

BACILLUS CEREUS ET SECURITE DES ALIMENTS

Christophe NGUYEN-THE, Frédéric CARLIN, Marie-Hélène GUINEBRETIÈRE

Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Mixte de Recherche Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9

1. TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES CAUSÉES PAR *BACILLUS CEREUS*

Bacillus cereus est à l'origine de deux types d'intoxications transmises par les aliments, une intoxication émétique dont les symptômes sont caractérisés par des vomissements et une intoxication diarrhéique. Dans quelques cas, l'association des deux symptômes a été observée (Kramer et Gilbert, 1989).

L'intoxication émétique survient après une courte période d'incubation de 1 à 5 h. Elle est caractérisée par des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales et est accompagnée de diarrhée pour environ 1/3 des cas (Kramer et Gilbert, 1989). Un petit peptide cyclique, le céréulide, est la toxine responsable des symptômes émétiques (Agata *et al.*, 1994). Extrêmement stable, cette toxine émétique est produite dans l'aliment lors de la croissance bactérienne, peut persister après la disparition des bactéries, et résiste à de nombreux traitements comme la cuisson et aux conditions du tractus digestif. Par exemple, plusieurs cas d'intoxications émétiques proviendraient de riz cuit à l'avance, conservé quelques heures sans réfrigération puis frit pour la préparation de plats asiatiques (Kramer et Gilbert, 1989). La cuisson du riz n'ayant pas détruit les spores de *B. cereus*, la bactérie a pu se développer et produire la toxine émétique qui, thermostable, n'a pu être éliminée par la friture. L'intoxication diarrhéique est caractérisée par une diarrhée abondante, accompagnée de crampes intestinales et survient 8 à 16 heures après ingestion de l'aliment contaminé (Granum, 1997). Trois entérotoxines ont été clairement reliées à des épisodes diarrhéiques : les complexes triprotéiques Hbl et Nhe, ainsi que la protéine CytK. L'intoxication par ingestion de toxines diarrhéiques préformées dans l'aliment paraît peu probable (Granum, 1997) car les protéines toxiques sont labiles et ne résisteraient pas aux protéases digestives. La durée d'apparition des symptômes, relativement longue, laisse supposer que les toxines sont produites après croissance de *B. cereus* dans l'intestin grêle.

Les toxi-infections alimentaires à *B. cereus* ne sont à déclaration obligatoire que lorsqu'elles sont collectives. La plupart des cas étant en outre bénins, l'incidence des toxi-infections alimentaires à *B. cereus* est vraisemblablement sous-estimée. *B. cereus* représenterait néanmoins actuellement la quatrième cause de toxi-infection alimentaire collective en France avec 4,6 % des cas déclarés dont la cause est identifiée, après les salmonelles, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*. Le nombre de foyers de toxi-infections alimentaires collectives causés par *B. cereus* y est passé de 1 en 1997 à 8 en 2001, représentant respectivement 25 et 139 cas (Haeghebaert *et al.*, 1998, 2001 ; Haeghebaert

et al., 2002a ; Haeghebaert *et al.*, 2002b). En 2001, 9 personnes ont dû être hospitalisées sur les 139 atteintes. Dans les autres pays, la part de *B. cereus* dans les toxi-infections alimentaires est très variable. Elle semble relativement élevée en Europe du Nord, où *B. cereus* représente 33 % des cas d'origine bactérienne en Norvège de 1988 à 1993, et 8,5 % aux Pays-Bas en 1991. Elle serait plus faible aux États-Unis et au Canada avec 1 à 2 % des toxi-infections d'origine bactérienne (Granum et Baird-Parker, 2000). Les intoxications émétiques seraient surtout dues à la consommation de produits amylacés (riz et dans une moindre mesure pâtes alimentaires) tandis que les intoxications diarrhéiques ont été reliées à une large gamme d'aliments (Granum et Baird-Parker, 2000), graines germées (Portnoy *et al.*, 1976), jus d'orange issu d'un distributeur automatique (Talarmin *et al.*, 1993), plats cuisinés à base de légumes et/ou de viande, entremets (Kramer et Gilbert, 1989). Les aliments responsables des toxi-infections à *B. cereus*, émétiques ou diarrhéiques, semblent le plus souvent avoir subi un traitement thermique.

Les toxi-infections alimentaires à *B. cereus* sont souvent bénignes et les symptômes disparaissent généralement spontanément dans les 24 heures. Toutefois, un épisode émétique (Mahler *et al.*, 1997) et un épisode diarrhéique (Lund *et al.*, 2000) mortels montrent que la virulence de cette bactérie ne doit pas être sous-estimée.

2. RELATION DOSE-RÉPONSE

La relation entre la dose de *B. cereus* présente dans l'aliment et la probabilité de toxi-infection n'a pas beaucoup de sens pour l'intoxication émétique puisque la toxine, très stable, peut persister longtemps après la disparition de la bactérie. La dose de toxine émétique ingérée suffisante pour l'apparition des symptômes a été estimée sur un modèle animal, le petit singe *Suncus murinus*, à 8 µg/kg (Shinagawa *et al.*, 1995). En conditions de laboratoire, la toxine émétique est produite durant la phase stationnaire de croissance, lorsque la population de la bactérie a atteint 10⁸ UFC/ml (Haggbloom *et al.*, 2002). La culture peut alors contenir 10 µg/ml de toxine. La production de la toxine émétique par une même souche de *B. cereus* est en outre très fortement influencée par la nature du milieu et les conditions d'incubation. Par exemple, la toxine émétique ne serait pas produite au-dessus de 37°C et sa production serait plus élevée entre 15 et 20°C qu'à 30°C (Finlay *et al.*, 2000 ; Haggbloom *et al.*, 2002). Une forte production de toxine émétique a été observée dans du riz cuit, alors que la même souche produisait peu de toxine dans des aliments carnés et des ovo-produits (Agata *et al.*, 2002). En milieu liquide, l'agitation pourrait multiplier par 100 la production de toxine émétique (Haggbloom *et al.*, 2002 ; Agata *et al.*, 2002). Enfin,

la quantité de toxine produite dans des conditions identiques par des souches émétiques différentes peut être très variable (Haggbloom *et al.*, 2002).

La relation dose-réponse pour les intoxications diarrhéiques est mal connue à cause du faible nombre de données épidémiologiques. Le nombre de *B. cereus* retrouvé dans des aliments à l'origine de cas diarrhéiques serait au minimum de 10^3 UFC/g et au maximum de 10^9 UFC/g (Kramer et Gilbert, 1989; Notermans *et al.*, 1997). Quant à ces valeurs maximales, il n'est pas certain que beaucoup d'aliments puissent porter de si fortes populations de *B. cereus* sans être profondément altérés. Granum et Baird-Parker (2000) estiment que le nombre de *B. cereus* ingérées par les patients vont le plus souvent de 10^5 UFC à 10^8 UFC. Becker *et al.* (1994) citent 7 épisodes diarrhéiques représentant au total 78 cas pour lesquels la dose de *B. cereus* ingérée était sans doute comprise entre 10^3 et 10^5 UFC. Il faut noter que la production de toxine diarrhéique survient en phase stationnaire de croissance, généralement avec une population de *B. cereus* de 10^7 à 10^8 UFC/g d'aliment (Granum et Baird-Parker, 2000). Il est peu vraisemblable que des toxines préformées dans l'aliment aient pu causer des cas diarrhéiques dans la majorité des cas cités ci-dessus. Ceci renforcerait l'hypothèse de la production des toxines diarrhéiques dans l'intestin grêle par les cellules bactériennes ingérées.

3. INCIDENCE DE *B. CEREUS* DANS LA CHAÎNE DE PRODUCTION DES ALIMENTS

B. cereus a été détecté dans toutes les catégories de produits alimentaires, céréales, épices, légumes, produits carnés et produits laitiers (Carlin et Nguyen-the, 1998). La contamination de produits secs ou de matières premières brutes est le plus souvent faible, inférieure à 100 UFC/g. La contamination de courgettes brutes a été estimée entre 0,01 spore/g et 2,5 spores/g (Guinebretière *et al.*, 2003), celle de lait cru à la traite représentait en moyenne 40 spores/ml, la valeur médiane étant de 10 spores/ml (Christiansson *et al.*, 1999). La contamination de poudres de lait et de fécule de manioc en France était comprise entre 0,1 et 40 spores/g (Guinebretière *et al.*, 2003), celle de riz cru était inférieure à 200 spores/g (Chung et Sun, 1986). La contamination de plats cuisinés pasteurisés en début de conservation était inférieure à 10 spores/g pour des produits à base de légumes (Choma *et al.*, 2000) et inférieure à 100 spores/g pour des pâtes fraîches (DelTorre *et al.*, 2001). La contamination d'aliments en poudre pour bébé était inférieure à 10 spores/g pour la majorité des échantillons (Becker *et al.*, 1994). Une enquête au Portugal sur des plantes médicinales a révélé des niveaux de contamination supérieurs, avec 20 % des échantillons portant plus de 1000 spores/g (Martins *et al.*, 2001).

Le niveau de contamination de produits dans lesquels *B. cereus* est capable de se développer dépend essentiellement de la température et de la durée de conservation, cette dernière étant elle-même fonction de la vitesse d'altération du produit. Par exemple, dans des plats cuisinés à base de légumes pasteurisés dans leur emballage, *B. cereus* faisait partie de la microflore dominante lorsque les produits n'étaient pas réfrigérés ; sa concentration demeurait inférieure à 30 spores/g dans des produits conservés à 4°C, et représentait environ 1 % de la microflore (soit 10^5 à 10^6 UFC/g) dans 20 à 100 % des échantillons conservés 3 semaines à 10°C (Choma *et al.*, 2000 ; Guinebretière *et al.*, 2001). Il est probable qu'une conservation hors réfrigération augmente la probabilité d'une forte multiplication de

B. cereus avant l'altération de l'aliment. Dans des produits dont la durée de vie est courte du fait d'une altération rapide, comme des produits assemblés et emballés après cuisson, *B. cereus* demeurait à son niveau initial, même dans le cas d'une conservation à 10°C (Choma *et al.*, 2000). Les aliments pour bébé revêtent un intérêt particulier. En reconstituant des échantillons déshydratés portant naturellement 100 spores/g, *B. cereus* atteignait 10^5 UFC/ml après 7-9 h à 27°C (Becker *et al.*, 1994).

B. cereus est présent à toutes les étapes de la chaîne de production des aliments. Dans le cas des produits laitiers par exemple, les spores ont ainsi été retrouvées dans le sol, les fourrages, dans l'environnement de la traite, dans le lait récolté et à la surface des équipements de stockage et de transformation. La production de spores résistantes à de nombreux traitements utilisés dans les industries alimentaires explique pour partie la persistance de *B. cereus* tout au long des filières de production. Une forte hydrophobicité et la présence de longs appendices à la surface des spores pourraient en outre favoriser leur adhésion aux surfaces et les rendre plus difficiles à éliminer par les procédés de nettoyage et de désinfection (Andersson *et al.*, 1995).

Le sol contient généralement un nombre élevé de spores de *B. cereus*, le plus souvent compris entre 10^3 et 10^5 par gramme (Christiansson *et al.*, 1999 ; Guinebretière *et al.*, 2003 ; Te Giffel *et al.*, 1995a). Des sols de climats froids semblent porter en majorité des *B. cereus* psychrotrophes, à l'inverse des sols de climats tropicaux (vonStetten *et al.*, 1999). Le typage moléculaire des souches de *B. cereus* a permis d'identifier le sol comme la source primaire de contamination du lait cru, sans doute par contamination du lait au moment de la traite (Christiansson *et al.*, 1999). Ceci est cohérent avec la moindre incidence de *B. cereus* dans le lait provenant d'élevage hors sol (Slaghuis *et al.*, 1997). Des types de *B. cereus*, apparaissant uniquement après la pasteurisation du lait ou sa déshydratation, indiquent que les équipements de transformation sont une autre source possible de *B. cereus* (Eneroth *et al.*, 2001 ; Svensson *et al.*, 1999 ; Te Giffel *et al.*, 1996). Dans le cas de plats cuisinés à base de légumes (Guinebretière et Nguyen-the, 2003), plusieurs flux de contamination ont été détectés : les souches se développant dans les produits finis réfrigérés auraient pour origine le sol de culture des légumes, tandis que les souches se développant dans les produits non réfrigérés proviendraient des ingrédients de texture (protéines de lait et amidon).

4. DIVERSITÉ DE *B. CEREUS* DANS LA CHAÎNE DE PRODUCTION DES ALIMENTS

L'analyse des populations de *B. cereus* par les profils d'utilisation d'hydrates de carbone ou par typage moléculaire révèle la présence de plusieurs types dans un même échantillon. La diversité des échantillons de sol semble particulièrement large. A partir d'un même site de prélèvement, 44 types différents ont été identifiés parmi 60 isolats par Christiansson *et al.* (1999). 13 types différents parmi 35 isolats ont été identifiés par Guinebretière et Nguyen-the (2003). Dans le lait cru ou pasteurisé, le nombre de types identifiés sur le nombre total d'isolats collectés au cours d'une journée dans une même laiterie variait de 6 sur 36 à 30 sur 39 (Svensson *et al.*, 1999). Sur un lot de courgettes crues, 10 types sur 28 isolats ont pu être distingués (Guinebretière et Nguyen-the, 2003). Toutefois, certains procédés de transformation semblent réduire la diversité des matières premières. Le nombre de types était ainsi réduit de moitié en passant de la matière première au lait

en poudre (Te Giffel *et al.*, 1996) ou des produits crus aux plats cuisinés (Guinebretière et Nguyen-the, 2003). La grande diversité de *B. cereus* dans les aliments rend nécessaire une analyse de la distribution des facteurs importants en sécurité des aliments, en particulier ceux déterminant la virulence des souches ou leur comportement dans les aliments.

4.1. Diversité des facteurs de virulence

Les souches responsables d'intoxications émétiques semblent former un groupe très homogène. Toutes les souches connues sont incapables d'hydrolyser l'amidon, n'utilisent ni le mannose ni la salicine, ne produisent pas la toxine HBL et appartiendraient à uniquement 3 sérotypes, le sérotype H1 étant prédominant (Pirttijarvi *et al.*, 1999 ; Raevuori *et al.*, 1977). Pirttijarvi *et al.* (1999) ont en outre mis en évidence une relation clonale entre des souches émétiques d'origines géographiques très différentes et isolées à des dates très espacées. La proportion de souches émétiques dans les aliments et l'environnement n'est pas clairement déterminée. Le pourcentage d'isolats n'hydrolysant pas l'amidon peut donner une indication maximale (les souches n'utilisant pas l'amidon ne sont pas toutes émétiques). Suivant ce critère, les souches émétiques représenteraient au plus 2 % à 11 % des isolats de produits laitiers et de l'environnement de fermes laitières (Te Giffel *et al.*, 1995a). Sur un ensemble de souches de provenances diverses, Logan et Berkeley (1984) rapportent uniquement 4 % de souches n'utilisant pas l'amidon.

Les souches diarrhéiques formeraient un groupe plus hétérogène avec un sérotype variable. Les trois entérotoxines Hbl, Nhe et CytK ne semblent pas réparties de façon équivalente au sein des populations isolées d'aliments. La production des toxines Hbl et Nhe a été recherchée à l'aide des tests immunologiques commercialisés respectivement par Oxoid et TECRA, qui détectent chacun l'une des trois protéines du complexe toxique. Dans d'autres études, la présence d'un ou plusieurs gènes des opérons *hbl* et *nhe* a aussi été recherchée par PCR. Dans ce dernier cas, une sous-estimation du nombre de souches positives est vraisemblable puisque 36 % (pour *hbl*) et 58 % (pour *nhe*) de souches issues d'aliments et produisant ces toxines se sont avérées négatives en PCR pour au moins un gène de l'opéron, alors que la présence du gène a pu être démontrée par hybridation (Guinebretière *et al.*, 2002). Aucun anticorps dirigé contre la toxine CytK n'étant disponible, seule la recherche du gène *cytK* est actuellement possible. Toutefois, dans l'étude citée ci-dessus (Guinebretière *et al.*, 2002), la recherche de *cytK* par PCR n'a donné lieu à aucun résultat faussement négatif. Suivant les travaux de Beattie et Williams (1999), Granum *et al.* (1993), Griffiths (1990), Odumeru *et al.* (1997), sur un nombre de souches isolées de produits laitiers allant de 43 à 85, 51 à 85 % des souches produisaient la toxine Hbl et 85 à 100 % la toxine Nhe. Parmi des souches issues d'épices et de légumineuses, la toxine Nhe a été détectée avec une fréquence de 95 à 100 %, la toxine Hbl avec une fréquence de 54 à 95 % (Rusul et Yaacob, 1995). La toxine Nhe serait donc plus fréquemment produite par *B. cereus* que la toxine Hbl. De même, l'opéron *nhe* serait plus largement distribué que l'opéron *hbl*, le gène *cytK* étant le moins répandu : sur 96 souches issues d'aliments divers et de cas d'intoxication diarrhéiques, seules deux souches étaient négatives pour *nhe* contre 22 souches pour l'opéron *hbl* et 49 souches pour le gène *cytK* (Guinebretière *et al.*, 2002). Globalement, les souches ne possédant aucune des trois entérotoxines semblent très

rares (Choma *et al.*, 2000 ; Guinebretière *et al.*, 2002 ; Rusul et Yaacob, 1995). Toutefois, les quantités de toxines HBL et NHE produites par des souches isolées d'aliments peuvent être extrêmement variables (Beattie et Williams, 1999 ; in't Veld *et al.*, 2001). Par exemple, l'indice de production de Hbl, au sein de souches possédant les gènes *hbl* pouvait varier de 2 à plus de 128 (Guinebretière *et al.*, 2002). De même, l'activité cytotoxique sur des lignées cellulaires Caco2, qui mesurent de manière satisfaisante l'activité globale des entérotoxines produites par *B. cereus* (Granum, 1997), variait dans des proportions de 1 à 80 parmi des souches issues de produits à base de légume (Choma *et al.*, 2000). Les souches présentes dans les aliments n'ont donc pas toutes les mêmes entérotoxines et les produisent avec des niveaux très variables.

La comparaison de souches isolées d'aliments et de souches responsables de cas d'intoxications diarrhéiques (Guinebretière *et al.*, 2002) montre une incidence comparable des opérons *hbl* et *nhe* dans les deux groupes, mais une plus forte présence du gène *cytK* parmi les souches issues d'intoxications. Les souches issues d'intoxications sont en outre de fortes productrices des toxines HBL et NHE, alors qu'une forte proportion de souches d'aliments, possédant pourtant les gènes de ces toxines, serait de faibles productrices : environ 80 % des souches pour NHE et 70 % pour HBL (Guinebretière *et al.*, 2002).

4.2. Diversité de la résistance des spores de *B. cereus*

Dans la grande majorité des données publiées, la résistance thermique des spores de *B. cereus* est exprimée par le temps de réduction décimale (D) à une température donnée. Pour une même souche, les valeurs de D obtenues à une même température peuvent varier dans des rapports de 1 à 2, voire de 1 à 10 suivant les conditions expérimentales (Faille *et al.*, 1999 ; Gonzalez *et al.*, 1999 ; Mazas *et al.*, 1995). Il convient donc d'être prudent lors de la comparaison de données obtenues dans des travaux différents. Pour une même température de traitement, et dans une même étude, les valeurs de D obtenues à partir d'un ensemble de souches isolées d'aliments peuvent être relativement homogènes pour certains travaux, tandis que d'autres rapportent des variations entre souches allant de 1 à plus de 50 (Tableau 1). D'une façon générale, les thermorésistances les plus faibles publiées correspondent à des D_{90°C} inférieures à 1 minute (Choma *et al.*, 2000), tandis des souches isolées de conserves de légumes détériorées possédaient des valeurs de D_{130°C} proches de 0,3 minute (Bradshaw *et al.*, 1975). Il est donc impossible de définir *a priori*, même approximativement, la thermorésistance des spores de *B. cereus*.

Les hautes pressions (à partir de 250 Mpa) induisent la germination des spores de *B. cereus* (Raso *et al.*, 1998) et les champs électriques pulsés (50kV/cm avec des impulsions de 2 µs) semblent capables de réduire le nombre de spores cultivables (Marquez *et al.*, 1997). L'hypochlorite de sodium appliqué à 180 mg/l durant 10 min à 50°C en présence de 4 % de lait, sur les spores en suspension de 7 souches, entraînait une réduction de 1,6 à 3,2 log décimaux (Te Giffel *et al.*, 1995b).

4.3. Diversité de comportement de *B. cereus* lors de sa croissance

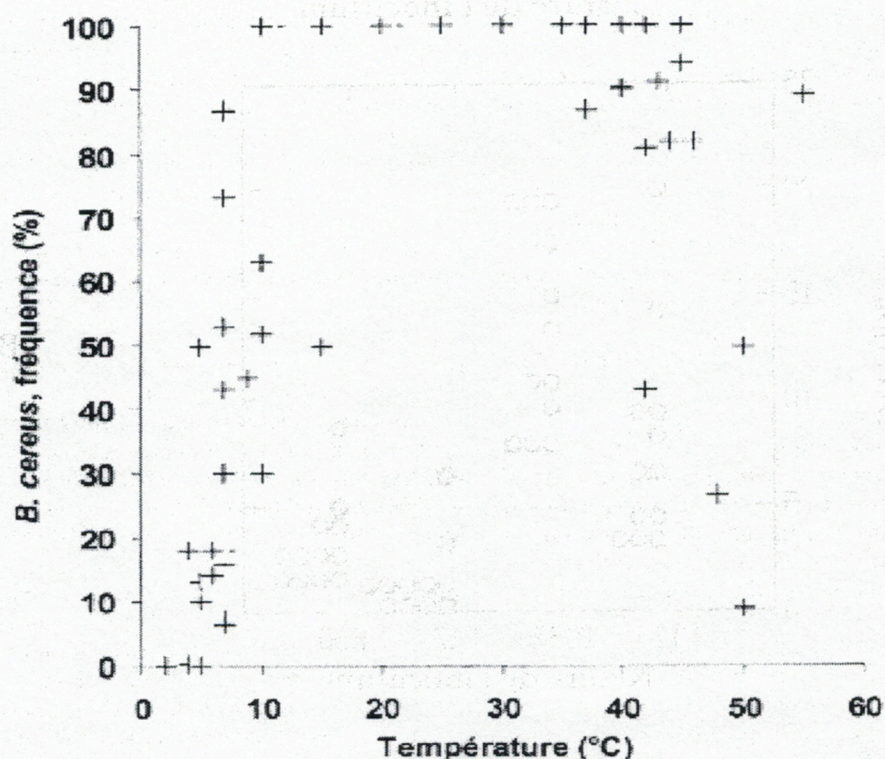
Les expériences destinées à mettre en évidence la croissance de *B. cereus* à des températures inférieures à 4°C sont peu nombreuses et se révèlent en général négatives. La

Tableau 1 : Exemples de thermorésistance, exprimée par le temps de réduction décimale (D), de spores de *Bacillus cereus* d'origines diverses

Origine des souches	Nombre de souches	Température de traitement (°C)	D (min)		
			Moyenne	Minimum	Maximum
Lait ¹	6	95	2,0	1,8	2,8
		100	0,8	0,7	1,5
Produits laitiers ²	25	100	3,5	2,0	5,4
Riz ³	6	92	22	16	36
		100	4,8	4,2	6,3
Riz ⁴	13	95	2,8	1,5	6,0
Aliments divers ⁵	12	90	Non calculée	2,2	> 100
Legumes cuisinés ⁶	52	90	Non calculée	0,7	5,9
Soupe en boîte ⁷	2	129,4	Non calculée	0,19	0,28
Cas diarrhéiques ⁸	6	100	6,7	0,6	27

1 – Janstova et Lukasova (2001) ; 2 – Wong *et al.* (1988) ; 3 – Chung et Sun (1986) ; 4 – Parry et Gilbert (1980) ; 5 – Dufrenne *et al.* (1994) ; 6 – Choma *et al.* (2000) ; 7 – Bradshaw *et al.* (1975) ; 8 – Rajkowski et Mikolajcik (1987).

Figure 1 : Fréquence des souches de *B. cereus* capables de se développer à des températures d'incubation comprises entre 2°C et 55°C. D'après : van Netten *et al.*, (1990) (n = 596), Hammer *et al.*, (2001) (n = 329), Rusul et Yaacob, (1995) (n = 164), Te Giffel *et al.*, (1997) (n = 106) Rajkowski et Mikolajcik, (1987) (n = 16), Dufrenne *et al.*, (1994) (n = 31), Foegeding et Berry, (1997) (n = 27), Te Giffel *et al.*, (1995a) (n = 757), Te Giffel *et al.*, (1996) (n = 344), DelTorre *et al.*, (2001) (n = 23), Francis *et al.*, (1998) (n = 100), Fehlhaber et Kunze, (1999) (n = 23), Andersen Borge *et al.*, (2001) (n = 11), Choma *et al.*, (2000) (n = 83).



température la plus basse à laquelle la croissance de *B. cereus* est observée est 4°C, mais seule une faible proportion des souches est concernée. Cette proportion augmente progressivement avec la température d'incubation, mais une variabilité élevée est observée, en particulier entre 4°C et 10°C (Rajkowski et Mikolajcik, 1987 ; van Netten *et al.*, 1990 ; Dufrenne *et al.*, 1994 ; Rusul et Yaacob, 1995 ; Te Giffel *et al.*, 1995a ; Te Giffel *et al.*, 1996 ; Foegeding et Berry, 1997 ; Te Giffel *et al.*, 1997 ; Francis *et al.*, 1998 ; Fehlhaber et Kunze, 1999 ; Andersen Borge *et al.*, 2001 ; DelTorre *et al.*, 2001 ; Hammer *et al.*, 2001) (Figure 1). Au-delà de 37°C la fréquence des souches capables de se développer diminue régulièrement, avec une diversité similaire à celle observée à basse température. Certains travaux signalent quelques

souches capables de se développer au-dessus de 50°C. L'étude des paramètres cinétiques (taux de croissance et latence) met également en évidence, lorsque la croissance est observée, une diversité de comportement chez *B. cereus* (Rajkowski et Mikolajcik, 1987 ; Dufrenne *et al.*, 1995 ; Andersen Borge *et al.*, 2001) (Figures 2A et 2B). Cependant la détermination de ces paramètres est très influencée par les conditions expérimentales, et en particulier par la nature et la manière dont sont préparés les inoculums. Les latences les plus brèves sont obtenues par exemple à partir d'un inoculum de spores obtenus à 30°C ou de cellules végétatives cultivées à 7°C (Dufrenne *et al.*, 1995) (Figure 2B).

B. cereus est une bactérie productrice de spores. La germi-

Figure 2. Histogramme de fréquence du temps de génération (A) et du temps de latence LAG (B) à 7°C de diverses souches de *B. cereus*. Les inoculums utilisés ont été préparés à partir de cultures de *B. cereus* pré-incubées à 30°C (PI30), à 37°C (PI37), à 7°C (PI7) ou à partir de spores obtenues à 30°C (SP30). D'après Dufrenne *et al.*, (1995).

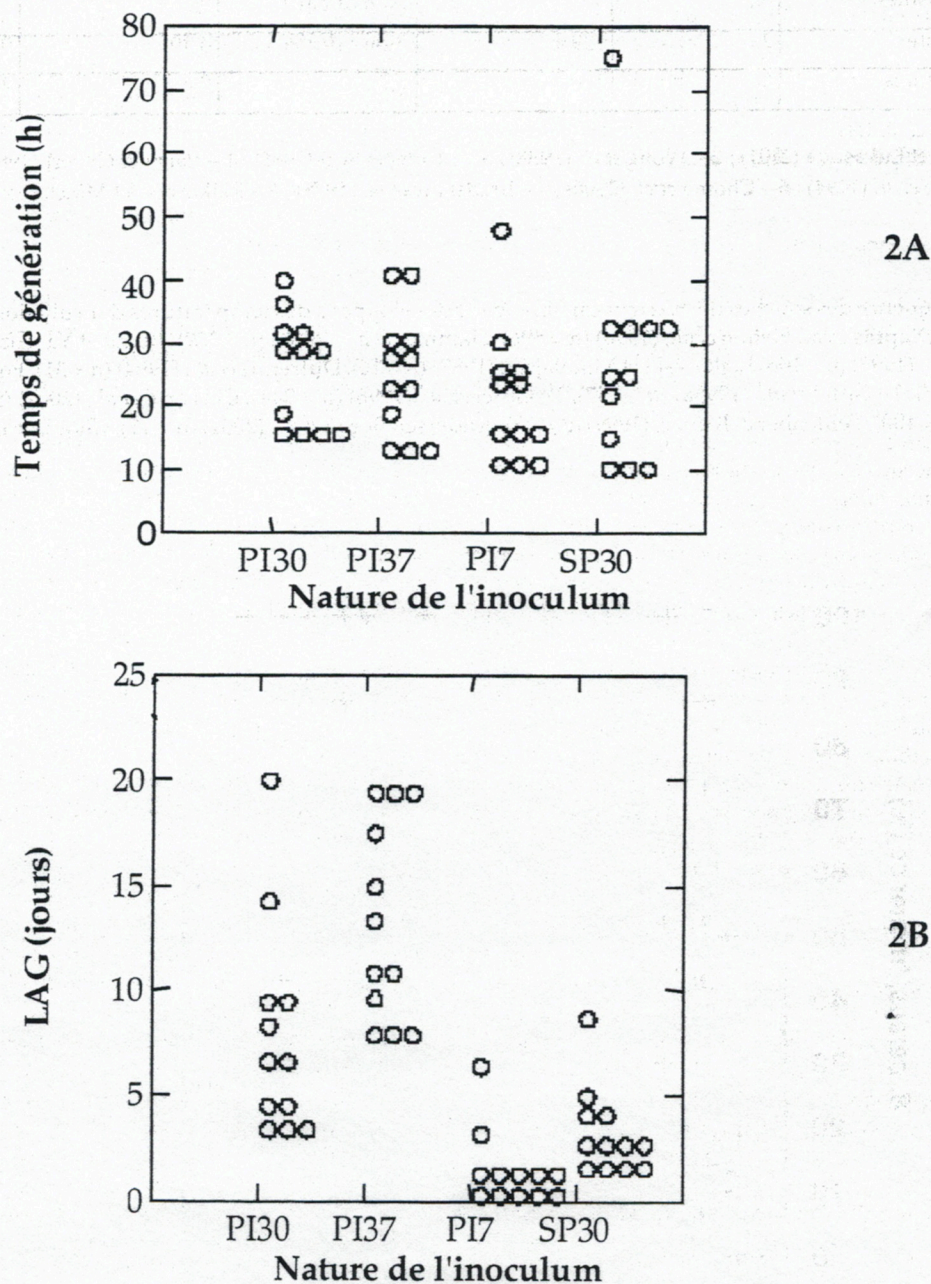
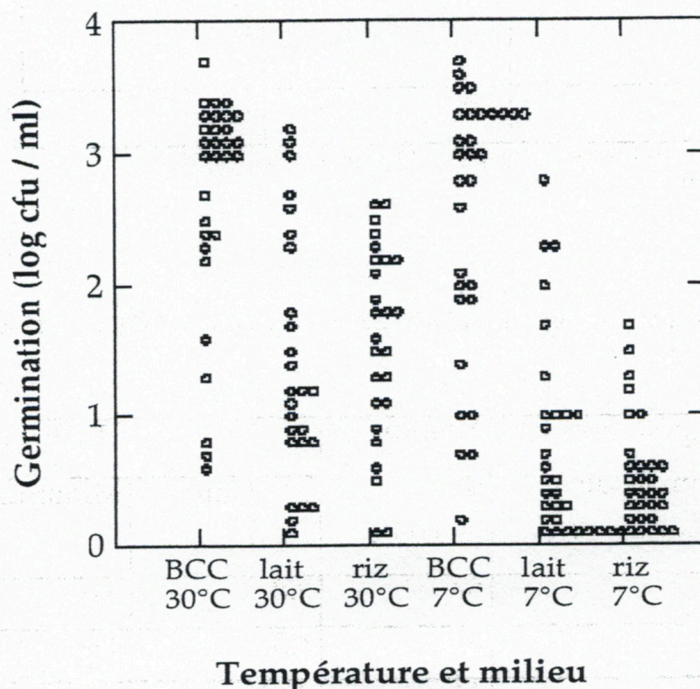


Figure 3. Histogramme de fréquence du taux de germination de spores de diverses souches de *B. cereus* dans plusieurs conditions d'incubation.

Le taux de germination est exprimé par la différence entre le nombre initial de spores et le nombre de spores après 50 min d'incubation à 30°C, et après 7 jours d'incubation à 7°C. Les expériences ont été réalisées dans du bouillon cœur cerveau (BCC), du lait écrémé et du bouillon de riz. D'après Dufrenne *et al.*, (1994).



nation, pendant laquelle la spore en dormance se transforme en une cellule végétative apte à se multiplier est une étape importante du développement de la bactérie. Le taux de germination dépend certes du milieu et de la température, mais varie également considérablement d'une souche à l'autre. La proportion des souches qui germent par exemple à 30°C et 7°C dans un bouillon nutritif ou dans diverses préparations alimentaires varie de plus de 99.9 % (moins d'une spore sur 1000 reste en dormance) à moins de 50 % (plus de 50 % des spores restent à l'état dormant) (Dufrenne *et al.*, 1994) (Figure 3).

4.4. Les facteurs de virulence et les facteurs de comportement sont-ils distribués de façon indépendante dans le groupe *B. cereus* ?

La virulence de *B. cereus* est-elle liée à des comportements particuliers ? La virulence de *B. cereus* est rarement analysée en même temps que les caractéristiques de comportement. Pourtant, cette information serait fort utile pour apprécier les risques liés à *B. cereus* dans les aliments. Des travaux (van Netten *et al.*, 1990 ; Rusul et Yaacob, 1995 ; Te Giffel *et al.*, 1997 ; Hammer *et al.*, 2001) montrent qu'une proportion élevée des souches psychrotrophes de *B. cereus* sont potentiellement diarrhéiques, du fait de la production d'entérotoxines ou de la présence des gènes des entérotoxines et d'une activité cytotoxique, sans qu'il soit possible de comparer avec les souches mésophiles. Toutefois, Choma *et al.* (2000) ont montré que, sur 83 souches isolées d'aliments, les 12 souches capables de croître à 5°C, bien que productrices d'entérotoxines, étaient non ou fai-

blement toxiques sur cellules Caco2. De la même façon, parmi 55 souches psychrotrophes du groupe *B. cereus*, appartenant à l'espèce récemment décrite *B. weihenstephanensis*, toutes les souches testées possédaient au moins un gène d'entérotoxine, mais 72 % n'avait pas d'activité cytotoxique (Stenfors *et al.*, 2002). Concernant les souches émétiques (Tableau 2), 14 souches à l'origine d'intoxications émétiques avaient une thermorésistance des spores en moyenne 6 fois plus élevée que celles de 13 souches non émétiques isolées de riz (Parry et Gilbert, 1980).

Selon deux études indépendantes portant sur 52 souches (Choma *et al.*, 2000) et 28 souches (Dufrenne *et al.*, 1995), les spores les plus thermorésistantes seraient produites uniquement par les souches non psychrotrophes (Tableau 3).

5. CONCLUSIONS

B. cereus est fréquemment rencontré tout au long de la filière de production des aliments et pratiquement toutes les souches semblent capables de produire au moins l'une des toxines responsables de toxi-infections alimentaires. En regard de cette ubiquité, la part des toxi-infections alimentaires à *B. cereus* peut sembler faible. Compte tenu de la très grande diversité des comportements rencontrés au sein du groupe *B. cereus*, toutes les souches présentes n'ont certainement pas la capacité à survivre aux procédés de transformation puis à se développer dans les aliments. Les souches issues d'aliments n'ont certainement pas non plus toutes la même capacité à causer des toxi-infections alimentaires. Il est par conséquent difficile actuellement

Tableau 2 : Thermorésistance, exprimée par le temps de réduction décimale à 95°C ($D_{95^{\circ}\text{C}}$), de spores de *B. cereus* provenant d'intoxications émétiques ou de riz.

Origine	Nombre de souches	$D_{95^{\circ}\text{C}}$ (min)		
		Moyenne	Minimum	Maximum
Intoxications émétiques ¹	14	23,3	2,9	36,2
Riz ²	13	2,8	1,5	6,0

1 – Souches de sérotype 1 ; 2 – Souches de sérotypes autres que 1
D'après Parry et Gilbert (1980)

Tableau 3 : Thermorésistance, exprimée par le temps de réduction décimale à 90°C ($D_{90^{\circ}\text{C}}$), de spores de *B. cereus* psychrotolérants et mésophiles.

Référence	Température minimale de croissance (°C)	Nombre de souches	$D_{90^{\circ}\text{C}}$ (min)		
			Médiane	Minimum	Maximum
Dufrenne <i>et al.</i> , 1995	5-7	6	5,8	5,0	9,1
	9-11	8	8,5	4,6	13,9
	> 11	14	29,5	4,8	> 100
Choma <i>et al.</i> , 2000	≤ 5	6	1,1	0,8	1,4
	> 5 et ≤ 10	28	1,3	0,7	3,2
	> 10	18	3,8	0,9	5,9

d'apprécier le risque que peut représenter *B. cereus* dans un aliment donné et de prévoir l'impact des procédés appliqués dans la chaîne de production des aliments, autrement qu'en effectuant une caractérisation des populations présentes.

REFERENCES

- Agata N., Mori M., Ohta M., Suwan S., Ohtani I., Isobe M. (1994). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, **121**, 31-34.
- Agata N., Ohta M., Yokoyama K. (2002). Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (Cereulide) in various foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **73**, 23-27.
- Anderson Borge G. I., Skeie M., Sorhaug T., Langsrud T., Granum P. E. (2001). Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *Int. J. Food Microbiol.*, **69**, 237-246.
- Andersson A., Roenner U., Granum P. E. (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *Int. J. Food Microbiol.*, **28**, 145-155.
- Beattie S. H., Williams A. G. (1999). Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Lett. Appl. Microbiol.*, **28**, 221-225.
- Becker H., Schaller G., von Wiese, W., Terplan G. (1994). *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *Int. J. Food Microbiol.*, **23**, 1-15.
- Bradshaw J. G., Peeler J. T., Twedt R. M. (1975). Heat resistance of ileal loop reactive *Bacillus cereus* strains isolated from commercially canned food. *Appl. Microbiol.*, **30**, 943-945.
- Carlin F., Nguyen-the C. (1998). *Bacillus cereus*. In "Manuel de Bactériologie Alimentaire" (Sutra L., Fédérighi M., Jouve J.L., eds.). Polytechnica, Paris, pp. 163-183.
- Choma C., Guinebretière M. H., Carlin F., Schmitt P., Velge P., Granum P. E., Nguyen-Thé C. (2000). Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 617-625.
- Christiansson A., Bertilsson J., Svensson B. (1999). *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *J. Dairy Sci.*

- 82, 305-314.
- Chung K.-T., Sun H.-L. (1986). Distribution and characteristics of *Bacillus cereus* from rice in Taiwan. *J. Food Sci.*, **51**, 1208-1212.
- DeTorre M., DellaCorte M., Stecchini M. L. (2001). Prevalence and behaviour of *Bacillus cereus* in a REPFED of Italian origin. *Int. J. Food Microbiol.*, **63**, 199-207.
- Dufrenne J., Soentoro P., Tatini S., Day T., Notermans S. (1994). Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. *Int. J. Food Microbiol.*, **23**, 99-109.
- Dufrenne J., Bijwaard M., Te Giffel M. C., Beumer R., Notermans S. (1995). Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *Int. J. Food Microbiol.*, **27**, 175-183.
- Eneroth A., Svensson B., Molin G., Christiansson A. (2001). Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the filling machine. *J. Dairy Research*, **68**, 189-196.
- Faille C., Fontaine F., Membre J. M. (1999). Factors influencing recovery of heat-injured *Bacillus thuringiensis* spores. Statistical approach. *J. Food Sci.*, **64**, 363-366.
- Fehlhaber K., Kunze A. (1999). Growth of aerobic spore forming bacteria isolated from meat products at low temperatures. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene*, **50**, 128-131.
- Finlay W. J. J., Logan N. A., Sutherland A. D. (2000). *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. *Lett. Appl. Microbiol.*, **31**, 385-389.
- Foegeding P. M., Berry E. D. (1997). Cold temperature growth of clinical and food isolates of *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.*, **60**, 1256-1258.
- Francis K. P., Mayr R., von Stetten F., Stewart G. S., Scherer S. (1998). Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3525-3529.
- Gonzalez I., Lopez M., Martinez S., Bernardo A., Gonzalez J. (1999). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, **51**, 81-84.
- Granum P. E. (1997). *Bacillus cereus*. In "Food microbiology. Fundamentals and frontiers" (Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J., eds.), ASM Press, Washington DC., pp. 327-336.
- Granum P. E., Baird-Parker T. C. (2000). *Bacillus species*. In "The Microbiological Quality and Safety of Food. Volume II" (Lund B.M., Baird-Parker A.C., Gould G.W., eds.), Aspen Publishers, Gaithersburg, pp. 1029-1039.
- Granum P. E., Brynestad S., Kramer J. M. (1993). Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int. J. Food Microbiol.*, **17**, 269-279.
- Griffiths M. W. (1990). Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk. *J. Food Prot.*, **53**, 790-792.
- 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. Ecology*, **43**, 207-215.
- Guinebretière M. H., Berge O., Normand P., Morris C., Carlin F., Nguyen-the C. (2001). Identification of bacteria in pasteurized zucchini purées stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purees. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 4520-4530.
- Guinebretière M.-H., Broussolle V., Nguyen-the C. (2002a). Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3053-3056.
- 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 purée processing line. *Int. J. Food Microbiol.*, **82**, 223-232.
- Haeghebeart S., Le Querrec F., Vaillant F., Delarocque Astagneau E., Bouvet P. (1998). Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1997. *Bull. Epidémiol. Hebdo.*, **1998**, 177-181.
- Haeghebeart S., Le Querrec F., Vaillant F., Delarocque Astagneau E., Bouvet P. (2001). Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1998. *Bull. Epidémiol. Hebdo.*, **2001**, 65-70.
- Haeghebeart S., Le Querrec F., Bouvet P., Gallay A., Espié E., Vaillant V. (2002a). Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. *Bull. Epidémiol. Hebdo.*, **2002**, 249-253.
- Haeghebeart S., Le Querrec F., Gallay A., Bouvet P., Gomez M., Vaillant V. (2002b). Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000. *Bull. Epidémiol. Hebdo.*, **23**, 105-109.
- Haggbloom M. M., Apetroaie C., Andersson M. A., Salkinoja-Salonen M. S. (2002). Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2479-2483.
- Hammer P., Wiebe C., Walte H. G., Teufel P. (2001). Incidence and properties of *Bacillus cereus* strains from a milk powder plant - risk consideration and quality assurance. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, **53**, 123-146.
- in't Veld P. H., Ritmeester W. S., Delfgou-van Asch E. H., Dufrenne J. B., Wernars K., Smit E., van Leusden F. M. (2001). Detection of genes encoding for enterotoxins and determination of the production of enterotoxins by HBL blood plates and immunoassays of psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* isolated from pasteurised milk. *Int. J. Food Microbiol.*, **64**, 63-70.
- Janstova B., Lukasova, J. (2001). Heat resistance of *Bacillus cereus* spores isolated from cow's milk and farm environment. *Acta Vet. Brno*, **70**, 179-184.
- Kramer J. M., Gilbert R. J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In "Foodborne bacterial pathogens" (Doyle M.P., ed.), Vol. 31, Marcel Dekker, New York, pp. 21-70.
- Logan N. A., Berkeley R. C. W. (1984). Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 1871-1882.
- Lund T., DeBuyser M. L., Granum P. E. (2000). A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.*, **38**, 254-261.
- Mahler H., Pasi A., Kramer J. M., Schulte P., Scoging A. C., Baer W., Kraehenbuehl S. (1997). Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *New Engl. J. Med.*, **336**, 1142-1148.
- Marquez V. O., Mittal G. S., Griffiths M. W. (1997). Destruction and inhibition of bacterial spores by high voltage pulsed electric field. *J. Food Sci.*, **62**, 399.
- Martins H. M., Martins M. L., Dias M. I., Bernardo F. (2001). Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. *Int. J. Food Microbiol.*, **68**, 149-153.
- Mazas M., Gonzalez I., Lopez M., Gonzalez J., Martin

- Sarmiento R. (1995). Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. *Int. J. Food Sci. and Technol.*, **30**, 71-78.
- Notermans S., Dufrenne J., Teunis P., Beumer R., Te Giffel M., Peeters Weem P. (1997). A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. *Food Microbiol.*, **14**, 143-151.
- Odumeru J. A., Mitchell S. J., Alves D. M., Lynch J. A., Yee A. J., Wang S. L., Styliadis S., Farber J. M. (1997). Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for health-care food services. *J. Food Prot.*, **60**, 954-960.
- Parry J. M., Gilbert R. J. (1980). Studies on the heat resistance of *Bacillus cereus* spores and growth of the organism in boiled rice. *J. Hyg., Camb.*, **84**, 77-82.
- Pirttijarvi T. S., Andersson M. A., Scoging A. C., Salkinoja-Salonen M. S. (1999). Evaluation of methods for recognising strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. *Syst. Appl. Microbiol.*, **22**, 133-144.
- Portnoy B. L., Goepfert J. M., Harmon S. M. (1976). An outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning resulting from contaminated vegetable sprouts. *Am. J. Epidemiol.*, **103**, 589-594.
- Raevuori M., Kiutamo T., Niskanen A. (1977). Comparative studies of *Bacillus cereus* strains isolated from various foods and food poisoning outbreaks. *Acta Vet. Scand.*, **18**, 397-407.
- Rajkowski K. T., Mikolajcik E. M. (1987). Characteristics of selected strains of *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.*, **50**, 199-205.
- Raso J., GongoraNieto M. M., BarbosaCanovas G. V., Swanson B. G. (1998). Influence of several environmental factors on the initiation of germination and inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.*, **44**, 125-132.
- Rusul G., Yaacob N. H. (1995). Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA. *Int. J. Food Microbiol.*, **25**, 131-139.
- Shinagawa K., Konuma H., Sekita H., Sugii S. (1995). Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **130**, 87-90.
- Slaghuis B. A., Te Giffel M. C., Beumer R. R., André G. (1997). Effect of pasturing on the incidence of *Bacillus cereus* in raw milk. *Int. Dairy J.*, **7**, 201-205.
- Stenfors L. P., Mayr R., Scherer S., Granum P. E. (2002). Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, **215**, 47-51.
- Svensson B., Eneroth A., Brendehaug J., Christiansson A. (1999). Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. *Int. Dairy J.*, **9**, 903-912.
- Talarmin A., Nicand E., Doucet M., Fermanian C., Baylac P., Buisson Y. (1993). Toxi-infection alimentaire collective à *Bacillus cereus*. *Bull. Epidémiol. Hebdo.*, **1993** (33), 154-155.
- Te Giffel M. C., Beumer R. P., Slaghuis B. A., Rombouts F. M. (1995a). 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., Van Dam W. F., Slaghuis B. A., Rombouts F. M. (1995b). Sporocidal effect of disinfectants on *Bacillus cereus* isolated from the milk processing environment. *Int. Biodeterio. Biodegrad.*, (1995), 421-430.
- Te Giffel M. C., Beumer R. R., Bonestroo M. H., Rombouts F. M. (1996). 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 J. Food Microbiol.*, **34**, 307-318.
- van Netten P., van de Moosdijk A., van Hoensel P., Mossel D. A. A., Perales I. (1990). Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.*, **69**, 73-79.
- vonStetten F., Mayr R., Scherer S. (1999). Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. *Environ. Microbiol.*, **1**, 503-515.
- Wong H.-C., Chang M.-H., Fan J.-Y. (1988). Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 699-702.