutiérrez M. R., Rodríguez M., 2007, Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program, *Food Microbiology*, 24: 1-6.
- Reyes-Ramirez A., Ibarra J. E., 2005, Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR analysis, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1346-1355.
- Rhodehamel E. J., Stanley M. H., 1998, *Bacillus cereus*, *USFDA Bacteriological analytical manual online*, 8th edition.
- Ribeiro N. F., Heath C. H., Kierath J., Rea S., Duncan-Smith M., Wood F. M., 2010, Burn wounds infected by contaminated water: Case reports, review of the literature and recommendations for treatment, *Burns*, 36: 9-22.
- Ronimus R. S., Parker L. E., Turner N., Poudel S., Røckert A., Morgan H. W., 2003, A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders, *International Journal of Food Microbiology*, 85: 45-61.
- Ronner U., Husmark U., Henriksson A., 1990, Adhesion of *Bacillus* species in relation to hydrophobicity, *J. Appl. Bacteriol.*, 69: 550-556.
- Rosovitz M. J., Voskuil M. I., Chambliss G. H., 1998, *Bacillus*. In Collier L., Balows A., Sussman M., Balows A., Duerden B. I. (Eds.), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infection : Systematic Bacteriology* 9th edition, USA : Arnold, 709-729.
- Roux A., Ghigo J. M., 2006, Les biofilms bactériens, *Bull. Acad. Vét. France*, 159(3): 261-268.
- Rusul G., Yaacob N. H., 1995, Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA, *International Journal of Food Microbiology*, 25(2): 131-139.
- Ryan P. A., Macmillan J. D., Zilinskas B. A., 1997, Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*, *Journal of Bacteriology*, 179(8): 2551-2556.
- Ryu J. H., Beuchat L. R., 2005, Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 247-54.
- Sada A., Misago N., Okawa T., Narisawa Y., Ide S., Nagata M., Mitsumizo S., 2009, Necrotizing fasciitis

- and myonecrosis "synergistic necrotizing cellulitis" caused by *Bacillus cereus*, *J. Dermatol.*, 36: 423-426.
- Salustiano V. C., Andrade N. J., Ribeiro Junior J. I., Fernandes P. E., Lopes J.P., Bernardes P.C., Portugal J.G., 2010, Controlling *Bacillus cereus* adherence to stainless steel with different cleaning and sanitizing procedures used in dairy plants, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 62(6): 1478-1483.
- Samapundo S., Heyndrickx M., Xhaferi R., Devlieghere F., 2011, Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium, *International Journal of Food Microbiology*, 150: 34-41.
- Sanger F., Nicklens S., Coulson A. R., 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74(12): 5463-5467.
- Sauer K., 2003, The genomics and proteomics of biofilm formation, *Genome Biology*, 4(6): 219-236
- Schmidt T. R., Scott E. J., Dyer D.W., 2011, Whole-genome phylogenies of the family *Bacillaceae* and expansion of the sigma factor gene family in the *Bacillus cereus* species-group, *BMC Genomics*, 12: 430-445
- Schoeni J. L., Wong A. C., 2005, *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins, *J. Food Prot.*, 68: 636-648.
- Scott S. A., Brooks J. D., Rakonjac J., Walker K. M. R., Flint S. H., 2007, The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder, *International Journal of Dairy Technology*, 60: 109-117.
- Senesi S., Celandroni F., Salvetti S., Beecher D. J., Wong A. C. L., Ghelardi E., 2002, Swarming motility in *Bacillus cereus* and characterization of a *fliY* mutant impaired in swarm cell differentiation, *Microbiology*, 148: 1785-1794.
- Senesi S., Salvetti S., Celandroni F., Ghelardi E., 2010, Features of *Bacillus cereus* swarm cells, *Research in Microbiology*, 161: 743-749.
- Setlow P., 2007, I will survive: DNA protection in bacterial spores, *Trends in Microbiology*, 15: 172-180.
- Setlow P., Johnson E. A., 2007, Spores and their significance. In Doyle M. P., Beuchat L. R., T. J. Montville (Eds), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, Washington D.C.: ASM Press, 30-68.
- SFM, 2010, Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, Recommandations 2010, Edition de Janvier 2010, <http://www.sfm.asso.fr/>
- Shaheen R., Svensson B., Andersson M. A., Christiansson A., Salkinjova-Salonen M., 2009, Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks, *Food Microbiology*, 27(3): 347-355.
- Shimoni Z., Mamet Y., Niven M., Mandelbaum S., Valinsky L., Fromm P., 2008, *Bacillus cereus* peritonitis after Cesarean section, *Surg. Infect. (Larchmt)*, 9: 105-106.
- Shiota M., Saitou K., Mizumoto H., Matsusaka M., Agata N., Nakayama M., Kage M., Tatsumi S., Okamoto A., Yamaguchi S., Ohta M., Hata D., 2010, Rapid detoxification of cereulide in *Bacillus cereus* food poisoning, *Pediatrics*, 125: 951-955.
- Simmonds P., Mossel B. L., Intaraphan T., Deeth H. C., 2003, Heat resistance of *Bacillus* spores when

- adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity, *Journal of food protection*, 66: 2070-2075
- Simoes M., Simoes L. C., Machado I., Pereira M. O., Vieira M. J., 2006, Control of flow-generated biofilms using surfactants - evidence of resistance and recovery, *Food and Bioproducts Processing*, 84: 338-345.
- Simoes M., Vieira M.J., 2009, Persister cells in *Pseudomonas fluorescens* biofilms treated with a biocide, In Proceedings of the international conference processes in biofilms: Fundamentals to applications, Davis, CA, USA, 58-62.
- Simoes M., Simoes L.C., Vieira M. J., 2010, A review of current and emergent biofilm control strategies, *LWT-Food Science and Technology*, 43: 573-583.
- Simoes L. C., Lemos M., Araújo P., Pereira A. M., Simoes M., 2011, The effects of glutaraldehyde on the control of single and dual biofilms of *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*, *Biofouling*, 27: 337-46.
- Smelt J. P. P. M., Bos A. P., Kort R., Brul S., 2008, Modelling the effect of sub(lethal) heat treatment of *Bacillus subtilis* spores on germination rate and outgrowth to exponentially growing vegetative cells, *International Journal of Food Microbiology*, 128: 34-40.
- Smith N. R., Gordon R. E., Clark F. E., 1946, Aerobic mesophilic spore forming bacteria, United States Miscellaneous Publication n°559, Department of Agriculture Washington, DC, USA.
- Somers E. B., Wong A. C., 2004, Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat-meat residue, *Journal of Food Protection*, 67: 2218-2229.
- Sorokin A., Candelon B., Guilloux K., Galleron N., Wackerow-Kouzova N., Ehrlich S. D., Bourguet D., Sanchis V., 2006, Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 1569-1578.
- Sousa C., Botelho C., Oliveira R., 2011, Nanotechnology applied to medical biofilms control, In Mendez-Vilas (Ed.), *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, Formatex Research Center, 878-888.
- Spira W. M., Goepfert J. M., 1975, Biological characteristics of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*, *Can. J. Microbiol.*, 21(8): 1236-1246.
- Srey S., Jahid I. K., Ha S. D., 2013, Biofilm formation in food industries: A food safety concern, *Food control*, 31: 572-585.
- Stenfors L. P., Granum P. E., 2001, Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*, *Fems Microbiology Letters*, 197(2): 223-228.
- Stenfors Arnesen L. P., Fagerlund A., Granum P. E., 2008, From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins, *Fems Microbiology Reviews*, 32(4): 579-606.
- Tauveron G., Slomianny C., Henry C., Faille C., 2006, Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment, *Int. J. Food Microbiol.*, 110: 254-262.
- Taylor J. M., Sutherland A. D., Aidoo K. E., Logan N. A., 2005, Heat-stable toxin production by strains

- of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*, FEMS Microbiol. Lett., 242(2): 313-317.
- Te Giffel M. C., Beumer R. R., Slaghuis B. A., Rombouts F. M., 1995, Occurrence and characterization of (psychrotrophic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands, Neth. Milk Dairy J., 49: 125-138
- Te Giffel M. C., Beumer R. R., Leijendekkers S., Rombouts F. M., 1996a, Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands, Food Microbiology, 13: 53-58.
- Te Giffel M. C., Beumer R.R., Bonestroo M. H., Rombouts F. M., 1996b, Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in two dairy processing plants, Neth. Milk Dairy J., 50: 479-492.
- Te Giffel M. C., Beumer R. R., Granum P. E., Rombouts F. M., 1997, Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherlands, International Journal of Food Microbiology, 34(3): 307-318
- Te Giffel M. C., 2001, Spore-formers in foods and the food processing chain, Med Fac Landbouww Univ Gent, 66(3b): 517-522.
- Tena D., Martínez-Torres J. A., Perez-Pomata M. T., Saez-Nieto J. A., Rubio V., Bisquert J., 2007, Cutaneous Infection Due to *Bacillus pumilus*: Report of 3 Cases, Clinical Infectious Diseases, 44(4): 40-42.
- Tétart T., Torny D., 2009, Ça tue parfois mais ce n'est pas dangereux : Injonction Institutionnelle et mobilisation scientifique autour d'un pathogène émergent, *Bacillus cereus*, Revue d'anthropologie des connaissances, 3(1): 73-102.
- 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, Applied and Environmental Microbiology, 72(7): 5118-5121.
- Thorsen L., Budde B. B., Henrichsen L., Martinussen T., Jakobsen M., 2009, Cereulide formation by *Bacillus weihenstephanensis* and mesophilic emetic *Bacillus cereus* at temperature abuse depends on pre-incubation conditions, International Journal of Food Microbiology, 134: 133-139.
- Thorsen L., Azokpota P., Hansen B. M., Hounhouigan D. J., Jakobsen M., 2010, Identification, genetic diversity and cereulide producing ability of *Bacillus cereus* group strains isolated from Beninese traditional fermented food condiments, Int. J. Food Microbiol., 142: 247-250.
- Ticknor L. O., Kolsto A. B., Hill K. K., Keim P., Laker M. T., Tonks M., Jackson P. J., 2001, Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates, Appl. Environ. Microbiol., 67: 4863-4873.
- Tobita H., Hayano E., 2007, A fulminant case of endogenous endophthalmitis caused by grampositive *Bacillus*, Jpn. J. Clin. Ophthalmol., 61: 985-989.
- Todar K., 2008, *Bacillus* and related endospore-forming bacteria. Chapter: The genus *Bacillus*, Todar's on line textbook of bacteriology, textbookofbacteriology.net/Bacillus_5.html
- Tossa P., Villeroy F., Schaefer J. L., Manel J., 2009, Intoxication alimentaire par *Bacillus cereus*: à propos d'un cas d'hépatite fulminante suite à l'ingestion d'un plat de pâtes, 47^{ème} congrès de Société de Toxicologie Clinique, STC, Toulouse, France.
- Tourasse N. J., Helgason E., Okstad O. A., Hegna I. K., Kolsto A. B., 2006, The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics, J. Appl. Microbiol., 101: 579-593.

- Tourasse N. J., Helgason E., Klevan A., Sylvestre P., Moya M., Haustant M., Okstad O. A., Fouet A., Mock M., Kolsto A. B., 2011, Extended and global phylogenetic view of the *Bacillus cereus* group population by combination of MLST, AFLP, and MLEE genotyping data, *Food Microbiology*, 28: 236-244.
- TSCA, 1997, *Bacillus subtilis* final risk assessment, Biotechnology Program under the Toxic Substances Control Act (TSCA), http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm
- Tsigarida E., Hugas M., Robinson T., 2009, The EFSA scientific panel on biological hazards first mandate: may 2003-may 2006. Insight into scientific advice on food hygiene and microbiology, *Trends in Food Science & Technology*, 20: 587-594.
- Turnbull P. C. B., Kramer J. M., Jorgensen K., Gilbert R. J., Melling J., 1979, Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 32: 219-228.
- USFDA, 2005, U.S. Food and Drugs Administration - Motility medium (for *Bacillus cereus*). USFDA. Bacteriological Analytical Manual Online. 8th edition.
- Vahey J. B., Flynn H. W., 1991, Results in the management of *Bacillus endophthalmitis*, *Ophthalmic Surg.*, 22: 681-686.
- Van der Auwera G., Timmerly A. T. S., Hoton F., Mahillon J., 2007, Plasmid Exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs, *Int. J. Food Microbiol.*, 113(2): 164-172.
- Van Houdt R., Michiels C. W., 2010, Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface, *Appl. Microbiol.*, 109: 1117-1131.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., Swings J., 1996, Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic, *Microbiol. Rev.*, 60: 407-438.
- Verstraeten N., Braeken K., Debkumari B., Fauvart M., Fransaer J., 2008, Vermant J., Living on a surface: swarming and biofilm formation, *Trends in Microbiology*, 16: 496-506.
- Vilain S., Luo Y., Hildreth M. B., Brozel V. S., 2006, Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil, *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 4970-4977.
- Vilas-Boas G., Sanchis V., Lereclus D., Lemos M. V., Bourguet D., 2002, Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 1414-1424.
- Vlkova H., Babak V., Seydlova R., Pavlik I., Schlegelova J., 2008, Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and effectiveness on biofilms - a review. *Czech J. Food Sci.*, 26(5): 309-323.
- Weiss K., De Azavedo J., Restieri C., Quach C., Laverdiere M., Rubin E., Gourdeau M., Low D. E., 2001, In vitro activity of a novel ketolide, ABT-773 against invasive strains of *Streptococcus pneumoniae*, *J Antimicrob Chemother*, 48(3): 407-409.
- Wijman J. G. E., De Leeuw P. P. L. A., Moezelaar R., Zwietering M. H., Abee T., 2007, Air-Liquid Interface Biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation, and Dispersion, *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1481-1488.

- Wijnands L. M., Dufrenne J. B., Van Leusden F. M., 2002, Characterization of *Bacillus cereus*, RIVM report 250912002, National Institute for Public Health and the Environment, RIVM, Netherlands.
- Zheng X., Kodama T., Ohashi Y., 2008, Eyeball luxation in *Bacillus cereus*-induced panophthalmitis following a double-penetrating ocular injury, Jpn. J. Ophthalmol., 52: 419-421.

ANNEXE 1

BASE DE DONNEES DE LA GALERIE API 20E POUR LES BACILLUS

Espèce	ANAEROBIOSE	ONPG	ADH	LDC	ODC	CITRATE	SIMMONS	H2S	URE	TDA	INDOLE	VP	GELATINASE	GLUCOSE	MANNITOL	INOSITOL	SORBITOL	RHAMNOSE	SACCHAROSE	MELIBIOSE	AMYGDALINE	ARABINOSE	OXYDASE	NITRITES	MOBILITE	LECITHINASE	
<i>B. alvei</i>	100	80	0	0	0	0	0	75	0	0	50	99	99	99	1	50	1	1	1	50	50	1	0	25	90	0	0
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0	85	0	0	0	75	0	0	0	0	50	99	99	99	99	50	99	1	99	50	99	50	0	95	90	0	0
<i>B. anthracis</i>	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	90	99	1	1	1	1	1	99	50	1	1	0	99	0	0	90
<i>B. brevis</i>	0	25	5	0	0	70	7	3	0	0	57	40	1	1	1	1	1	1	99	50	1	1	0	50	90	0	0
<i>B. carotarum</i>	?	1	1	1	1	50	1	1	1	1	99	50	99	50	50	1	1	1	50	50	1	50	0	99	50	0	0
<i>B. cereus</i>	100	0	85	0	1	80	1	50	0	0	60	99	99	1	1	1	1	1	50	50	1	1	0	78	90	90	90
<i>B. cereus (émétique)</i>	100	0	2	0	1	99	14	0	0	0	99	99	99	1	1	1	1	1	99	50	1	1	0	85	90	90	90
<i>B. circulans</i>	50	80	2	0	0	30	4	4	0	4	30	16	99	99	50	1	50	99	50	99	99	0	16	90	0	0	0
<i>B. coagulans</i>	100	99	0	0	0	0	0	0	0	0	99	50	99	99	50	50	50	50	99	50	50	0	50	90	0	0	0
<i>B. firmus</i>	0	21	7	0	0	99	0	0	0	0	71	99	99	99	1	1	1	1	99	50	1	1	0	50	90	0	0
<i>B. laterosporus (2)</i>	100	0	0	0	0	75	0	0	0	50	50	99	99	99	1	1	1	1	1	50	50	1	0	75	90	0	0
<i>B. lentus</i>	0	98	2	0	0	60	1	50	0	0	30	30	99	99	1	50	50	99	50	50	1	0	0	90	0	0	0
<i>B. licheniformis</i>	100	99	93	0	0	77	0	3	0	0	80	99	99	99	50	99	99	99	50	99	99	0	87	90	0	0	0
<i>B. macerans</i>	100	99	26	0	0	30	0	0	0	0	73	50	99	99	50	50	99	99	50	99	99	0	36	90	0	0	0
<i>B. megatherium (2)</i>	0	83	0	0	5	77	0	0	0	0	88	77	99	99	99	50	1	99	50	99	99	0	77	90	0	0	0
<i>B. mycoides</i>	?	43	56	6	0	93	0	18	0	0	99	99	99	1	1	1	1	1	50	50	1	0	50	1	0	0	0
<i>B. pantothenicus</i>	100	25	0	0	0	20	0	10	0	0	0	50	99	99	50	50	99	99	50	99	1	0	20	90	0	0	0
<i>B. pasteurii</i>	0	1	1	1	1	1	1	99	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	99	90	0	0	0
<i>B. polymyxa</i>	100	99	0	0	0	52	0	0	0	0	99	95	99	99	1	1	50	99	50	99	99	0	71	90	0	0	0
<i>B. pumilus</i>	0	99	4	0	0	86	0	0	0	0	99	95	99	99	50	1	1	99	50	99	99	0	25	90	0	0	0
<i>B. sphaericus</i>	0	1	0	0	0	60	0	25	0	0	43	37	1	1	1	1	1	1	1	50	1	1	0	10	90	0	0
<i>B. stearothermophilus 1</i>	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	12	93	99	99	50	50	50	1	99	50	1	0	50	90	0	0	0
<i>B. stearothermophilus 2</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	12	93	99	99	50	99	1	99	50	99	50	0	50	90	0	0	0
<i>B. stearothermophilus 3</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	12	93	99	1	1	1	1	1	99	50	1	0	1	90	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	0	95	5	0	0	89	0	5	0	0	99	95	99	99	99	99	1	99	50	99	99	0	94	90	0	0	0
<i>B. thiaminolyticus</i>	100	99	1	1	1	99	99	99	1	99	50	99	99	1	99	1	1	1	99	50	99	1	0	50	90	0	0
<i>B. thuringiensis (1)</i>	100	1	99	0	0	99	0	0	0	0	99	99	99	1	1	1	1	1	50	50	1	0	99	90	0	0	90

ANNEXE 2

BASE DE DONNEES DE LA GALERIE API 50CHB

API 50 CHB V4.0	GLY : 1	ERY : 2	DARA : 3	LARA : 4	RIB : 5	DXYL : 6	LXYL : 7	ADO : 8	MDX : 9	GAL : 10	GLU : 11	FRU : 12	MNE : 13	SBE : 14	RHA : 15	DUL : 16	INO : 17	MAN : 18	SOR : 19	MDM : 20	MDG : 21	NAG : 22	AMY : 23	ARB : 24	ESC : 25
<i>Aneurinibacillus aneurinolyticus</i>	50	0	0	9	33	9	0	0	0	33	33	33	9	0	0	0	0	9	0	9	0	9	9	9	9
<i>Bacillus anthracis</i>	49	1	0	1	99	1	0	0	0	0	100	79	2	0	0	0	1	0	1	0	0	99	0	79	97
<i>Bacillus cereus 1</i>	74	0	1	1	99	1	0	0	1	8	100	99	26	0	1	0	1	1	1	1	1	3	97	30	99
<i>Bacillus cereus 2</i>	11	1	0	0	77	1	0	0	0	3	100	99	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	43
<i>Bacillus circulans</i>	48	0	18	96	80	98	1	1	68	94	100	97	97	1	45	1	20	89	20	32	64	84	99	96	100
<i>Bacillus coagulans</i>	71	0	4	47	66	52	0	1	1	98	100	100	98	1	42	1	9	28	38	4	66	100	71	76	83
<i>Bacillus firmus</i>	41	0	0	4	20	7	0	0	0	1	88	50	11	0	0	0	1	66	2	0	2	63	1	4	55
<i>Bacillus lentus</i>	40	0	1	50	55	10	0	0	10	55	95	95	95	0	40	17	1	80	17	1	35	82	65	82	98
<i>Bacillus licheniformis</i>	90	1	1	99	97	87	1	1	1	75	100	100	99	8	32	1	69	99	92	1	99	62	99	99	100
<i>Bacillus megaterium</i>	80	1	1	87	86	76	1	1	1	82	100	99	28	1	8	1	55	97	39	3	30	87	73	80	97
<i>Bacillus mycoides</i>	20	0	0	1	98	1	0	0	0	28	100	99	4	0	0	0	1	4	1	0	1	99	12	80	77
<i>Bacillus pumilus</i>	72	1	1	88	97	65	0	0	0	49	99	100	99	1	14	1	11	99	2	37	27	64	62	98	100
<i>Bacillus smithii</i>	89	0	0	36	97	97	0	0	0	36	100	100	75	0	45	0	2	100	2	0	89	0	0	2	24
<i>B. subtilis / B.amyloliquefaciens</i>	77	0	0	84	91	56	0	0	0	12	95	98	87	1	1	1	65	95	86	0	83	29	70	80	100
<i>Bacillus non reactive</i>	1	1	0	1	1	2	0	1	1	2	6	10	2	1	1	0	2	9	1	1	1	24	1	1	19
<i>Breivibacillus agri</i>	21	0	0	0	0	0	0	0	0	42	42	0	0	0	0	0	21	94	0	0	0	0	0	0	5
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	72	0	0	1	61	20	0	0	0	98	98	66	0	1	0	1	61	5	0	1	98	38	88	94	
<i>Brevibacillus non réactive</i>	13	0	0	1	8	2	0	0	1	0	23	19	1	0	1	1	3	22	1	0	1	6	1	2	37
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	45	0	0	4	17	1	0	0	0	25	100	98	98	1	0	1	1	10	4	0	50	4	1	4	30
<i>Geobacillus thermoglucosidiasus</i>	36	0	0	47	68	73	0	0	0	31	100	95	95	0	63	0	4	63	26	0	63	73	31	31	89
<i>Paenibacillus alvei</i>	100	0	0	0	100	0	0	96	0	28	87	3	28	0	0	0	40	0	0	0	50	96	71	87	100
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	26	0	0	84	84	100	0	0	93	100	100	100	100	0	53	0	1	99	0	46	100	93	100	100	100
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	61	0	38	100	100	99	11	0	72	88	88	100	88	0	29	11	14	94	11	20	94	100	100	100	100
<i>Paenibacillus lautus</i>	73	0	46	100	93	100	0	26	66	100	100	100	99	0	0	6	6	99	6	6	98	100	100	100	100
<i>Paenibacillus macerans</i>	77	0	51	99	82	99	1	1	82	100	100	100	99	0	58	0	11	93	22	22	77	40	97	99	100
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	83	0	2	93	100	97	0	0	83	97	100	99	97	0	2	0	1	99	0	6	71	46	100	100	100
<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	94	0	0	0	87	0	0	22	0	100	100	94	94	0	0	0	58	0	0	35	70	70	87	98	98
<i>Paenibacillus validus</i>	93	0	0	6	100	93	0	0	6	100	100	100	43	0	0	85	100	100	6	0	100	0	0	0	100
<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	55	0	44	0	88	0	0	0	0	98	100	100	98	0	79	0	20	0	50	1	100	100	88	100	100

API 50 CHB V4.0		SAL : 26	CEL : 27	MAL : 28	LAC :29	MEL :30	SAC : 31	TRE : 32	INU : 33	MLZ :34	RAF :35	AMD :36	GLYG : 37	XLT :38	GEN : 39	TUR : 40	LYX : 41	TAG : 42	DFUC : 43	LFUC : 44	DARL : 45	LARL : 46	GNT : 47	2KG : 48	5KG : 49	
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	9	9	9	33	9	33	9	9	0	0	9	0	0	0	9	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Bacillus anthracis</i>	33	71	99	1	1	99	99	99	1	1	1	51	84	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	14	0	2
<i>Bacillus cereus 1</i>	88	88	100	3	1	55	99	99	1	1	2	83	77	1	3	2	1	0	0	1	0	1	47	0	1	
<i>Bacillus cereus 2</i>	24	2	100	10	0	74	97	0	0	0	0	65	63	0	0	1	0	0	0	1	0	0	20	0	0	
<i>Bacillus circulans</i>	99	99	99	92	92	99	99	99	52	50	96	99	92	26	98	85	1	1	1	21	21	10	61	11	8	
<i>Bacillus coagulans</i>	76	76	100	66	100	95	98	1	1	61	95	23	0	61	61	0	0	0	1	57	0	61	4	0	0	
<i>Bacillus firmus</i>	1	11	92	1	1	77	58	1	0	1	48	3	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	7	0	0	
<i>Bacillus lentus</i>	75	75	98	82	55	82	82	25	30	75	75	55	0	50	40	0	10	0	0	4	0	4	1	0	0	
<i>Bacillus licheniformis</i>	99	99	100	44	26	99	99	99	50	1	44	99	87	1	60	75	1	91	1	1	1	1	39	0	0	
<i>Bacillus megaterium</i>	84	83	99	76	90	98	99	99	60	49	89	94	95	11	81	73	0	1	0	1	11	0	4	0	1	
<i>Bacillus mycolides</i>	80	31	98	20	1	57	98	1	1	1	99	99	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	12	0	0	
<i>Bacillus pumilus</i>	99	99	35	14	15	99	99	1	0	15	1	1	1	1	67	31	3	90	1	1	0	0	1	1	0	
<i>Bacillus smithii</i>	10	24	100	0	10	54	100	0	0	0	0	0	0	0	54	0	0	0	0	0	24	0	10	0	0	
<i>B. subtilis / B.amyloliquefaciens</i>	86	97	98	23	48	90	88	58	0	62	78	79	1	52	50	0	0	1	1	1	1	0	7	0	0	
<i>Bacillus non reactive</i>	1	1	5	2	1	6	5	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	
<i>Breibacillus agri</i>	0	0	0	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	79	66	88	0	0	5	98	0	0	0	5	11	0	12	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
<i>Brevibacillus non réactive</i>	2	5	6	1	0	5	8	1	0	2	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	25	17	100	10	55	95	75	0	75	55	95	82	0	4	50	1	4	0	0	0	0	0	0	0	1	
<i>Geobacillus thermoglucosidasus</i>	42	63	100	0	10	73	100	0	1	10	52	0	0	31	73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Paenibacillus alvei</i>	87	50	100	0	50	40	28	0	0	40	50	28	0	40	28	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	100	100	100	100	100	100	100	6	53	100	100	100	0	100	100	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	100	100	100	100	100	100	100	55	75	100	99	99	5	100	100	0	0	0	27	0	0	27	0	1	1	
<i>Paenibacillus lautus</i>	100	100	100	100	100	100	98	33	53	100	99	93	6	100	97	0	6	0	40	0	0	53	0	0	0	
<i>Paenibacillus macerans</i>	97	99	100	100	100	100	100	88	62	99	99	99	5	97	93	1	0	0	37	51	0	74	1	3	0	
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	100	99	100	97	100	100	100	69	22	99	99	93	0	97	99	0	0	0	2	0	0	35	0	1	0	
<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	98	87	100	94	70	94	87	0	77	70	87	70	0	87	94	0	0	0	47	0	0	58	0	0	0	
<i>Paenibacillus validus</i>	0	25	100	6	25	100	100	50	0	43	68	68	6	6	100	0	25	0	0	6	0	6	0	0	0	
<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	100	38	100	20	0	94	100	0	0	0	98	5	0	27	66	0	98	0	61	0	0	33	0	0	0	