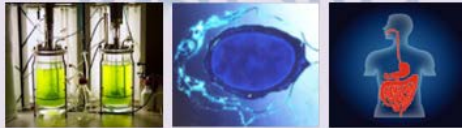




BSPIT 2015



Paris 6 - 7 juillet 2015

Colloque

Bactéries sporulantes pathogènes ou d'intérêt technologique

Programme et Résumés

Nom:

Prénom:

Colloque Bactéries sporulantes pathogènes ou d'intérêt industriel

Paris, 6 et 7 juillet 2015



Département Microbiologie et Chaîne alimentaire

Comité scientifique

Véronique Broussolle, UMR408 SQPOV, INRA PACA

Frédéric Carlin, UMR408 SQPOV, INRA PACA

Didier Lereclus, UMR1319 Micalis, INRA Jouy-en-Josas

Christina Nielsen-Leroux, UMR1319 Micalis, INRA Jouy-en-Josas

Vincent Sanchis, UMR1319 Micalis, INRA Jouy-en-Josas

Programme

Lundi 6 juillet 2015

9h-9h55 Accueil-Café
9h55h- 10h Message de bienvenue et infos pratiques

Session 1 Génomique et évolution

10h- 10h30 **Anne Brit Kolsto**

10h30- 10h45 Guillaume Girault
10h45- 11h Ana Valero-Rello
11h- 11h15 Alexei Sorokin
11h15- 11h30 Gislayne Vilas-Bôas
11h30- 11h45 Raphaël Patino-Navarrete
11h45- 12h Fernanda Fazion
12h- 12h15 Isabelle Poquet
12h15-12h30 Racha Majed

12h30-14h *Déjeuner*

Session 2 Mécanismes de différenciation

14h- 14h30 **Adriano O Henriques**

14h30- 14h45 Nicolas Kint
14h45- 15h Christelle Bressuire-Isoard
15h- 15h15 Isabelle Martin-Verstraete
15h15- 15h30 Michel Jobin
15h30-15h45 Sandrine Poncet
15h45-16h Emilie Gauvry

16h-16h15 *Pause-Café*

Session 3 Pathogénie, virulence et commensalisme

16h30-17h **Bruno Dupuy**

17h-17h15 Benjamin Glasset
17h15-17h30 Thomas Dubois
17h30-17h45 Michel Gohar
17h45-18h Virginie Castiaux
18h-18h15 Jean-Paul Madeira
18h15-18h30 Cédric Woudstra

Mardi 7 juillet 2015

Session 4 Spores bactériennes en industrie alimentaire et santé publique

9h-9h30	Christophe Nguyen-the
9h30-9h45	Christine Faille
9h45-10h	Stéphane André
10h-10h15	Narjes Mtimet
10h15-10h30	Sophie Jan
10h30-10h45	Jean-Marie Perrier-Cornet
10h45h-11h30	<i>Pause-Café</i>
11h30-11h45	Stéphane André
11h45-12h	Alizée Guérin
12h-12h15	Clément Trunet
12h15-12h30	Jeanne-Marie Membré
12h30-14h	<i>Déjeuner</i>

Session 5 Physiologie et génétique et biotechnologies

14h- 14h30	Didier Lereclus
14h30- 14h45	Simon Caulier
14h45- 15h	Emilie Verplaetse
15h- 15h15	Stéphanie Chamot
15h15- 15h30	Aurélie Baliarda
15h30-15h45	Sébastien Gélis-Jeanvoine
15h45-16h15	<i>Pause-Café</i>
16h15-16h30	Luc Dedieu
16h30-16h45	Eugénie Huillet
16h45-17h	Thomas Candela
17h-17h30	Remise des prix SFM et conclusions du colloque

The *Bacillus cereus* group – News and Views

Anne-Brit Kolstø

School of Pharmacy, University of Oslo, Norway

The *Bacillus cereus* group consists of ten species, of which *B. anthracis*, *B. thuringiensis* and *B. cereus sensu stricto* are the most studied and well known. While *B. anthracis* is the cause of anthrax and is toxic to animals and humans, and *B. thuringiensis* is an important biopesticide worldwide and used to combat insects that are harmful to crops and health, *B. cereus* is an opportunistic pathogen that may cause food poisoning as well as more serious diseases. Interestingly, the genes coding for the species-specific, main virulence factors of *B. anthracis* and *B. thuringiensis* are located on large plasmids. While *B. anthracis* is one of the most monomorphic bacterial species known, *B. cereus* and *B. thuringiensis* strains are phylogenetically intermixed, and some isolates are more closely related to *B. anthracis* than to a strain of their own species.

A typical feature of the *B. cereus* group species and strains is the presence of a varied number of plasmids (from 1 to 12 per strain), ranging in size from about 2 kb to 600 kb. Plasmids are often larger than 80 kb, and for instance the *B. anthracis* plasmids pXO1 and pXO2 necessary for full toxicity are 182 kb and 95 kb in size, respectively. Similarly, the pCER270 plasmid required for emetic disease in some *B. cereus* strains is 270 kb long. The stability and mobility of the high number of plasmids in nature is unknown. In addition several strains have phages, adding to the genomic complexity of the species group.

The most important development contributing to increased knowledge and understanding of the *B. cereus* group has been the employment of high throughput (and gradually less expensive) DNA sequencing methods, together with improved bioinformatics analysis tools. This was essential for perhaps the most important breakthroughs in the research of the *B. cereus* group during the past 20 years: the identification of *B. cereus* strains as the host for fully virulent pXO1 plasmids coding for *B. anthracis* toxins - strains that had caused serious illness and death in humans. Along the same line: *B. cereus* strains harboring both pXO1 and pXO2 plasmids causing death of great apes in central Africa (Cameroon and Ivory Coast) were identified. Does this point to an emerging new species, or does it constitute a capture of rare events? Major sequencing efforts have taken place worldwide and today more than 300 strains have been sequenced to a high coverage, including 86 to the final stage with full chromosome and plasmid closure.

B. cereus group bacteria are quite versatile and harbor many elements both on the chromosome and on the plasmids that may contribute to variability and adaptability, and the niche-preferences that may be observed. These elements include transposons, prophages, repeated sequences of various sizes, and Group I and II introns. The function(s) of most of these elements still remain to be elucidated. In addition *B. cereus* group bacteria harbor a very high number of efflux transporters, many with yet unknown functions, but most likely with important roles in strain adaptation.

This talk will highlight historical developments imperative to the current view of the *B. cereus* group and present news within selected topics of current research progress on these organisms.

Génotypage de *Bacillus anthracis* : Séquençage du génome complet et utilisation des Single Nucleotide Polymorphisms (SNP)

Guillaume Girault¹, Yann Blouin^{2,3}, Gilles Vergnaud^{2,4}, Nora Madani¹

¹ Université Paris-Est, Anses, Laboratoire de Santé Animale, Unité des Zoonoses Bactériennes, Maisons-Alfort, France

² Institute for Integrative Biology of the Cell, Univ Paris Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, Orsay, France

³ DGA MNRBC, Vert-le-Petit, France (adresse actuelle)

⁴ ENSTA ParisTech, Université Paris-Saclay, Palaiseau, France (adresse actuelle)

Bacillus anthracis est une bactérie pathogène sporulée, de répartition mondiale responsable d'une zoonose, la fièvre charbonneuse (ou charbon bactérien). La fièvre charbonneuse est une maladie avec un cycle naturel de transmission impliquant le bétail, la faune sauvage, mais également l'Homme de manière occasionnelle. Infectant principalement les mammifères (herbivores majoritairement), cette bactérie est responsable de foyers animaux et humains recensés annuellement à travers le monde [1]. *B. anthracis*, est également connu pour son utilisation en tant qu'arme biologique, comme ce fut le cas en 2001 aux USA lors de l'épisode « Amerithrax ». Plusieurs lettres contenant des spores du bacille ont ainsi causé la mort de 5 personnes et induit une désorganisation à grande échelle pendant plusieurs semaines du fait de la multiplication de canulars. L'identification du laboratoire ayant produit les spores incriminées a été longue et fastidieuse.

B. anthracis est une espèce jeune ayant récemment émergé de *Bacillus cereus*. Cette espèce est considérée comme clonale (héritage vertical des variations génétiques) et les différentes souches isolées à travers le monde ont montré une très forte homologie au niveau génétique. De ce fait, seules quelques méthodes d'analyse sont susceptibles de différencier les souches entre elles. Parmi ces méthodes, on peut citer le MLVA (Multiple Locus VNTR (Variable number of tandem repeat) Analysis), pouvant inclure des VNTRs à motif de un nucléotide les SNR (Single Nucleotide Repeat) ou le séquençage de grandes portions de génome voire désormais du génome complet, d'où peut être sélectionnés des SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) constituant des outils de typage de première intention [1,2]. Trois lignées majeures (A, B et C) ainsi que 13 sous-lignées ont été définies et identifiées au sein de la population de souches de *B. anthracis* via l'utilisation de SNP dits canoniques (canSNP). Afin d'approfondir la connaissance de la diversité de *B. anthracis* en France, une approche par séquençage du génome complet a été réalisée. Une analyse comparative de près de 130 génomes a été effectuée afin d'identifier des marqueurs de type SNP (à partir d'une analyse des SNP sur l'ensemble du génome) adapté à la diversité présente en France. Plusieurs marqueurs spécifiques des souches françaises ont été identifiés, dont huit nouveaux canSNP permettant une différenciation au niveau géographique parmi les isolats. [3]. Ces marqueurs ont été utilisés pour développer un outil de typage à haut pouvoir résolutif basé sur la méthode de PCR-HRM (High Resolution Melting). Cet outil peut désormais être utilisé pour le diagnostic ou les études épidémiologiques [3]. La comparaison des génomes des souches françaises avec les génomes d'autres pays européens et des bases de données publiques a permis d'accroître de manière significative la connaissance de *B. anthracis*. Les outils développés permettent à la France de disposer d'un outil de diagnostic performant, assurant la traçabilité et l'identification rapide des souches impliquées lors de foyers de fièvre charbonneuse et permettant d'identifier d'éventuels cas importés.

Plasmid horizontal transfer mediated by the bacteriophage SPP1

A. Valero-Rello¹, M. López-Sanz², A. Sorokine¹, S. Ayora²

*Microbial Genetics, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France*¹; and *Department of Microbial Biotechnology, National Center of Biotechnology (CNB-CSIC), Darwin 3, Cantoblanco, 28049 Madrid*²

The lytic *Bacillus subtilis* phage SPP1 mediates generalized transduction of host chromosome and plasmids, the latter being packaged in concatemeric form. It has been shown that the presence of homology between plasmid and phage increases its transduction efficiency 100-1000 fold (in pUB110 and pC194 rolling-circle replicating plasmids), and that it is independent of the recombination proficiency of donor or recipient cells. In this work, the contribution of phage replication and recombination proteins in the transduction of pUB110 plasmid was analyzed. SPP1 DNA replication starts by the theta mode when the phage replisome organizer G38P binds the origin region, *oriL*, and later it is required the phage helicase loader (G39P) and helicase (G40P), as well as the host DNA primase, DNA Pol III, and topoisomerases. After one or several rounds of theta replication, it shifts to concatemeric DNA replication in a process driven by recombination. For this shift the phage recombinase (G35P) and the 5'-3' exonuclease (G34.1P) are essential. In addition, SPP1 codes for two other non-essential proteins involved in DNA replication and recombination: a single-stranded DNA binding protein (G36P) and a Holliday junction resolvase (G44P). SPP1 mutants in genes 35, 36, 38 and 44 were constructed. We observed from the transduction assays and the PFGE analysis of the plasmid DNA produced after infection that both the G35P and the G38P proteins are essential for pUB110 transduction, and for the accumulation of a 44Kb-size plasmidic DNA. In contrast, mutations in genes 36 and 44, only showed a reduction in transduction. The contribution of plasmid type of replication (theta versus rolling-circle-replication) and copy number was also analyzed. Transduction efficiency was enhanced by increasing plasmid copy number, and rolling-circle-replicating plasmids were transferred at higher frequency than theta-type. The presence of any phage homologous region in the theta replicating plasmid also increased greatly the transduction efficiency. Our findings might suggest improved tools for phage mediated gene transfer.

Comparative genomics of extrachromosomal elements in *Bacillus thuringiensis var israelensis*

Alexandre Bolotin^{1,2}, Didier Lereclus^{1,2}, **Alexei Sorokin**^{1,2}

¹INRA and ²AgroParisTech, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France

Bacillus thuringiensis var israelensis (*Bti*) is one of the most important microorganisms used against mosquito. It was intensively studied after its discovery and became a model laboratory organism of the *B. thuringiensis* species. The topics of these studies were toxin gene organization, conjugation due to the clumping mechanism, phages with linear genomes and others. Few announcements appeared recently on genomic sequence determination of several strains. However the reported genomic information was not explicitly related to the biological properties studied earlier. Here we report the data on sequencing of four strains, two of them isolated from commercial products, their putative ancestor and an ATCC collection strain sequenced earlier in a very draft mode. The number of available genomic sequences is thus brought to seven. Analysis of published and new data permitted to assign the assembled contigs to the plasmids described earlier in *Bti* and discover some new. The most surprising is the identification of an extrachromosomal element that was not detected earlier, carrying multiple metabolic genes. The genomic data reveal important genome dynamics of toxin-coding plasmids in these strains. Several new small plasmids were also identified and the heterogeneity of their contents and structure between strains demonstrated. These data support the perception of active plasmid exchange existing between *Bti* strains in nature.

In silico analysis of *rap-phr* genes in *Bacillus cereus* group species

P. de Freitas Cardoso¹, L. A. Vilas-Boas¹, V. Sanchis², S. Perchat², D. Lereclus², G. T. Vilas-Bôas¹

¹ Universidade Estadual de Londrina, Depto. Biologia Geral, Londrina, Brazil.

² INRA, Unité Micalis UMR 1319, Jouy-en-Josas, France.

Bacillus cereus group comprises seven species of spore-forming bacteria that are able to colonize hosts as diverse as insects and mammals. *Bacillus thuringiensis* species is composed of bacterial strains that produce insecticidal toxins, *Bacillus anthracis* is highly pathogenic to mammals and *Bacillus cereus* is a highly diverse species including strains responsible for food poisoning. The determining characteristics of these species are encoded by plasmid genes. In addition to these genes, sequence data shows that numerous plasmids of *B. cereus* group species carry genes that encode proteins involved in adaptive functions for the bacteria, as the Rap proteins and their co-regulator, Phr, which are involved in several processes as sporulation. The frequent presence of these genes in plasmids leads to investigate their role. Our first objective was to perform an *in silico* analysis to establish a complete catalog of the *rap-phr* genes within the *B. cereus* group and to determine their distribution among plasmids and chromosome. Thus, a search for *rap-phr* genes was conducted in all complete genome sequences of the seven *B. cereus* group species, available in public database until April 2015. Sequences were analyzed for size, location (plasmid or chromosome), position within the replicon and similarity to *Bacillus subtilis* sequences. Genomes of 49 strains were analyzed. The *rap-phr* systems were identified in all these strains, and about 75% of *rap* genes presented a putative *phr* gene downstream, as in *B. subtilis*. The total number of *rap* genes by strain ranged from two to 17, and the average occurrence of *rap* genes in *B. thuringiensis* was higher than in *B. cereus* and *B. anthracis* strains. Chromosomal genes were generally located in the first two thirds of chromosomes with a high level of synteny between different strains. The results allowed to establish a complete catalog of plasmid *rap-phr* genes present in the studied bacteria, from which, it was observed that *B. thuringiensis* strains have approximately ten times more *rap-phr* plasmid genes than *B. cereus* strains. In addition, *rap-phr* genes were identified in almost 40% of *B. thuringiensis* plasmids and in 15% of *B. cereus* plasmids. The presence of *rap-phr* genes in a very large number of plasmids of the group *cereus*, especially in *B. thuringiensis* strains, suggests an important physiological role of their products and of the plasmids.

Financial support: CAPES/COFECUB collaboration program (process 816/14)

Unraveling the adaptive mechanisms of the opportunistic pathogen *Bacillus cereus* *sensu lato* by means of comparative genomics and an experimental evolution system using *Galleria mellonella*.

R. Patino-Navarrete, Buisson C, Nielsen-Lerroux C, Sanchis V.^{1,2}

¹INRA, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France, ² AgroParisTech, UMR Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France

Insects could act as natural reservoirs for several human pathogens (1). Besides, during its stay inside the insect these potential pathogens must compete against other microorganisms that constitute the host microbiome, and also, they will be challenged by host's immune system. Those conditions exert a considerable selective pressure on these bacteria, and may trigger the apparition and fixation of new more adapted variants. Given the similarity between the barriers that a pathogen must overcome to infect mammal and arthropods these emerging variants may be a source of human health threats (2).

To better understand the mechanisms of evolution and adaptation of the opportunistic gastrointestinal pathogen *Bacillus cereus* within a host we decided to set up an in vivo experimental system using orally force fed *Galleria mellonella* larvae as a host. We expect describe and trace through a serial passage experiment the apparition and fixation of mutations that favor its growth and multiplication inside the host. The genomes of experimentally evolved bacteria will be resequenced and compared with the initial strains, as well as with the genomes of other strains of *B. cereus*. In this way, we will be able to describe all the genome changes that may arose during the evolution of the pathogen and, additionally link these changes with phenotypic variations.

1- Waterfield NR, Wren BW and Ffrench-Constant RH (2004) Invertebrates as a source of emerging human pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 2 (10): 833-41.

2- Scully LR and Bidochka MJ (2005) Developing insect models for the study of current and emerging human pathogens. *FEMS Microbiol Lett*, 263 (1): 1-9.

Role of a *cry* plasmid on the multiplication and sporulation of *Bacillus cereus* in insect larvae

F. Fazon^{1,2}, O. N. Arantes¹, L.A. Vilas-Boas¹, C. Lemy², T. O. Carvalho¹, D.R. Sosa-Gomez³,
V. Sanchis², D. Lereclus², G. T. Vilas-Bôas¹

¹ Universidade Estadual de Londrina, Dept. Biologia Geral, Londrina, Brazil.

² Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Micalis, Jouy-en-Josas, France.

³ Embrapa/Soja, Londrina, Brazil.

Various bacterial species can coexist in the same environment, where genetic exchanges can occur. In a previous study (Santos et al., 2010, J. Invertebr. Pathol. 105: 171-175), we have shown the *in vivo* conjugal transfer of pHT73 plasmid (bearing a *cry1Ac* gene) between *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* strains, using insect larvae. Moreover, we also observed that spore germination and bacterial multiplication of some of the *B. cereus* exconjugants were improved. These data led us to determine whether these effects were due to the presence of the *cry* gene and/or to others uncharacterized genes on pHT73. We therefore analysed the role of pHT73 plasmid on the development of eight different *B. thuringiensis* and *B. cereus* strains in the lepidopteran insect *Anticarsia gemmatalis*. For each strain the development of three genotypes was investigated and compared, namely: a strain without plasmid, a strain carrying the pHT73 and a strain carrying the pHT73Δ*cry1Ac*. Larvae were fed with leaves containing 10⁹ spores of each strain. Following full leaf consumption, the development of the bacterial strains was monitored of four time points: 04, 34, 64 and 109 hours after end of consumption. The insects cadavers, resulting from ingestion of the Cry toxin or killed mechanically, were then crushed and the multiplication efficiency for each genotype was determined. The results demonstrated that both, uncharacterized pHT73 plasmid genes and the *cry* gene, may affect the multiplication ability of vegetative cells of *B. cereus* and *B. thuringiensis* strains in larvae. The development changed in diverse ways: first, the multiplication of one strain was significantly improved by the presence of the *cry* gene; second, depending of the strains, the pHT73Δ*cry1Ac* either improved, or reduced or did not affect the multiplication of the bacteria.

Financial support: CAPES/COFECUB collaboration program (process 816/14).

Genome wide analysis of gene expression in *Clostridium difficile* biofilm

Isabelle Poquet^{1,2}, Alexis Canette¹, Marc Monot², Jean-Marc Ghigo², Romain Briandet¹,
Isabelle Martin Verstraete² & Bruno Dupuy²

¹ INRA, Micalis UMR1319, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex

² Institut Pasteur, LPBA, 25 rue du Dr Roux, 75015 Paris

Clostridium difficile pathogenesis essentially relies on two well-known toxins targeting the intestinal epithelium, but earlier infection steps are not completely understood°. Biofilm growth is thus receiving more and more attention* because of its possible *in vivo* contribution to infection, in particular to colonization and/or to relapse.

Anaerobic biofilm growth of *C. difficile* was set up *in vitro* on an abiotic surface (glass) in microfermentors. Under those conditions, the model strain CD630Δerm was able to form biofilm in a medium known to favor toxin production. A genome wide analysis of expression after biofilm growth revealed a huge 'biofilm regulon' of 748 genes (20% of the genome). Interestingly, this regulon and the one controlled by CD2214-CD2215 proteins (homologous to *B. subtilis* SinR and SlrR/SinR-like proteins) were highly overlapping, highly suggesting that CD2214-CD2215 proteins perform a major regulatory function during biofilm growth, although acting to activate genes than to repress them like *B. subtilis* SinR.

A very high number (>100) of genes differentially expressed after biofilm growth are known or predicted to be involved in several metabolic functions suggesting a complete change in metabolism under biofilm growth. Genes involved in membrane transport (67), in cell wall biogenesis (54) and of unknown functions (64) are also highly represented. On the contrary, only few sporulation genes are differentially expressed (12), suggesting that the observed biofilm was early to mature rather than old and disassembling. The most up-regulated genes are involved in sugar uptake (PTS systems). Interestingly, several genes for exported adhesins and pilins, as well as genes involved in protein export were found to be up-regulated.

Mutagenesis of several up-regulated genes representative of different functions (sugar PTS, cell wall biogenesis, adhesion, pilus biogenesis ...) is currently in progress by the Clostron method. Constructed and available mutants (oligopeptide ABC uptake systems ...) are being characterized by confocal microscopy for their ability to form biofilms. This study should give insights on the molecular mechanisms used by *C. difficile* to form biofilm *in vitro*, and open perspectives to study their role *in vivo*.

° Carroll and Bartlett 2011 Ann Rev Microbiol

* Dawson *et al* 2012 Plos One, Dapa *et al.* 2013 J Bact, Semenyuk *et al* 2014 PlosOne

Function of the *eps2* chromosomal locus of *Bacillus thuringiensis*

Racha Majed^{1,2}, Mireille Kallassy², Michel Gohar¹

1 - INRA, UMR1319 Micalis, Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas, France

2 - Laboratoire de Biotechnologie, University of Saint-Joseph, Beirut, Lebanon

Biofilms are microorganisms communities embedded in a matrix, which includes polysaccharides, proteins and DNA. The biofilm produced by *B. cereus* and *B. thuringiensis* in glass tubes appears as a dense pellicle floating at the surface of the culture medium, and surrounded by a thick ring sticking to the tube wall. The *eps1* chromosomal locus of *B. cereus* and *B. thuringiensis* is similar to the *epsA-O* locus of *B. subtilis*. In this species, *epsA-O* is required for the formation of the exopolysaccharides component of the matrix, and its deletion leads to the formation of a thin and fragile biofilm. In contrast, in *B. thuringiensis*, deletion of *eps1* do not lead to changes in the biofilm biomass. Instead, the *eps1* mutant biofilm do not stick anymore to the tube wall, and the sugar content of the biofilm pellicle is decreased by half. We have shown that the *eps1* locus is involved in the production of a polysaccharidic, highly adherent, capsule when bacteria are grown in anaerobic conditions. These results led us to build the following model regarding the function of the *eps1* locus in biofilm formation. In glass tubes in unaerated conditions, bacterial cells produce a capsule, move against the oxygen gradient toward the liquid surface, stick to the tube wall and initiate biofilm formation.

However, we discovered that a second, but yet undescribed, *eps* locus was present on the *B. cereus* and *B. thuringiensis* chromosome. We deleted this locus, which we named *eps2*, and assessed the result of this deletion on biofilm formation. The *eps2* mutant was unable to produce the pellicle biofilm but was still able to produce a biofilm ring. Therefore, *B. thuringiensis* and *B. cereus* display two *eps* loci involved in biofilm formation, each having a specific function: *eps1* is required for the formation of the biofilm ring while *eps2* is necessary for the formation of the biofilm pellicle. A co-culture of the two mutants grown in equal concentration restores the full biofilm, with a ring and a pellicle, confirming that both loci are required for biofilm formation. This work shows for the first time in bacteria that different *eps* loci are involved in the formation of different and specific structures of the biofilm. Ongoing work is intended to define the sequence of events regarding the transcription of both loci and leading to the production of the full biofilm, and to determine the regulation pathways controlling the production of *eps2*-dependent polysaccharides.

Diversity and Constancy in Bacterial Endosporation

Adriano O. Henriques

*Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa, Avenida da República, Estação Agronómica Nacional,
2780-157 Oeiras Codex, Portugal*

Endosporation emerged once, some 2.8 billion years ago, at the basis of the Firmicutes phylum. While most of the previously described endospore-forming bacteria belong to the *Clostridia* (anaerobic) and *Bacilli* (aerobic) classes, they are also found in other classes within the Firmicutes, and organisms with a remarkably wide range of morphologies, life styles, and metabolic traits, including rods, cocci, branching species, giant cells, plant or animal pathogens or symbionts, syntrophs, sulphate reducers, phototrophs and also didermic organisms. In spite of the extreme diversity of endospore-forming bacteria, a robust genomic signature of about 40 genes can be derived. Moreover, the basic architecture of an endospore (spore for simplicity) is conserved across species. Most of the research on sporulation has been confined to *Bacillus* species, in particular to the model organism *B. subtilis* and much knowledge has been gained on the molecular and cellular mechanisms that govern developmental gene expression and morphogenesis. The recent introduction of efficient genetic tools has however spurred detailed investigations on other organisms, including Clostridial species of biotechnological or biomedical importance. These studies are adding precious information to our understanding of the Biology of sporulation. We will exemplify this point through our analysis, in the pathogen *Clostridium difficile*, of a conserved channel that spans the two membranes surrounding the developing spore. Studies in *B. subtilis* have led to the model that this channel acts as gap-junction-type conduit, or feeding tube, through which the mother cell nurtures the spore when, at the end of the engulfment sequence, it becomes insulated from the external medium. The channel is required to maintain metabolic potential in the forespore and continued transcription. Forespore engulfment is a hallmark of sporulation and accordingly, the genes coding for the components of the channel are part of the endospore signature. The channel proteins AH in the mother cell and Q in the forespore, form a zipper-like interaction that has a second, redundant role in forespore engulfment. However, homology of AH to the YscJ proteins that form ring-like structures in type III secretion systems and flagellar motors, suggests an ancient origin for the zipper. Moreover, it suggests that an ancestral function in the control of engulfment, was masked in *B. subtilis* and related organism, through the appearance of more complex engulfment mechanisms. In agreement with this idea, we show that in *C. difficile* AH and Q are essential for engulfment. Furthermore, AH and Q are also required for late gene expression. Importantly, we expand on the channel model by showing its requirement for gene expression in both the forespore and in the mother cell, hinting at an unexpected degree of metabolic cooperation between the two cells.

The stationary phase sigma factor, SigB, controls sporulation, metabolism and stress response in *Clostridium difficile*

N. Kint, M. Monot, O. Soutourina, B. Dupuy and I. Martin Verstraete

Laboratoire de Pathogénèse des Bactéries Anaérobies, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, and
Université Paris 7-Denis Diderot, 75013 Paris, France

Clostridium difficile, a Gram-positive, anaerobic, spore-forming bacterium is an emergent pathogen and the most common cause of nosocomial diarrhea. After contamination of the gut, *C. difficile* spores germinate and vegetative cells will be exposed to many stresses inside the host. In gram-positive bacteria, the stress response is managed by an alternative sigma factor, sigma B¹. The *sigB* gene usually forms an operon with genes involved in the control of SigB activity by a partner switching mechanism. During exponential growth phase, the anti-sigma factor RsbW sequesters and inactivates SigB. When bacteria are exposed to a stress or in stationary phase, the anti-anti-sigma factor, RsbV, is dephosphorylated by phosphatase(s) and can interact with RsbW allowing the release of SigB and the expression of its targets. Interestingly, the *rsbV*, *rsbW* and *sigB* genes are found in the genome of *C. difficile*. So, we decided to test the role of SigB in the management of stress in this bacterium. We first showed that the *sigB* gene is the last gene of a five genes operon (*CD0007-CD0011*), which is transcribed via a SigA promoter. We inactivated the *sigB* gene in *C. difficile* and started to characterize this mutant. We showed that the growth of the *sigB* mutant was similar to that of strain 630Δerm while its survival during stationary phase was reduced. We then compared the expression profiles of the 630Δerm strain and the *sigB* mutant at the onset of stationary phase. SigB positively or negatively controls about 20 % of the genes in *C. difficile* including genes involved in sporulation, motility, metabolism (carbon, nitrogen, fermentation) and cell wall synthesis suggesting its importance in the stationary phase. SigB also controls some genes involved in stress management and some regulators while SigB did not control toxin synthesis. *sigB* inactivation leads to an increase of sporulation and a higher sensitivity to oxidative and nitrosative stress. Finally, *sigB* inactivation led to an increase of sporulation rate in agreement with the transcriptome data showing an up-regulation of more than 200 sporulation genes in the *sigB* mutant. Using our recent genome-wide identification of transcriptional start sites² and the consensus sequence recognized by SigB in *Bacillus subtilis* and *Listeria monocytogenes*, we found a SigB-dependent promoter upstream of about 20 operons positively controlled by SigB in transcriptome including key genes involved in oxidative and nitrosative stress and we defined a consensus sequence recognized by SigB in *C. difficile*. Supplementary tests are currently in progress to determine the possible role of SigB in *C. difficile* gut colonization and infection.

1. Hecker, M., J. Pane-Farre, and U. Volker, *SigB-dependent general stress response in Bacillus subtilis and related gram-positive bacteria*. Annu Rev Microbiol, 2007. **61**: 215-36
2. Soutourina, O.A., et al., *Genome-wide Identification of Regulatory RNAs in the Human Pathogen Clostridium difficile*. PLoS Genet, 2013. **9**(5): p. e1003493.

Role of the morphogenetic CotE protein in the assembly of *Bacillus cereus* spore outer layers

Christelle Bressuire-Isoard¹, Monica Serrano², Adriano O. Henriques², Frédéric Carlin¹
and Véronique Broussolle¹

¹INRA, Université d'Avignon, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

²Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, 2781-901 Oeiras Codex, Portugal

Structure and chemical composition are responsible for bacterial spore resistance properties. In *Bacillus cereus* spores, coats layers are surrounded by a “balloon-like” structure called the exosporium. Coat and exosporium assembly is based on a complex protein interaction network that takes place during sporulation and implies several morphogenetic proteins.

We studied the role of one of these proteins, CotE, by characterizing the spores of a knockout mutant in the *B. cereus* ATCC 14579 strain. We also analyzed the effect of sporulation temperature (20°C and 37°C) on the structure and properties of both WT and mutant spores. Whatever the sporulation temperature, resistance properties to various physical and chemical treatments (heat, UV, biocides) as well as germination of $\Delta cotE$ spores were affected compared to WT spores. Differences in properties were associated to huge spore morphology modifications revealed by transmission electron microscopy observations. $\Delta cotE$ spores produced at 37°C exhibited a fragmented and detached exosporium and, in addition, misassembled coat layers when produced at 20°C. A proteomic analysis also showed some modifications in the spore protein content due to the *cotE* deletion and to sporulation temperature. Our results strongly suggest that CotE plays a major role in exosporium attachment to spore coats in *B. cereus* spores and that formation of spore outer layers is strongly affected when decreasing the sporulation temperature, probably leading to the observed modifications in spore properties.

Using several translational fusions and observations by fluorescence microscopy, we followed the time course of CotE synthesis during the sporulation process, as a function of the sporulation temperature, and its final localization in outer layers spore structures.

An original mechanism of control of *skin* excision during sporulation in *Clostridium difficile*

M. Serrano¹, F. Pereira¹, N. Kint^{2,3}, L. Saujet^{2,3}, B. Dupuy², AO Henriques¹ and I. Martin-Verstraete^{2,3}

1. Microbial Development Laboratory, ITQB, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal

2. Laboratoire Pathogénèse des Bactéries Anaérobies, Institut Pasteur, Paris, France; 3. Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Cellule Pasteur, 25 rue du Dr Roux Paris, 75015, France

Clostridium difficile, an emergent pathogen is the most common cause of nosocomial diarrhea. *C. difficile* spores have a central role in the infectious cycle. The late stages of sporulation are controlled by σ^K whose synthesis/activity is timely regulated. In *Bacillus subtilis*, σ^K is regulated by excision of a prophage-like mobile element (*skin*^{BS}) inserted in the *sigK* gene and by maturation of a pro- σ^K form. In *C. difficile*, the σ^K pro-sequence is lacking but a *skin*^{CD} is present and is probably a key element in the timing of σ^K synthesis. CD1231 encoded by the *skin*, shares similarity with the SpoIVCA-specific recombinase of *skin*^{BS}. We showed that CD1231 was necessary for sporulation and skin excision in *C. difficile*. In *B. subtilis*, σ^E and SpoIIID controlled the expression of *spoIVCA*. Surprisingly, CD1231 was expressed during exponential growth phase in *C. difficile* and neither σ^E nor SpoIIID controlled CD1231 expression. However, σ^E and SpoIIID were necessary to detect skin excision during sporulation *in vivo* indicating that another factor controlled by σ^E and SpoIIID probably modulated CD1231 synthesis or activity in *C. difficile*. We recently showed that CD1234 encoding a 72 amino acid proteins was produced in the mother cell during sporulation under the control of both σ^E and SpoIIID and was required for sporulation and for the skin excision *in vivo*. We further demonstrated that CD1231 and CD1234 formed a complex and that both proteins were required for skin excision *in vitro*. CD1234 resembles the recombination direction factors controlling the directionality of integrase-mediated recombination.

Sporulation et propriétés des spores de *Bacillus cereus* en anaérobiose

Jobin M.^{1,2}, Abbas A.^{1,2}, Planchon S.^{1,3}, Schmitt P.^{1,2}

1 Université d'Avignon, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, 84911 Avignon

2 INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, 84911 Avignon, France

3 CTCPA—UMT Qualiveg. Site Agroparc, 449 avenue Clément-Ader, BP21203, 84911 Avignon

Les cellules végétatives de *Bacillus cereus* peuvent se retrouver dans une grande variété de milieux naturels avec un faible niveau d'oxygène (intestin, sol, lignes de traitement des aliments...), environnements où la sporulation peut avoir lieu. Si l'effet de la température et de la composition du milieu en nutriments sur les propriétés des spores de *B. cereus* a été largement étudié, peu de données concernent l'effet de l'anaérobiose sur la résistance et la germination des spores de *B. cereus*. Nous avons cherché si les spores produites dans ces conditions d'anaérobiose présentent des propriétés spécifiques.

Dans ce travail, un panel de 18 souches de *B. cereus* appartenant aux groupes phylogénétiques de II à VII a été étudié pour sa capacité à sporuler en anaérobiose dans un milieu de sporulation approprié que nous avons développé (MODS). En anaérobiose, la capacité de sporulation a été plus faible et plus hétérogène qu'en aérobiose. La souche AH187 est celle qui a produit le niveau de spores le plus important en anaérobiose. Elle a donc été choisie pour étudier les propriétés de ces spores.

Les spores *B. cereus* AH187 produites en anaérobiose se sont avérées être plus résistantes à la chaleur humide (entre 90 °C et 100 °C), à la soude (1 M), à l'acide nitreux (1 M) et à la lumière pulsée. En revanche, aucune différence dans la résistance au peroxyde d'hydrogène, au formaldéhyde, ou aux UV-C n'a été observée entre les spores produites en aérobiose et en anaérobiose. En présence de L-alanine, les spores produites en anaérobiose germent plus efficacement que celles produites en aérobiose tandis qu'aucune différence dans la germination n'a été observée en présence d'inosine. Aucune différence dans la taille des spores produites dans les deux conditions n'a été observée par microscopie électronique à transmission. Toutefois, les spores obtenues dans des conditions anaérobies présentent un exosporium endommagé ou dans certains cas un exosporium complètement détaché, contrairement aux spores produites dans des conditions aérobies.

Rôle des Hanks kinases dans les régulations de phase stationnaire chez *Bacillus cereus*

Mounia Kortebi^{1,2}, Eugénie Huillet^{1,2}, Lisa Lorain^{1,2}, Sébastien Gélis^{1,2}, Didier Iereclus^{1,2},
Sandrine Poncet^{1,2}

1 INRA, UMR1319 MICALIS, Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas, France;

2 AgroParisTech, UMR1319 MICALIS, Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas, France

Chez les eucaryotes, les Hanks kinases (STKs) sont des sérine kinases régulant des processus cellulaires importants : prolifération, différenciation, oncogenèse. Certaines bactéries possèdent également des STKs, impliquées dans le contrôle de plusieurs fonctions importantes de phase stationnaire telles que la virulence, la sporulation, la formation de biofilms. Des approches globales de phosphoprotéomiques montrent que les STKs sont capables de phosphoryler un large spectre de substrats (Cousin *et al.*, FEMS Microbiol Lett. 2013; 346: 11-9). Il existe deux Hanks kinases chez *Bacillus cereus*, PrkC et YbdM, dont les rôles sont très mal connus (PrkC) voire inconnus (YbdM). Chez *B. cereus*, PrkC jouerait un rôle dans la germination des spores (Van Melis *et al.* Appl Environ Microbiol. 2011; 77: 2552-4).

Des données transcriptomiques et des expériences de RT-PCR montrent que dans la souche Bt 407, *prkC* appartient à un large opéron, conservé chez de nombreuses bactéries à Gram⁺. *ybdM* est co-transcrit avec *spo0M*, qui joue un rôle dans la sporulation chez *B. subtilis*. L'étude de l'expression de fusions transcriptionnelles des régions promotrices de ces deux opérons montre que *prkC* et *ybdM* sont exprimés en phase stationnaire. Enfin, nous avons construit des mutants de délétion "propre" de chacun de ces gènes, dont l'analyse phénotypique est en cours.

Par analogie avec *B. subtilis*, la bactérie Gram⁺ modèle, nous avons par ailleurs étudié l'impact de la phosphorylation STK-dépendante sur une cible majeure, SpoIIAB, un facteur anti-sigma impliqué dans la mise en place de la sporulation. SpoIIAB est également une kinase, qui phosphoryle SpoIIAA, un facteur anti-anti-sigma. Nous avons montré *in vitro* que la phosphorylation de SpoIIAB par les STKs augmente son affinité pour son substrat SpoIIAA, ce qui facilite le relargage, donc l'activation du facteur sigma σ^F .

Notre hypothèse de travail est que les STKs, chez *B. cereus*, jouent un rôle clé dans la régulation de certains processus cellulaires de la phase stationnaire, notamment la sporulation.

Modèle cinétique de croissance-sporulation de *Bacillus subtilis*

Gauvry, E., Mathot, A.G., Couvert, O., Leguériel, I., Coroller, L.

Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie
Microbienne, UMT14.01 SPORE-RISK, ScInBioS, Quimper, France

Les spores bactériennes sont ubiquitaires et sont à l'origine de la contamination des aliments. Si les conditions environnementales au cours d'un procédé de transformation ou de fabrication sont favorables, les spores germent, les cellules se multiplient jusqu'à atteindre des concentrations néfastes pour la stabilité de l'aliment ou pour la santé humaine. Les cellules peuvent ensuite se différencier en spores qui sont généralement résistantes aux traitements physiques appliqués en industrie agroalimentaire. Il est donc d'un grand intérêt de prévoir la sporulation au cours d'un procédé. Les modèles de sporulation sont peu utilisés et sont généralement développés indépendamment de la croissance végétative. Or, la sporulation est physiologiquement liée à la croissance et, actuellement, aucun modèle ne permet de décrire la croissance des cellules végétatives et leur différenciation en spores en système non alimenté.

L'objet de cette étude est de proposer un modèle de sporulation basé sur un modèle de croissance végétative en intégrant des paramètres liant les spores aux cellules végétatives dont elles sont issues. La souche *Bacillus subtilis* BSB1 dérivée de la souche modèle 168 a été utilisée pour cette étude. Les cinétiques de croissance et sporulation ont été obtenues en bouillon cœur cervelle additionné de sels de sporulation (Hageman et al., 1984), à pH 7.0, sous une agitation de 100 rpm avec un inoculum initial de 10^3 UFC/mL. Les concentrations en cellules totales ont été déterminées par inclusion en gélose et dénombrement des colonies. Les spores ont été énumérées après traitement de 10 minutes à 80°C pour éliminer les formes végétatives. Les cinétiques de croissance-sporulation ont été réalisées à 45°C, température optimale de croissance, 18°C et 37°C.

Plusieurs modèles ont été testés. Le choix du modèle s'est porté sur un compromis entre des critères statistiques qui rendent compte du bon ajustement du modèle aux données expérimentales et sur un critère de signification biologique des paramètres du modèle.

La cinétique de sporulation est décrite par deux phases: une première correspondant à l'apparition quasiment simultanée d'une première population d'environ 10^3 spores à 18°C et 37°C et $2 \cdot 10^4$ spores à 45°C, suivie d'une augmentation plus progressive du nombre de spores comme décrit par le modèle de Baril et al. (2012). Les paramètres cinétiques de sporulation sont différemment affectés par la température. L'efficacité maximale de sporulation a été observée à 37 °C avec une probabilité de sporulation de 47% alors que les probabilités sont de 0.76% et 0.02% à 45°C et 18°C respectivement. La diminution de température permet de retarder l'apparition des premières spores avec des temps séparant la fin de la phase exponentielle de la croissance végétative de l'apparition des premières spores de 3.5h, 6h et 60h à 45°C, 37°C et 18°C respectivement. En revanche, les vitesses d'apparition des spores décrivant la seconde cinétique de sporulation sont peu affectées par la température avec des valeurs de 0.022, 0.025 et 0.029 h⁻¹ à 18°C, 37°C et 45°C.

L'originalité de ce travail porte sur la nature du modèle dont les paramètres liant la cinétique de sporulation à la cinétique de croissance permettent de mieux comprendre comment le comportement de sporulation est modulé par les conditions environnementales.

Insights into virulence and host adaptation of the enteropathogen *Clostridium difficile*

Dupuy, B.

¹Laboratoire Pathogénèse des Bactéries Anaérobies, Institut Pasteur,
25 rue du Dr Roux, Paris 75015

The genus *Clostridium* comprises a large, heterogeneous group of obligate anaerobic, Gram-positive spore forming bacilli. Members of this genus are widespread in the environment and the majority of species are considered saprophytic, while some are pathogenic to both humans and animals. The pathogenic clostridia cause a variety of diseases including neuroparalysis, gas gangrene, necrotic enteritis, food poisoning, toxic shock syndrome and pseudomembranous colitis, which in most cases arise as a consequence of the production of potent exotoxins. Since neurotoxic clostridia owe their virulence almost entirely to their toxigenicity, virulence of both enteric and histotoxic clostridia is the result of a multistep process leading to toxin production and associated diseases. Among the enteric *Clostridia*, *Clostridium difficile* is the main causative agent of intestinal nosocomial infections in adults with compromised gut microbiota due to antibiotic usage and/or underlying disease conditions. The disease symptoms range from mild diarrhea to severe life-threatening pseudomembranous colitis and are essentially due to the production of two exotoxins TcdA and TcdB, while importance of each toxin in the disease is still questioned. In addition to these toxins, some *C. difficile* isolates commonly associated with severe infections, such as epidemic 027 and ribotype 078 strains, produce an additional binary toxin whose exact role in disease pathogenesis is not completely established. The spectrum of diseases caused by *C. difficile* has been also correlated, for the severe forms, to levels of toxins produced during host infection. This strengthened the idea that regulation of toxin synthesis is an important part of *C. difficile* pathogenesis. To date several regulators have been identified controlling toxin gene expression in response to several environmental signals including the availability of certain carbon sources, fermentation products and amino acids. The overlapping regulation of key metabolic pathways and toxin synthesis suggests strongly that toxin production is a complex response by the bacteria to particular states of nutrient availability during infection. Although TcdA and TcdB are the major *C. difficile* virulence factors, the colonisation process including spore germination, multiplication and resistance of the vegetative cells to host responses, is undoubtedly a prerequisite to the establishment of infection. Several putative virulence factors contributing to adherence and colonization of the intestine have already been described and concern: i) several cell wall associated protein (Cwp), the fibronectin binding protein Fbp68 and the two S-layer proteins (Slp) involved in cell adhesion and inflammatory responses, ii) the flagella with a more complex role in virulence than motility alone and iii) two factors involved in deacetylation of peptidoglycan and D-alanylation of teichoic acids, mediating resistance to lysozyme and to cationic antimicrobial peptides, respectively.

Characterization of food-borne outbreaks due to *Bacillus cereus* in France during the 2007-2014 period

Benjamin Glasset^{1,3}, Sabine Herbin¹, Laurent Guillier¹, Sabrina Cadel-Six¹, Marie-Leone Vignaud¹, Joel Grout¹, Sylvie Pairaud¹, Valerie Michel², Jacques-Antoine Hennekinne¹, Nalini Ramarao³, Anne Brisabois¹

1 French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), SBCL unit,
14 rue Pierre et Marie Curie, 94706 Maisons-Alfort Cedex France

2 ACTALIA, 419 route des champs laitiers, 74801 La Roche sur Foron

3 French National Institute For Agricultural Research (INRA), MICALIS unit, Domaine de Vilvert –
Bât. 442, 78352 Jouy-en-Josas, France

Bacillus cereus (*Bc*) is a spore-forming and ubiquitous bacterium responsible of food-borne outbreaks (FBO). *Bc* can induce two types of gastrointestinal diseases. The diarrheal syndrome occurs after the ingestion of vegetative cells or spores which can produce enterotoxins in the gut of hosts. The emetic syndrome is caused by the ingestion of a thermostable toxin, the cereulide, preformed in the food during the growth of *Bc*. These FBO are generally mild and self-limiting, however more serious and even lethal cases have been described in France and around the world. The number of FBO in France has steadily increased since 2011 (InVS data). Despite recent works about the phylogenetic classification of *Bc* strains into seven groups and the characterization of its main factors of virulence, pathogenicity of strains is not fully understood, particularly those associated with the diarrheal syndrome.

Our epidemiological study investigated 74 FBO, which were strictly associated with *B. cereus* and occurred in France over the 2007-2014 period. Phenotypic and genetic characterizations were performed on the 339 strains isolated from these FBO. Epidemiological and clinical data showed that symptoms could not be associated with the presence of emetic or diarrheic strains. However a significant difference was observed about incubation periods before the onset of symptoms according to the type of strains. Starchy food and vegetables were the most food vehicles identified and 60 % of FBO occurred in institutional catering what represents 82 % of human cases. It has been brought out that molecular typing was an essential step to distinguish strains isolated from a same FBO. Based on strain characterizations, comprising i) molecular typing, ii) detection of Nhe and Hbl enterotoxins by immunoassays, iii) PCR detection of cereulide, diarrheic toxins (Nhe, Hbl, Cyt K1 and Cyt K2) and HlyII, a factor associated with virulence, and iv) phylogenetic classification, 12 genetic signatures were identified. Signatures S2 have been associated with phylogenetic groups IV and a high production of enterotoxin Nhe and Hbl and were encountered in more than 32 % of FBO. Signatures S7, S8 and S10 have been associated with phylogenetic groups VII, VI and V respectively. These results also confirmed the high prevalence of strains belonging to the genetic groups II, III and IV in FBO.

This study highlights the importance of a thorough characterization of *B. cereus* strains related to available epidemiological data in order to improve the monitoring of FBO associated with *B. cereus*.

Role of deoxycholate on biofilm formation and toxinogenesis in *Clostridium difficile*

Dubois T¹, Hamiot A¹, Fontaine T², Briandet R³, Deschamps J³, Monot M¹, Martin-Verstraete I¹ and Dupuy B¹.

Institut Pasteur, ¹ LPBA and ²Unité Aspergillus, 25 rue du Dr Roux, 75015 Paris, ³ INRA, Micalis UMR1319, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex

Biofilm formation might play a role in the adaptation of *CD* to stress and/or in relapse following antibiotic treatment. Recent data indicate that bile acids have different effects on the ability of *CD* to colonize GI tract. Indeed, both cholate (CA) and deoxycholate (DCA), a secondary bile acid metabolized from CA, stimulates *CD* spores germination. However, DCA is toxic to vegetative *CD* cells. In healthy microbiota, *CD* vegetative cells are exposed to the toxic effect of DCA in the colon. In contrast, during dysbiosis, transformation of CA to DCA is prevented and the CA level remains high leading to spore germination and expansion of *CD* in the colon. In this study, we demonstrated that DCA strongly stimulates *CD* biofilm formation on abiotic surface. The DCA induced biofilms are highly adherents and are composed of elongated cells. We analyzed the matrix of the DCA induced biofilms and we showed that there is no qualitative or quantitative change in the sugars component of the matrix. In contrast, eDNA and extracellular proteins seems to participate to the hyper-adherent phenotype of the DCA induced biofilms. By a transcriptomic analysis, we showed that DCA in biofilm regulated genes involved in cells protection against stress, peptidoglycan turnover, nucleic acids biosynthesis and sporulation. Interestingly, the *tcdA* and *tcdB* genes encoding the two major toxins of *CD* are repressed and ELISA assays confirmed that toxin production is reduced in biofilms exposed to DCA. Altogether these results suggest that DCA is an important signal in the infectious life cycle of *CD* that might participate to *CD* persistence in the GI tract when a normal microbiota is restored after an episode of CDI, increasing the relapse's risk. Finally, we tested the ability of *CD* to form mixed biofilm with *Clostridium scindens* (*CS*), a commensal bacteria which can metabolized CA into DCA through a 7 α dehydroxylase activity. In a growth medium containing CA, the mixed biofilm is thicker than that of the mono-species indicating that *CD* and *CS* collaborate. We are currently looking for such collaboration in GI tract of axenic mice. These experiments should help to better understand the role of the normal microbiota in *CD* colonization, CDI and relapse.

Camelysin is both a cell-surface adhesin and the component of free extracellular fibers

Thomas Candela^{1,2#}, Annette Fagerlund³, Christophe Buisson^{1,2}, Nathalie Gilois^{1,2}, Nalini RamaRao^{1,2}, Abbass Haydar^{1,2}, Anne-Brit Kolstø³, Ole-Andreas Økstad³, Stéphane Aymerich^{1,2}, Christina Nielsen-Leroux^{1,2}, Didier Lereclus^{1,2}, and **Michel Gohar**^{1,2}

¹ INRA, Micalis (UMR1319), Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas, France

² AgroParistech, Micalis (UMR1319), Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas, France

³ Laboratory for Microbial Dynamics, School of Pharmacy and Centre for Integrative Microbial Evolution,, University of Oslo, Oslo, Norway

present address: EA4043, Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud, Châtenay-Malabry, France.

Bacteria of the *Bacillus cereus* group produce camelysin, a protein to which has been assigned several functions. It was first described as a cell-envelope metallopeptidase able to hydrolyze host tissue proteins, but was also reported to bind mucin and fibronectin, to act on the transcription of *inhA1*, another metallopeptidase gene, and to form fibers in the biofilm matrix. The aim of this work was to clarify the role of camelysin in *B. thuringiensis* physiology. We found that camelysin is not a metallopeptidase and has no effect on *inhA1* transcription. The camelysin gene, *calY*, was strongly overexpressed in biofilms, and its deletion led to a reduction in the biofilm thickness, which was partly restored by complementation. Immunodetection and fluorescence microscopy revealed the presence of a dense network of camelysin-containing fibers in the biofilm matrix. Yet, *calY* is also highly expressed in stationary phase. In early stationary phase, camelysin subcellular location was restricted to the bacterial cell-surface, but shifted later to cell-free, extracellular fibers. The location of camelysin on the cell-surface along with previous results suggested that this protein might be an adhesin. We confirmed this hypothesis and found that adhesion of the bacterium to epithelial cells was almost abolished in the *calY* mutant, but was restored after gene complementation. Next, we investigated the role of camelysin in *B. thuringiensis* virulence in an insect model, both by force-feeding and by injection into the hemocel. In both assays, *calY* deletion had a significant effect since the dose resulting in 50% mortality was increased 12 times in the mutant strain. Camelysin is therefore a bifunctional protein, acting both as a biofilm matrix protein, and as a major virulence factor. Since camelysin is highly conserved in *B. thuringiensis*, *B. cereus* and *B. anthracis*, this protein is likely to display similar functions in these species too.

La cytotoxine K de *Bacillus cereus* est-elle responsable du syndrome diarrhéique ?

Castiaux V.¹, Delbrassinne L.^{1,2}, Liu X.¹ et Mahillon, J.¹

1 Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Environnementale, Earth and Life Institute, UCL, Croix du Sud, 2 - L7.05.12, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique

2 Institut Scientifique de Santé Publique, rue J. Wytsman 14, B-1050 Bruxelles, Belgique

Bacillus cereus est potentiellement responsable de deux types de toxi-infections alimentaires associés à des syndromes émétique ou diarrhéique. Le syndrome émétique apparaît moins de 6 heures après la consommation d'aliments contenant le céréulide, la toxine émétique produite par *B. cereus*. Cette toxine interagirait avec le récepteur 5-hydroxytryptamine 3 (5-HT₃) dans l'estomac et causerait ainsi des vomissements. Dans certaines circonstances (e.g. sujet jeune et/ou ingestion de grande quantité), cette toxine est létale. Le syndrome diarrhéique, quant à lui, se manifeste 8 à 16 heures après le repas et est caractérisé par des douleurs abdominales, une diarrhée profuse, parfois accompagnée de nausées et de vomissements. A l'heure actuelle, la ou les molécule(s) responsable(s) de ce syndrome n'est (ne sont) pas encore clairement identifiée(s). En effet, il existe plusieurs candidats potentiels, et parmi ceux-ci, les trois les plus régulièrement cités sont: l'Hémolysine BL (HBL), l'entérotoxine non-hémolytique (Nhe) et la Cytotoxine K (CytK).

Afin de déterminer l'implication potentielle de CytK dans le syndrome diarrhéique, la présence des gènes *cytK* a été évaluée au sein de 402 souches de *B. cereus* provenant d'origines variées et incluant des isolats cliniques et de cas d'intoxications alimentaires. Les gènes *cytK* étaient présents dans 42 % de ces souches et étonnamment, la fréquence de *cytK* était moins élevée au sein des souches provenant d'intoxications alimentaires et de cas cliniques que pour les souches environnementales.

70 souches contenant *cytK* (dont 28 souches provenant d'intoxications alimentaires) ont ensuite été sélectionnées afin d'évaluer la diversité génétique de ces souches *cytK*-positives. Le dendrogramme basé sur l'alignement des séquences de *cytK* montre une diversité importante dans ces séquences et met en évidence 2 groupes bien distincts correspondant aux deux formes de la toxine déjà décrites dans la littérature (CytK1 et CytK2) mais, aucun cluster n'a cependant pu être observé en lien avec l'origine ou de la source de l'isolat. Ces observations ont été confirmées par une analyse *Multi-Locus Sequences Typing* (MLST) basée sur 5 gènes de ménage (*ccpA*, *recF*, *sucC*, *purF* et *gdpD*), suivie d'une analyse statistique via BURST (*Based Upon Related Sequence Types*) et pour lesquelles, là encore, aucun groupement des souches provenant d'intoxications alimentaires n'a pu être mis en évidence. Cette étude n'a donc pu établir aucun lien direct entre la présence de *cytK* et la virulence de la souche.

Le choix de *cytK* en tant que marqueur de virulence du pathotype diarrhéique de *B. cereus* ne semble donc pas pertinent, même si l'implication de CytK dans le syndrome diarrhéique ne peut pas être totalement exclue. En effet, l'effet synergique de CytK avec d'autres facteurs de virulence, ainsi que des niveaux d'expression variables de CytK ne sont pas à exclure et doivent encore être analysés en détail.

Dynamique de l'exoprotéome de *Bacillus cereus* et lien avec l'oxydation intracellulaire

Jean-Paul Madeira^{1,2,3}, Béatrice Alpha-Bazin³, Jean Armengaud³, Catherine Duport^{1,2}

¹ Université d'Avignon, UMR408, SQPOV, F-84000 Avignon, France. ² INRA, UMR408, SQPOV F-84914 Avignon cedex 09, France. ³ Laboratory «Innovative technologies for Detection and Diagnostic» CEA-Marcoule, DSV-Li2D, F-30207 Bagnols sur Cèze cedex, France.

Bacillus cereus est une bactérie anaérobie facultative à gram positif ubiquiste pouvant s'adapter à de nombreux environnements et s'y développer. C'est un agent pathogène gastro-intestinal capable de sécréter un très grand nombre de protéines extracellulaires dont des toxines qui joueraient un rôle important dans la pathogénicité de ce micro-organisme. En présence d'oxygène, *B. cereus* se développe suivant un métabolisme de type respiratoire. La chaîne respiratoire est une source endogène majeure de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). En l'absence d'oxygène et d'accepteur final d'électrons, *B. cereus* se développe suivant un métabolisme fermentaire qui ne génère pas de ROS. Des ROS endogènes sont cependant générés en réponse aux stress oxydatifs secondaires générés par les stress nutritionnels, tels ceux rencontrés lors de l'entrée en phase stationnaire et le stress réducteur tel celui généré par un bas potentiel d'oxydoréduction (POR) de culture. Les méthionines des protéines sont particulièrement sensibles à l'oxydation par les ROS endogènes. L'oxydation des méthionines conduit à la formation de méthionines sulfoxides, qui sont des dérivés oxydés stables détectables par spectrométrie de masse. De par leur conformation, les protéines extracellulaires sont des cibles des ROS endogènes avant leur exportation. Cette hypothèse est à l'origine du travail présenté.

Bacillus cereus a été cultivé en milieu défini MOD en aérobiose, anaérobiose à haut POR (sous flux d'azote) et anaérobiose à bas POR (sous flux d'hydrogène). Nous avons ensuite comparé la composition de l'exoprotéome de *B. cereus* récolté en début et en fin de phase exponentielle de croissance et en phase stationnaire de croissance par spectrométrie de masse à haute résolution. Plus de 50,828 peptides représentant 392 polypeptides différents ont été identifiés. Parmi eux, 32 n'avaient jamais été vus jusqu'alors dans l'exoprotéome de *B. cereus* ATCC 14579. Plus spécifiquement, les résultats ont montré que la dynamique des toxines au cours du temps était représentative de celle de l'exoprotéome dans son ensemble à la fois en termes d'abondance relative et de pourcentage de méthionines oxydées, en aérobiose comme en anaérobiose. Néanmoins, la dynamique des toxines est différente suivant les conditions d'oxygénation et de POR. Les résultats obtenus suggèrent que (i) l'abondance des toxines et leur taux de méthionines oxydés reflètent le niveau d'oxydation cellulaire et (ii) la sécrétion de toxines au cours de la croissance cellulaire contribue au maintien de l'homéostasie redox intracellulaire en piégeant les ROS endogènes, en particulier en phase active de croissance en aérobiose et en fin de croissance en anaérobiose.

Animal botulism outbreaks: A molecular investigation

Cedric Woudstra, Caroline Le Maréchal, Rozenn Souillard, Patrick Fach

French agency for food, environmental and occupational health safety (Anses)

Botulism is a rare but potentially fatal disease due to anaerobic - Gram positive - spore forming *Clostridium botulinum* bacterium. It produces the botulinum neurotoxin that can affect both humans and animals and lead to flaccid paralysis. Since 2007, the number of animal botulism outbreaks, due to *C. botulinum* group III producing toxin types C, D and mosaic types C/D and D/C, has been increasing in several European countries. The initial causes behind this upsurge have not been identified and very little is known regarding the genetic relatedness of *C. botulinum* group III strains, even though it is an important animal pathogen widely distributed in the environment. Our objective was to develop molecular tools to better investigate and characterize *C. botulinum* group III strains at the genetic level. We developed new detection and typing methods based on real time PCR, tested and validated them on strains and samples originating from Europe. The results showed that mosaic types C/D and D/C genes are prevalent in the European countries investigated. Molecular genes profiling of *C. botulinum* group III, based on flagellin *fliC* gene, showed the group to be less genetically diverse than *C. botulinum* groups I and II responsible for human botulism. Our findings suggest strain differences that are strongly geographically restricted. This is a useful start for genomic-diversity characterization of *C. botulinum* group III strains.

Risques et bénéfices des bactéries sporulantes dans les filières agro-alimentaires

Nguyen-the, C.

UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon, site Agroparc, CS-40509,
84914 Avignon Cedex, France

Les spores bactériennes contaminent la plupart des matières premières et des ingrédients alimentaires. Les conditions de transformation et de conservation des aliments se traduisent par une grande diversité de conditions physico-chimiques susceptibles de sélectionner des bactéries sporulantes. La résistance des spores leur permet de survivre aux traitements thermiques (pasteurisation, cuisson, et pour certaines appertisation), au séchage, aux procédés d'acidification. Certaines espèces possèdent des capacités d'adaptation aux basses températures, à l'anaérobiose, aux bas pH et dans une moindre mesure aux fortes teneurs en sels, leur permettant de se développer dans les aliments réfrigérés, conservés sous vide, acides ou en saumure. Cette large gamme d'aliments favorables aux bactéries sporulantes est sans doute la conséquence de la diversité des niches écologiques qu'elles colonisent. Quelques exemples illustrent les voies de contamination des réservoirs aux aliments. Le développement de bactéries sporulantes dans les aliments se traduit le plus souvent par des phénomènes d'altération, pouvant toucher toutes les filières alimentaires, produits laitiers, viandes, ovoproduits, fruits et légumes frais et transformés, céréales. Suivant la composition et la structure de l'aliment le déclenchement de l'altération dépendra plus ou moins étroitement de la disponibilité en certains substrats et/ou de l'évolution de la matrice au cours de la conservation. Etant particulièrement difficiles à éliminer les bactéries sporulantes d'altération représentent souvent des limites pour les barèmes de transformation des aliments ou des cibles de référence pour les pratiques d'hygiène en industries alimentaires. Un petit nombre de bactéries sporulantes sont des pathogènes de l'homme transmissibles par voie alimentaire, sous forme d'infection (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*,) ou d'intoxication (*Clostridium botulinum*, *B. cereus*). Bien que rare, la forte mortalité des intoxications à *C. botulinum* ont conduit les secteurs de la transformation des aliments concernés à définir leurs procédés dans l'objectifs d'empêcher sa survie ou son développement. Inversement, la forte fréquence des infections à *C. perfringens* et leur association étroite avec des défauts de gestion des températures en restauration collective, en ont fait la cible des réglementations sur le refroidissement des aliments après cuisson. Le nombre des toxi-infections à *B. cereus* a augmenté en France et en Europe ces dernières années, sans qu'il soit possible de savoir s'il s'agit d'un biais de la surveillance épidémiologique ou d'une réalité. *B. cereus* pose une difficulté particulière aux industries alimentaires par sa grande diversité d'adaptation, allant de souches psychrotrophes à des souches sub-thermophiles, ce qui rend difficile la définition de barèmes adaptés pour sa maîtrise. La découverte que cette diversité de comportements correspond à la structure phylogénétique de l'espèce peut ouvrir la voie à une lutte plus ciblée contre ce pathogène. La diversité des usages de *B. cereus* dans les filières agro-alimentaires pose une deuxième difficulté. Certaines souches ont été utilisées avec succès comme probiotiques pour les animaux de rentes, et d'autre, sous le nom de *Bacillus thuringiensis* sont des bio-insecticides très efficaces. L'introduction volontaire de souches d'une espèce pathogène dans la chaîne de production des aliments pose de difficiles questions à l'appréciation des risques. Il en est de même pour les espèces *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*, utilisées dans la chaîne de production des aliments, principalement comme probiotiques en élevage et pour la production de certains aliments fermentés en Asie et en Afrique, mais qui ont aussi été la cause de quelques toxi-infections alimentaires.

Détection des spores de *Bacillus cereus* par PCRq : ADN extracellulaire ou intracellulaire ?

Faille C¹, Morieux P¹, Slomianny C², Leleu G³, Midelet-Bourdin G³

1 INRA, UMR8207, Equipe Processus aux Interfaces et Hygiène des Matériaux, F-59650 Villeneuve d'Ascq
2 INSERM, U1003, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Université de Lille1, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex
3 ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Bd Bassin Napoléon, F-62200 Boulogne sur Mer, France

Afin de suivre la formation de biofilms de *Bacillus cereus*, l'équipe de G. Midelet-Bourdin a mis au point un test de PCR quantitative avec pour cible le gène *bclA*, responsable de la formation de la brosse superficielle de l'exosporium des spores. Cependant, les travaux réalisés à PIHM sur la formation de biofilms par des souches de *B. cereus* ont mis en évidence qu'une sporulation intense pouvait se produire au sein de ces biofilms, et que des taux de spores très élevés (>90%) étaient obtenus en 48 h pour certaines souches (Faille et al., 2014, Food Microbiol). Il nous a paru donc essentiel de vérifier que la PCRq permettait de détecter ces spores afin de ne pas sous-estimer la quantité de biofilm présente sur une surface. Les protocoles de PCRq ont été optimisés (tests de 5 couples d'amorces, conditions de PCRq, tests de spécificité) sur cellules végétatives de *B. cereus* puis sur spores. Les conditions suivantes ont été retenues (couple d'amorce C1/C2 à 1,5 µm, température d'hybridation de 55°C). Ces essais ont permis de déterminer que la droite de concentration d'ADN était linéaire sur $8.4 \cdot 10^3$ à $8.4 \cdot 10^9$ copies génome ($R^2 = 0,98$, efficacité = 2, pente = 3,20). Nous avons ensuite soumis des spores de *B. cereus* CUETM 98/4 à différents traitements proposés dans la bibliographie pour extraire l'ADN des spores. Il s'agit de méthodes physiques (sonication, broyage par Precellys et/ou presse de French, traitement thermique) ou chimiques (kits commerciaux d'extraction d'ADN: QIAAMP, DNeasy blood tissue, INSTAGENE). La quantité d'ADN extraite a été évaluée par PCRq-*bclA* et spectrophotométrie. Les spores ont aussi été observées par microscopie électronique à transmission (MET) pour vérifier si leur intégrité avait souffert des différents traitements. Pour confirmer l'origine de l'ADN identifié (superficiel vs intracellulaire), nous avons enfin soumis une partie des spores à un traitement au monoazide de propidium (PMA). Le PMA est un agent intercalant de l'ADN qui bloque l'amplification ultérieure de l'ADN avec lequel il a interagi. Sur des spores traitées au PMA, l'ADN superficiel des spores ne devrait plus pouvoir être amplifié par PCR. Nous avons ensuite quantifié l'ADN par PCRq-*bclA* de spores traitées ou non au PMA (spores entières et extraits d'ADN de spores obtenus avec le kit Instagene).

Parmi les méthodes physiques testées, les broyages par Precellys permettent d'obtenir des Ct plus faibles que les autres méthodes testées et la durée du broyage affecte directement les résultats en PCRq-*bclA*. En ce qui concerne les kits commerciaux, ils ont tous permis de détecter de l'ADN sur les lots de spores. Pourtant des différences ont été observées selon les kits, le kit Instagène ayant donné les meilleurs résultats. Suite au traitement par le PMA, l'ADN des spores n'a plus été détecté par PCRq-*bclA*, que ce soit sur les spores entières ou sur l'extrait par le test Instagène (les essais sur les spores broyées sont en cours de réalisation). Ce résultat suggère fortement que l'ADN détecté par PCRq-*bclA* est essentiellement, voire exclusivement superficiel. Ce résultat confirmerait les observations par MET : selon la méthode physique utilisée, les spores présentent un exosporium plus ou moins endommagé. En revanche, les tuniques (manteau), qui protègent les couches internes de la spore, ne semblent pas avoir souffert de ces différents traitements, ce qui rend improbable la détection de l'ADN intra-sporal.

Origine de la contamination en spores thermophiles de lignes de fabrication de conserves de légumes

Loïc Durand ^a, Stella Planchon ^a, Marie-Hélène Guinebretiere ^{b,c}, **Stéphane André** ^a, Frédéric Carlin ^{b,c},
Fabienne Remize ^{a,d}

^a CTCPA, Unité de microbiologie d'Expertise dans la Maitrise du Risque Industriel en Thermorésistants Sporulés, F-84911
Avignon

^b INRA, UMR408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon

^c Avignon Université, UMR408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon

^d Université de La Réunion, UMR95, QualiSud, ESIROI, Parc Technologique Universitaire, 2 rue JosephWetzell, F-97490
Sainte-Clotilde

La dégradation des conserves non acides au cours d'un stockage prolongé à haute température est provoquée par des bactéries sporulantes Thermophiles Hautement Thermorésistantes (THT). Pour définir l'origine de ces THT, il a été effectué des prélèvements microbiens au cours de deux campagnes consécutives sur des chaînes de production de conserve de petits pois - carottes. Au total, 341 échantillons ont été recueillis, comprenant des légumes crus aux différentes étapes de traitement, des légumes blanchis, du jus de couverture et des échantillons d'environnement du process. Les spores THT ont été spécifiquement suivies.

Au cours de l'étape de préparation des légumes - parage, lavage - la contamination en spores a fortement diminuée puis, suite au blanchiment, la contamination moyenne a eu tendance à rester stable au cours du procédé. Toutefois, une forte variation de la quantité de spores dans les légumes conditionnés avec le jus de couverture, prélevés immédiatement avant la stérilisation, a été observée. Cette variabilité dans les légumes à cette étape peut s'expliquer par les concentrations en spores parfois élevées sur les prélèvements d'environnement : surfaces et débris. La contamination de ces derniers résultants certainement des temps de séjours longs combinés à des conditions favorables à la croissance et la sporulation. Le traitement de blanchiment des légumes a également été associé à une augmentation de la prévalence des espèces THT, probablement en raison de la contamination croisée des pois via l'eau de blanchiment.

Dans ce groupe de flore bactérienne sporulante et thermophile, il y a notamment l'espèce *Geobacillus stearothermophilus* qui correspond à plus de 30% des altérations de conserves incubées à 55°C (André et al, 2012). Un génotypage par la technique M13-PCR, développée par Durant et al (2015) a été effectuée sur 112 isolats provenant des 2 campagnes. 23 profils types ont été observés et ont permis de confirmer la présence de contamination croisée au cours du procédé.

L'ensemble de ces résultats a permis de clarifier les voies de contamination des spores thermophiles dans une conserverie de légumes.

Outcome of *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 heat-treated spores during storage

Mtimet N.⁽¹⁾⁽²⁾, Trunet C.⁽¹⁾, Mathot A.G.⁽¹⁾, Venaille L.⁽²⁾, Leguérinel I.⁽¹⁾, Coroller L.⁽¹⁾, Couvert O.⁽¹⁾

(1) Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UMT14.01 SPORE-RISK, 6 rue de l'Université, F-29334 Quimper, France.

(2) BONDUELLE, rue Nicolas Appert BP 30173, 59653 Villeneuve d'Ascq, France

Introduction: *Geobacillus stearothermophilus* is a well-known flat sour spoilage organism, commonly used as biological indicator in the design of heat sterilisation process. Several studies have investigated the heat resistance of the spores. However, little information is available regarding the behavior of the heat treated surviving spores during the can food storage.

Purpose: The purpose of this study was to model the spores behavior after a heat treatment when spores are exposed to conditions which not allow growth (eg. at low temperature or low pH). The model should take in account heat treatment conditions, medium pH and storage temperature.

Methods: Spore of *G. stearothermophilus* was heat treated at three different conditions to reach one decimal reduction: 115°C, pH 7 or pH 5.5 and 120°C, pH 7. Heat treated spores were stored in nutrient broth at conditions not allow growth. The spores behavior was evaluated by count plating for months.

Results: After a heat treatment, the surviving spores able to recover on agar medium decreased during the storage in no-growth conditions. Inactivation kinetics are biphasic, revealing the presence of two populations of spores after a heat treatment. The proportion of the most sensitive subpopulation was impacted by heat treatment conditions. Moreover, the resistance of the both subpopulations was affected by the pH and the temperature of storage. The higher resistance was observed at neutral pH (44 days \pm 1.6 for one decimal reduction at 35°C) compared to pH 5.2 (18.5 days \pm 2.7) Also, the surviving spores are inactivated faster for storage at high temperature (6.5 days for one decimal decrease at 55°C or 108 days at 25°C for pH 4.8).

Significance: This work provides a new perspective to deal with flat sour spoilage by taking in account the heat treatment efficiency and the impact of the physiochemical food properties during the storage.

Egg white kills *Bacillus cereus* group bacteria through a mechanism involving ovotransferrin

Jan, S.¹, Gonnet, F.¹, Pasco, M.¹, Jardin, J.², Gautier, M.¹, Guérin-Dubiard, C.¹, Nau, F.¹ and Baron, F.¹

1 Agrocampus Ouest and Institut national de la recherche agronomique (INRA), UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France

2 Institut national de la recherche agronomique (INRA) and Agrocampus Ouest, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France

Egg white antimicrobial activities are widely investigated regarding the resistance of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. This resistance is considered as one of the main factors explaining the high prevalence of this serovar in egg-product-related food-borne disease. The behavior of Gram-positive bacteria has been poorly investigated in egg white whereas it can provide additional insight into the bacterial response to this iron-deprived harsh medium. Investigating the behavior of Gram-positive bacteria in egg white may then provide new insights into the mechanisms of bacterial pathogenesis and adaptation in the host iron-deprived environment. *Bacillus cereus* is a Gram-positive spore-forming opportunistic human bacterium frequently associated with foodborne infections due to the production of diarrheal and emetic toxins. Psychrotrophic *B. cereus* group strains are recognized as being involved in spoilage events of chilled pasteurized liquid whole egg products due to their ability to secrete hydrolytic enzymes, even at low temperature. Their behavior in an egg product such as egg white warranted further consideration since this ingredient is widely used in the production of food particularly sensitive from a microbiological perspective, such as chilled lightly cooked desserts comprising egg white foams (chocolate mousse, floating island, etc.). These facts led us to investigate the behavior of *B. cereus* group bacteria in egg white. Our results highlighted a strong bactericidal effect at permissive temperature (30°C) and under the natural alkaline (natural pH of 9.3 a few days after laying) and iron-deprived conditions of egg white. This bactericidal effect could be ascribed to a well-known egg white protein, ovotransferrin, which to date had exclusively been described as responsible for bacteriostasis due to iron chelation. The addition of iron reversed this bactericidal effect only under neutral incubation conditions. A perturbation of the electrochemical potential of the cytoplasmic membrane suggested that an ovotransferrin-mediated membrane disturbance mechanism could be involved in bacterial death in egg white.

Cartographie de la fluidité des membranes de spores de *B. subtilis* par microscopie de fluorescence résolue en temps

Pauline Loison¹, Chloé Modugno¹, Neveen Hosny², Marina Kuimova², Hélène Simonin¹,
Jean-Marie Perrier-Cornet^{1,3}

1. UMR PAM Université de Bourgogne/Agrosup Dijon, équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques, 1 esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.
2. Dept of Chemistry, Imperial college London, Exhibition Road, SW7 2AZ, UK
3. Plateforme DImaCell, Campus Universitaire Montmuzard, 21000 Dijon, France.

L'état de la membrane plasmique des cellules est un élément essentiel pour connaître la condition physiologique des cellules. Sur des microorganismes, cette connaissance permet de mesurer l'impact d'une perturbation sur la structure cellulaire et sur sa survie ultérieure. La fluidité membranaire résulte tout à la fois de la composition en phospholipides, de la présence et du rôle de certaines molécules comme les stérols, les protéines transmembranaires mais aussi des conditions thermodynamiques et physico-chimiques extérieures (P, T, a_w). La bactérie *Bacillus subtilis* est capable dans des conditions défavorables de passer d'un état actif végétatif à l'état de spore, état de dormance accompagné d'un enkystement cellulaire. Dans cet état, la structure unique de la spore comporte deux membranes phospholipidiques. La membrane interne, la plus importante, présente une faible perméabilité sans modifications fondamentales de sa composition (Griffith and Setlow, 2009). Elle a de plus un rôle essentiel dans l'extrême résistance de la spore, notamment aux attaques chimiques. Afin d'étudier cette transformation ainsi que la résistance de la membrane de la spore aux différentes perturbations, nous avons développé un nouveau type de marquage afin de suivre la fluidité membranaire dans la cellule et dans la spore. Ce développement a été rendu nécessaire car l'imperméabilité de la spore et la présence de deux membranes rendait difficile d'autres approches. Ce marquage utilise un rotor moléculaire apolaire le Bodipy C12 (Kuimova, 2012). L'utilisation de l'imagerie par temps de vie de fluorescence (FLIM) a permis de mesurer directement la microviscosité du milieu qui environne la sonde ainsi que de différencier le signal venant de chaque membrane (Loison et al. 2013). Ce marquage a permis de suivre l'état de la membrane lors de la germination ou lors de perturbations environnementales (éthanol, température). Il devient ainsi possible de suivre l'état membranaire de la spore pendant la perturbation. On peut ainsi espérer mieux comprendre comment cette membrane permet à la spore de résister à des conditions extrêmes et comment elle peut être altérée de façon irréversible ou non, pour certaines perturbations.

Griffiths, K. and P. Setlow (2009). "Effects of modification of membrane lipid composition on *Bacillus subtilis* sporulation and spore properties." *Journal of Applied Microbiology* 106(6): 2064-2078.

Kuimova, M. K. (2012). "Mapping viscosity in cells using molecular rotors." *Physical Chemistry Chemical Physics* 14(37): 12671-12686.

Loison P., A. Hosny N., Gervais P., Champion D., K. Kuimova M., Perrier-Cornet JM. 2013 Direct Investigation of viscosity of an atypical inner membrane of *Bacillus* spores: a molecular rotor/FLIM study. *BBA Biomembranes* 1828(11), 2436-2443.

Altération de produits carnés pasteurisés par les clostridies psychrotrophes

Stella Planchon, **Stéphane André**

CTCPA, Unité de microbiologie d'Expertise dans la Maitrise du Risque Industriel en Thermorésistants Sporulés, CTCPA, F-84911 Avignon

Certaines bactéries psychrotrophes ou psychrophiles ont été mises en évidence initialement dans les viandes fraîches, mais cette problématique concerne de façon large les produits réfrigérés dont la durée de conservation est de plusieurs semaines ou plus même après un traitement de pasteurisation. Dans ce cas, ce sont souvent des flores sporulantes telle que des espèces du genre *Clostridium* qui sont responsables de l'altération de produits carnés.

Depuis plus de 10 ans, le CTCPA travaille avec les industriels sur la caractérisation de la flore d'altération de produits carnés. Pour ce faire, il a d'abord été nécessaire d'identifier les espèces et d'établir des fréquences d'occurrence. Par exemple, l'espèce *C. algidicarnis* est très ubiquitaire alors que l'espèce *C. putrefaciens* n'a jamais été isolée des échantillons analysés.

Pour expliquer la présence de ces spores dans les produits malgré des traitements relativement intenses de pasteurisation, il convient de mieux connaître l'impact de la matrice alimentaire sur la thermorésistance. Les paramètres D et z des spores de plusieurs souches de Clostridies psychrotrophes ont été déterminés en tampon ou dans la matrice carnée, cette dernière ayant un rôle protecteur important qui augmente significativement la thermorésistance des spores.

En parallèle, pour mieux maîtriser cette contamination, il est nécessaire de déterminer l'origine de la contamination du produit par les spores sur les lignes industrielles. Pour ce faire, il est nécessaire à la fois de développer des outils de biologie moléculaires permettant une identification rapide mais aussi d'effectuer des prélèvements sur lignes. Pour le développement de nouvelles amorces de PCR, un séquençage complet du génome de 6 isolats de *Clostridium* a été effectué. L'écologie microbienne de ligne a été suivie par microbiologie pasteurienne : la flore lactique, les flores anaérobies, sous forme végétative et sporulée, incubées à 12 et 25°C ainsi que la flore totale suivie par métagénomique. Les échantillons ont été prélevés juste après l'abattoir, puis lors de la transformation avant la pasteurisation et enfin après pasteurisation, au cours du stockage des produits finis, suite au reconditionnement des produits pasteurisés.

Effets combinés du froid, de l'anaérobiose et de bas pH sur les *Bacillus cereus* Groupe VI (*Bacillus weihenstephanensis*)

Alizée Guérin, Claire Dargaignaratz, Véronique Broussolle, Thierry Clavel, Christophe Nguyen-the

INRA, Avignon University, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

L'amélioration de la nutrition des personnes âgées devient un enjeu de plus en plus important dans notre société au vu du vieillissement de la population. Le but du projet FP7-OPTIFEL est de créer de nouveaux produits alimentaires à base de fruits et légumes, complétés par des ajouts nutritifs spécifiques pour palier à leurs déficiences nutritionnelles. La sécurité microbiologique de tels produits est primordiale en raison du risque élevé de maladies transmises par la nourriture. La majorité des bactéries pathogènes peut être éliminée pendant le processus de pasteurisation, à l'exception des spores thermorésistantes de *Bacillus cereus*, qui contaminent souvent les produits alimentaires d'origine végétale. *B. cereus* représentait une cause importante de toxi-infections alimentaires collectives en France en 2012 et la première pour les instituts médicaux sociaux (INVS, 2012). La compréhension du comportement de cette bactérie pendant le cycle de vie du produit, notamment lors du stockage au froid est essentielle.

Deux souches psychrotrophes appartenant au groupes phylogénétiques VI de *B. cereus* (Guinebretière et al., 2008), i.e. *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 et *B. cereus* ADRIA I21, ont été étudiées. Les effets combinés de basses températures (8°C et 10°C), de pH allant de 5,0 à 7,0 (à 7 pH différents), et de présence ou d'absence d'oxygène sur la capacité de croissance de ces deux souches, ont été déterminés en Brain Heart Infusion (BHI). Des croissances ont été observées en absence d'oxygène, à 10°C et à un pH \geq 5,7 avec des taux de croissance (μ_{\max} en h⁻¹) similaire (environ 0,12 h⁻¹) à celui obtenu en présence d'oxygène. Aucune croissance, n'a été observée en absence d'oxygène à 8°C à tous les pH testés en BHI ainsi que dans un bouillon de carotte à pH 6,5. Cependant l'ajout de phosphatidylcholine (125 µg/ml) dans du BHI à pH 7,0 permet d'observer une croissance à 8°C sans oxygène. En présence d'oxygène la croissance a été observée aux deux températures à pH \geq 5,4 et un phénomène de survie est observé à un pH de 5,3. De plus, le N_{max} atteint 8,0 log UFC/ml en présence d'oxygène mais seulement 6,0 log d'UFC/ml en absence d'oxygène. Un emballage des produits alimentaires sous vide avec une conservation à une température inférieure à 8°C semble préférable pour limiter la croissance de ces souches bactériennes.

Ces données mettent en évidence les capacités de croissance et de survie de ces deux souches durant l'étape de réfrigération et de stockage au froid pour l'élaboration de futurs produits alimentaires. La combinaison de ces trois facteurs (absence d'oxygène, basse température et bas pH) peut être un bon moyen de contrôler et minimiser la possible croissance de *B. cereus* dans les produits alimentaires.

Le projet OPTIFEL a bénéficié d'une aide financière du 7ème programme cadre de l'Union Européenne pour la recherche et l'innovation technologique, sous le numéro 311754

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.

Hétérogénéité de la reprise d'activité des spores suite à un traitement thermique

Trunet C.^{1,2}, Mtimet N.², Mathot A-G.², Postollec F.¹, Leguerinel I.², Sohier D.¹, Couvert O.², Carlin F.³, Coroller L.²

¹ ADRIA Food safety and quality unit, UMT14.01 SPORE-RISK, Quimper, France

² Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UMT SPORE-RISK, IFR148 ScInBioS, 6 rue de l'Université, F-29334 Quimper, France

³ INRA, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, Site Agroparc, F-84000, Avignon, France

Les bactéries sporulées sont une cause majeure d'intoxication et d'altération d'aliment. Leur présence représente un danger pour les aliments transformés ou les ingrédients (plats cuisinés, poudre de lait, épices). En effet, elles sont capables de résister aux procédés assainissants comme le séchage, les traitements thermiques ou les traitements chimiques. Certaines spores peuvent ainsi survivre aux traitements et se développer. Afin de quantifier l'impact des conditions de sporulation, de l'intensité du traitement thermique et des conditions de recouvrement (*i.e.* les conditions *pre-*, *per-* et *post-traitement*) sur les différents stades du recouvrement, des cinétiques de germination et de reprise d'activité métabolique ont été réalisées par cytométrie en flux. Les différents stades du recouvrement correspondent aux sous-populations observées au cours de ce processus : spores réfringentes, spores germées, cellules en émergence, cellules végétatives. Les spores de *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 et de *Bacillus licheniformis* Ad978 ont été obtenues à la température optimale et une température sous-optimale de croissance. Après un traitement thermique permettant une réduction 90% de la population initiale, le recouvrement des spores en milieu nutritif a été suivi pour différents pH et différentes températures distribuées sur le domaine de croissance (5-40°C pour *B. weihenstephanensis*, 15-60°C pour *B. licheniformis* et pH 4.0-8.0 pour les deux souches). Le passage d'un stade physiologique à un autre a pu être suivi grâce à des critères de taille et de d'intensité de fluorescence des cellules marquées avec du Syto9 (indicateur de la perméabilité des spores) et de 5-Cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride ou CTC (indicateur de l'activité respiratoire). Le passage par les stades physiologiques est impacté différemment par les conditions de sporulation, l'intensité du traitement thermique et les conditions de recouvrement. Dans les conditions optimales (de sporulation et de recouvrement), la plupart des cellules ont évolué rapidement vers la multiplication. Alors que dans des conditions sub-optimales (de sporulation ou de recouvrement), le processus de recouvrement est plus lent et une plus faible proportion de cellules était capable de parvenir jusqu'au stade de cellule végétative active.

Même si une large proportion des spores traitées thermiquement est capable de germer voire de donner une cellule végétative, seulement un faible nombre d'entre elles est capable de retrouver une activité métabolique et de se multiplier. Le traitement thermique impacte donc les spores à différents niveaux et ces dernières peuvent alors être bloquées sous forme de spores réfringentes, de spores germées ou de cellules végétatives incapables de se multiplier.

La cytométrie en flux permet de quantifier l'impact de la sporulation, du traitement thermique et des conditions de recouvrement sur les différents stades observables durant le recouvrement. Elle permet l'analyse d'un grand nombre d'événements (plus de 200000) au cours du temps ainsi que la discrimination du ou des stade(s) impacté(s) par les conditions environnementales *pre-*, *per-* et *post-traitement*.

Optimisation des barèmes thermiques de produits susceptibles d'être contaminés par des bactéries sporulées : apport de l'appréciation quantitative du risque

Membré, J.-M.

INRA, UMR1014 Secalim, Oniris La Chantrerie, 44307 Nantes

Les produits non-acides stables à température ambiante sont soumis à un traitement thermique qui les rend sains et sûrs. Pour les procédés de type batch (par ex. préparation de boîtes de conserve), la première étape du process consiste à placer les denrées dans un conditionnement totalement étanche et stérile à toute contamination extérieure. Les aliments sont ensuite chauffés à une température supérieure à 100°C dans un autoclave, pendant une durée variable selon les aliments. Pour les procédés continus de type UHT (par ex. préparation de soupe ou de lait), le produit est tout d'abord chauffé à une température supérieure à 130°C pendant plusieurs secondes avant d'être conditionné aseptiquement. Ces procédés, et les barèmes thermiques associés, bien que connus depuis des dizaines, voire des centaines, d'années, sont encore assez empiriques. En ce qui concerne, les pathogènes, le danger microbiologique principal est *Clostridium botulinum*, bactérie sporulée, pour laquelle traditionnellement un barème équivalent de 121°C pendant 3 min est appliqué (équivalence calculée avec un Z de 10°C). Cependant, des bactéries d'altération telles que *Geobacillus stearothermophilus* sont également capables de résister à de très hauts traitements thermiques, il est donc nécessaire également de les contrôler pour assurer la stabilité du produit.

Depuis les années 90, les travaux de recherche en modélisation de cinétique d'inactivation, en particulier sur l'effet des facteurs liés à la formulation du produit, voire l'effet de la matrice alimentaire elle-même, ont permis de progresser vers la recherche de barèmes thermiques plus optimaux, qui garantissent à la fois la stabilité du produit et la sécurité du consommateur tout en préservant la qualité organoleptique et nutritionnelle du produit. Plus récemment, l'évolution de la gestion de la sécurité des aliments vers un contrôle du risque (et non plus une analyse de danger) permettent encore de progresser vers cette recherche d'optimalité. En particulier l'appréciation quantitative du risque qui analyse la chaîne de transformation du produit dans son ensemble (de la fourche à la fourchette), à l'aide d'outils mathématiques et statistiques (calculs de probabilité, simulation, analyse de scénario, ... etc) permet de revisiter, voire de challenger, des traitements thermiques bien établis.

Cette communication présentera les concepts liés à l'appréciation quantitative du risque avant d'en illustrer ses applications potentielles, via deux exemples. Le premier avec un procédé de type batch, le second avec un procédé continu.

Diao, M.M., André, S., Membré, J.-M., 2014. Meta-analysis of D-values of proteolytic *Clostridium botulinum* and its surrogate strain *Clostridium sporogenes* PA 3679. *International Journal of Food Microbiology* 174, 23-30.

Membré, J.-M. 2014. HAZARD APPRAISAL (HACCP) | Establishment of performance criteria. In: Batt, C., Tortorello, M.-L., (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2nd Edition. Elsevier, Amsterdam.

Pujol, L., Albert, I., Johnson, N.B., Membré, J.-M., 2013. Potential application of quantitative microbiological risk assessment techniques to an aseptic-UHT process in the food industry. *International Journal of Food Microbiology* 162, 283-296.

Un nouveau modèle socio-économique chez *Bacillus thuringiensis* : Diviser le travail pour mieux sporuler

Didier Lereclus

INRA, UMR1319 Micalis, 78350 Jouy-en-Josas, France

Bacillus thuringiensis (Bt) diffère des autres espèces du groupe *Bacillus cereus* par sa capacité à produire des inclusions cristallines composées de toxines insecticides, les protéines Cry. Ces inclusions sont produites dans la cellule mère au cours de la sporulation de Bt et sont libérées de la spore à la fin du processus. Elles peuvent alors être considérées comme un bien public pouvant être utilisé par d'autres bactéries (appelées « cheaters ») susceptibles d'en tirer profit pour leur propre développement. Une fois que les cristaux protéiques ont été ingérés par des insectes sensibles, ils sont solubilisés, puis les protoxines sont activées par les protéases contenues dans le tube digestif. Les fractions toxiques des protéines Cry vont ensuite se fixer sur des récepteurs spécifiques localisés à la surface des cellules épithéliales de l'intestin où elles vont créer des pores et causer la mort de l'insecte. La très forte production de protéines Cry par Bt résulte essentiellement de la forte transcription des gènes *cry*, de la stabilité de leurs transcrits et de la cristallisation des protéines. Ces processus coïncident généralement avec la sporulation et sont régulés par différents facteurs agissant principalement au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-translationnel.

Une souche de Bt, LM1212, présentant un phénotype unique a récemment été décrite (Deng et al., 2015) : la formation de cristaux ne se produit pas dans les cellules productrices de spores, mais dans une sous-population de cellules non sporulantes (appelées productrices de cristal) qui lysent après la production du corps d'inclusion constitué par les protéines Cry. Une telle propriété n'avait jamais été étudiée chez Bt, malgré le nombre considérable de souches de Bt identifiées au cours des dernières décennies. Les résultats obtenus par Deng et coll. (2015) suggèrent qu'un nouveau mécanisme de régulation est responsable de la production des protéines Cry exclusivement dans la sous-population de cellules non sporulantes. Nous avons fait l'hypothèse qu'un tel système de régulation devait permettre aux bactéries d'être plus compétitives dans des infections mixtes comprenant des « cheaters » pouvant indûment profiter des protéines Cry produites par Bt. En effet, la souche LM1212 produit plus de spores qu'une souche classique de Bt et rivalise mieux avec des bactéries qui ne produisent pas de cristaux. Cette division du travail offre donc un avantage adaptatif qui se traduit par une meilleure production de spores.

Deng et al., 2015. Division of labour and terminal differentiation in a novel *Bacillus thuringiensis* strain. *ISME J.* 9: 286-296.

Les *Bacillus* spp. au service de la culture de pommes de terre

Caulier, S.^{1,2}, Gillis, A.², Legrève, A.¹, Bragard, C.¹, Mahillon, J.²

¹ Laboratoire de Phytopathologie, Earth and Life Institute, UCL, Croix du Sud, 2 - L7.05.03, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique

² Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Environnementale, Earth and Life Institute, UCL, Croix du Sud, 2 - L7.05.12, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique

Depuis près de 50 ans, certaines bactéries sporulantes du genre *Bacillus* (e.g. *Bacillus thuringiensis* ou *Bacillus sphaericus*) sont bien connues pour leurs propriétés insecticides. Récemment, de nouveaux produits phytosanitaires à base de *Bacillus* ont été développés, tels que: Sérénade® (*Bacillus subtilis* QST173, BAYER), Sonata® (*Bacillus pumilus* QST2808, BAYER) ou Rhizocell® (*Bacillus amyloliquefaciens* IT45, Lallemand Plant Care). Les *Bacillus* ont en effet de nombreuses propriétés qui intéressent le monde agricole: ils sont à la fois capables de stimuler la croissance et les défenses naturelles des plantes mais aussi d'entrer en compétition avec les pathogènes. De plus, ils produisent une large gamme de métabolites secondaires bactéricides et fongicides qui en font un atout précieux dans la lutte contre les phytopathogènes. L'exploitation de ces différents mécanismes d'actions offre une alternative crédible à l'utilisation de pesticides de synthèse pour lesquels l'Europe est de plus en plus restrictive. Nos recherches s'inscrivent dans ce contexte et ont pour objectif la mise en œuvre d'un biocontrôle de phytopathogènes basé sur des cocktails de rhizobactéries et bactéries du sol issues des genres *Pseudomonas* et *Bacillus*.

Dans le cas des *Bacillus*, trois grandes voies de synthèse de composés antagonistes ont été décrites: la voie des peptides ribosomiques (RSP), des peptides non-ribosomiques (NRSP) et des polycétides (PCS). Les composés ribosomiques ont un spectre d'action souvent restreint aux espèces proches de l'antagoniste, à l'inverse des peptides non-ribosomiques et des polycétides. L'étude des NRSP et PCS a mis en évidence leur implication à plusieurs niveaux dans les interactions pathogène-hôte-*Bacillus* bénéfiques. Identifier la structure, caractériser les régions du génome associées à la biosynthèse de ces nouveaux métabolites et déterminer leurs modes d'action devraient permettre de mieux appréhender la complexité du biocontrôle exercé par le genre *Bacillus*.

Aujourd'hui, une cinquantaine de *Bacillus* spp. actifs contre quatre des principaux pathogènes de la pomme de terre a été isolée: *Phytophthora infestans*, *Streptomyces scabies*, *Fusarium solani* et *Pectobacterium carotovorum*. Plusieurs tests PCR associés à des tests de caractérisation classiques ont permis d'établir le spectre de molécules produites par nos souches et de réaliser un second criblage. Les résultats obtenus jusqu'ici indiquent que parmi nos souches, plusieurs sont capables de produire individuellement une large gamme des composés antagonistes connus. Les résultats indiquent aussi qu'un nombre important des souches de *Bacillus* spp. actifs contre le mildiou sont potentiellement producteurs de métabolites inédits. Au-delà de ces composés organiques solubles ou diffusibles, certaines de nos souches émettent des composés volatiles capables d'inhiber fortement la croissance mycélienne de *P. infestans*. L'identification de ces métabolites solubles et volatiles est en cours par chromatographie couplée à de la spectrométrie de masse. D'autres tests d'antagonismes sont aussi mis en œuvre pour vérifier l'activité antifongique des composés isolés. A terme, les déterminants génétiques codants pour ces métabolites antifongiques inédits actifs contre *Phytophthora infestans* seront identifiés/confirmés par la génération de mutants knock-out.

Cell Differentiation in a *Bacillus thuringiensis* Population during Planktonic Growth, Biofilm Formation, and Host Infection

Verplaetse E., Slamti L., Gohar M., Lereclus D.

INRA, UMR1319 Micalis, La Minière Guyancourt, F-78280, France; AgroParisTech, UMR1319 Micalis, F-78350, Jouy-en-Josas, France

Bacillus thuringiensis (Bt) is armed to complete a full cycle in its insect host. During infection, virulence factors are expressed under the control of the quorum sensor PlcR to kill the host. After the host's death, the quorum sensor NprR controls a necrotrophic lifestyle, allowing the vegetative cells to use the insect cadaver as a bioincubator and to survive. Only a part of the Bt population sporulates in the insect cadaver, and the precise composition of the whole population and its evolution over time are unknown. Using fluorescent reporters to record gene expression at the single-cell level, we have determined the differentiation course of a Bt population and explored the lineage existing among virulent, necrotrophic, and sporulating cells. The dynamics of cell differentiation were monitored during growth in homogenized medium, biofilm formation, and colonization of insect larvae. We demonstrated that in the insect host and in planktonic culture in rich medium, the virulence, necrotrophism, and sporulation regulators are successively activated in the same cell. In contrast, in biofilms, activation of PlcR is dispensable for NprR activation and we observed a greater heterogeneity than under the other two growth conditions. We also showed that sporulating cells arise almost exclusively from necrotrophic cells. In biofilm and in the insect cadaver, we identified an as-yet-uncharacterized category of cells that do not express any of the reporters used. Overall, we showed that PlcR, NprR, and Spo0Aact as interconnected integrators to allow finely tuned adaptation of the pathogen to its environment.

Rôle et régulation du gène codant pour l'hélicase à ARN CshC de *Bacillus cereus*

Stéphanie Chamot, Christelle Bressuire et Véronique Broussolle

INRA, Avignon Université, UMR 408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France.

Bacillus cereus est une bactérie ubiquitaire très présente dans les sols sous forme de spores. On la retrouve ainsi fréquemment sur les végétaux et dans les plats cuisinés à base de légumes. Ces matrices alimentaires sont favorables à la germination des spores, à la reprise de croissance et la synthèse de toxines, pouvant conduire à des intoxications alimentaires. La maîtrise de la qualité microbiologique de ces aliments passe souvent par la réfrigération. *B. cereus* est capable de s'adapter et de se multiplier aux basses températures, en mettant en place différentes réponses cellulaires au stress froid (Brillard et Broussolle, 2012).

Nous nous sommes intéressés au rôle dans l'adaptation au froid de l'hélicase à ARN CshC chez *B. cereus* ATCC 14579, en construisant et en étudiant un mutant de délétion du gène *cshC*. Un retard de croissance de la souche $\Delta cshC$ par rapport à la souche parentale est observé à 20°C, tandis qu'aucune différence de croissance n'apparaît à 37°C.

Le gène *cshC* étant situé dans un locus de 6 gènes, des fusions transcriptionnelles ont été réalisées afin de déterminer la région promotrice fonctionnelle. Les résultats montrent que cette région est éloignée du gène *cshC* et suggèrent une structure opéronique. La présence d'un transcrit de 3 gènes a été mise en évidence par RT-PCR avec des ARN extraits de culture à 37°C. Le +1 de transcription, déterminé par RACE-PCR, est identique, quelle que soit la température de croissance et une analyse *in silico* de cette région promotrice a révélé la présence d'éléments putatifs de régulation de type cold box, situés en amont du site d'initiation de la transcription. Le niveau d'expression du promoteur du gène *cshC* est plus élevé à 20°C qu'à 37°C dans la souche parentale, et est quasi nulle dans la souche mutante, quelle que soit la température de croissance, suggérant de façon intéressante que la protéine CshC est impliquée dans la régulation de l'opéron.

L'hélicase à ARN CshC présente une forte homologie de séquence avec la protéine SrmB d'*Escherichia coli*, impliquée dans la biogénèse des ribosomes à basse température. L'apport en *trans* d'une copie de *cshC* de *B. cereus* corrige le phénotype cryosensible du mutant $\Delta srmB$ d'*E. coli*, ce qui suggère qu'il pourrait exister une homologie fonctionnelle entre ces deux protéines.

Brillard J. and V. Broussolle. (2012) Mechanisms Involved in Low-temperature Adaptation in *Bacillus cereus*. In Stress Response in Microbiology. Ed JM Requena, Caister Academic Press, Madrid, Spain, pp 125-146

Suivi des interactions entre espèces et étude de la robustesse d'un biofilm quadri-espèces contenant *Bacillus cereus*

A. Baliarda, M. Winkler, S. Aymerich et C.R. Tinsley

UMR1319 Micalis, AgroParisTech, INRA, F-78850 Thiverval-Grignon

Le mode de vie de *Bacillus cereus* en biofilm et sa capacité à sporuler sont probablement à l'origine de la persistance de ce pathogène opportuniste dans les équipements de l'industrie agro-alimentaire (1, 2). En effet, les bactéries qui composent un biofilm résistent pour partie à l'action des détergents et des désinfectants employés lors des procédures de nettoyage-désinfection.

Nous avons mis au point un système expérimental de biofilm multi-espèces contenant *B. cereus* à partir d'une communauté bactérienne issue d'un biofilm d'encrassement d'un circuit de pasteurisation de lait (3). L'analyse des variations d'effectifs à l'équilibre en fonction des conditions de croissance du biofilm a permis de tester la robustesse du système. Ce dernier est apparu résistant à un certain nombre de perturbations suggérant l'existence d'un réseau d'interactions fort entre les espèces en présence. Par omission successive d'une ou de plusieurs espèces de cette communauté nous avons montré que *B. cereus* est impliqué dans une interaction négative (de type amensalisme) avec un autre membre de la communauté.

1. Sharma M, Anand SK. 2002. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. *Food Control* 13:469–477.
2. V. C. Salustiano NJA. 2009. Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. *Food Control* 20:439–442.
3. Mettler E, Carpentier B. 1997. Localisation, dénombrement et identification de la contamination microbienne après nettoyage de joints en EPDM d'un circuit de pasteurisation de l'industrie laitière. *Le Lait* 77:489–503.

Genetic regulation of kurstakin, a biosurfactant produced by *Bacillus thuringiensis*

Sébastien Gélis-Jeanvoine^{1,2}, Thibault Caradec³, Stéphane Perchat^{1,2}, Michel Gohar^{1,2}, Philippe Jacques³,
Didier Lereclus^{1,2} and Leyla Slamti^{1,2}

¹INRA, UMR1319 Micalis, F-78352 Jouy-en-Josas, France

²AgroparisTech, UMR Micalis, F-78352 Jouy-en-Josas, France

³ProBioGEM team, Charles Viollette Institute, University Lille1, 59665 Villeneuve d'Ascq cedex, France

Bacteria of the *Bacillus* genus are able to synthesize several families of lipopeptides. These small molecules are the product of non-ribosomal peptide synthetases. In 2000, it was found that *Bacillus thuringiensis*, an entomopathogen bacterium of the *Bacillus cereus* group, produced a previously unknown lipopeptide: kurstakin. In our model strain, *B. thuringiensis* strain 407 (Bt407), the *krs* locus, responsible for kurstakin production, spans over 30 kb and comprises 6 genes predicted to encode a permease, 3 synthetases, a phosphopantetheine transferase and a thioesterase potentially involved in the turn-over of the synthetases. Genomic analyses revealed that the *krs* locus is found in half the completely sequenced *B. thuringiensis* strains and in a few *B. cereus* strains, but is absent in *B. anthracis*. Due to their surfactant properties, lipopeptides could play several physiological roles. Their use in various industries led to extensive studies of their structures and properties, however their physiological role remains largely unknown. We notably showed that kurstakin was required for proper biofilm formation. Previous microarray experiments showed that *krs* transcription was positively controlled by the necrotrophism quorum-sensor NprR. To fully understand transcription of this locus, we performed RT-PCR experiments and showed that the genes of the *krs* locus formed an operon. We defined the transcription start site upstream the first gene using primer extension experiments. Following *krs* transcription at the population and single-cell levels in multiple culture conditions (shaken or static media and insect larva) allowed us to show a strong condition-dependent transcription pattern, indicating that production of kurstakin is probably subject to environmental regulation. Consistent with this idea, we found *krs* transcription to be regulated by two additional master regulators, Spo0A and SinR, suggesting that kurstakin synthesis is fine-tuned by integrating multiple signals.

Adaptation de *Bacillus cereus* aux variations de potentiel d'oxydo-réduction

Dedieu, L., Lelay, J. and Schmitt, P.

Université d'Avignon, INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, Avignon

Bacillus cereus est la deuxième cause de toxi-infection alimentaire en France (InVS, 2012). Cela est principalement dû à l'existence de formes résistantes appelées spores. En parallèle, depuis plusieurs années, le consommateur recherche des produits exempts de traitement thermique ou acidifiant, obligeant les professionnels de la sécurité alimentaire à rechercher de nouvelles méthodes pour contrôler le développement microbien. Le contrôle du potentiel d'oxydo-réduction (E_h) pourrait être une nouvelle barrière physico-chimique, permettant ce contrôle tout en préservant les qualités nutritionnelles et organoleptiques des produits. L' E_h n'est pas pris en compte par la modélisation du risque microbiologique en industrie et est rarement étudié en physiologie microbienne. Cependant, quelques études montrent que les variations d' E_h impactent le métabolisme des acides gras et du glucose, ou encore la production de toxines bactériennes comme celles de *B. cereus* (Zigha *et al.*, 2006). Ce microorganisme est capable de s'adapter aux variations de E_h et de pH rencontrées le long du tractus digestif (Moriarty-Craige and Jones, 2004, Rosenfeld *et al.*, 2005) ou lors des procédés de transformation alimentaire (Clavel *et al.*, 2004, Derossi *et al.*, 2011). En plus de s'adapter aux variations de E_h , *B. cereus* est également capable de réduire son milieu de culture. Nos travaux de recherche s'articulent autour de 2 axes : (i) la capacité de *B. cereus* à modifier le E_h du milieu, et (ii) l'adaptation de *B. cereus* à des variations de E_h .

L'étude de l'adaptation de *B. cereus* montre non seulement une survie au choc acide qui est augmentée sous atmosphères à E_h réducteurs par rapport aux E_h oxydants, mais aussi une réorientation majeure du métabolisme de *B. cereus* exposé à pH acide, de la fermentation des acides mixtes vers la fermentation butanediolique. Réorientation jouant vraisemblablement un rôle important dans la résistance au stress acide. Cette réorientation observée à pH acide et en anaérobiose ne montre pas de production d'acétoïne et aucune activité acétoïne réductase n'est mesurée. En condition de micro-aérophile, nous avons montré que *B. cereus* produisait de l'acétoïne. L'acétoïne réductase, enzyme convertissant le butanediol en acétoïne, serait donc régulée de manière indépendante et sera étudiée par la suite.

L'étude de la capacité de *B. cereus* à modifier le E_h du milieu nous a montré que des groupements thiols exofaciaux sont à l'origine du pouvoir réducteur de cette bactérie. De plus, un test de criblage est en cours d'optimisation. Les premiers résultats montrent que la réduction de sels de tetrazolium incorporés dans le milieu produit une réaction colorée exploitable pour un crible sur milieu gélosé. Nous disposons, au laboratoire, d'une banque de mutants de *B. cereus* qui sera prochainement criblée sur ce principe. Ce test devrait permettre de définir les déterminants génétiques impliqués dans cette activité réductrice.

En résumé, *B. cereus* est une bactérie modèle pour l'étude du pouvoir réducteur et de l'adaptation bactérienne aux variations du E_h combinées à d'autres stress. Nous avons mis au point une technique de suivi fiable du E_h et de son évolution dans différents milieux et montré des effets croisés entre des variations de pH ou d'atmosphère et celle du E_h . Ces résultats ouvrent la voie à de nombreuses pistes de recherches et pourraient conduire à l'amélioration des modèles de prévision du risque microbiologique dans l'aliment par ajout du facteur E_h .

Quorum sensing in *Bacillus cereus* in relation with cysteine metabolism and oxidative stress response

Eugénie Huillet¹, Isabelle Martin-Verstraete², and Michel Gohar¹ and Didier Lereclus¹

- 1 INRA, UMR1319 Micalis, La Minière Guyancourt, F-78280, France; AgroParisTech, UMR1319 Micalis, F-78350, Jouy-en-Josas, France
- 2 Laboratoire de Pathogénèse des Bactéries Anaérobies, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, and Université Paris 7-Denis Diderot, 75013 Paris, France

A number of peptide-mediated quorum sensing (QS) systems regulate important biological functions in bacteria of the *Bacillus cereus* group. Sporulation, virulence and biofilm formation are controlled by such systems in these bacteria. PapR, a secreted heptapeptide, activates PlcR, the main transcriptional regulator of virulence in *B. thuringiensis* and *B. cereus*. We recently found that PlcRa, a PlcR paralogue, also works in QS and is involved in oxidative stress response and cysteine metabolism during the early stationary phase of bacterial growth. Notably, we have reported that PlcRa activates the expression of several genes involved in the pathway of cysteine synthesis from methionine including the S-adenosylmethionine (SAM) recycling pathway. This transcriptional control of SAM recycling pathway by PlcRa impacts another QS, the autoinducer-2 (AI-2) system. AI-2 is a signal metabolic molecule produced by LuxS, a central metabolic enzyme involved in SAM recycling, found in many bacterial species and thus proposed to enable interspecies communication. We have reported that *B. cereus* synthesizes and recognizes AI-2 as an extracellular signal. Most particularly, we have shown that AI-2 inhibits biofilm formation in a concentration-dependent manner. In this presentation, we provide an overview of these two QS systems in *B.cereus* species with the description of AI-2 connection. We highlight how CymR regulon -involved in the global regulation of gene expression in response to cysteine availability- together with PlcRa system is important for AI-2 production and present the role of PlcRa in oxidative stress response.

Le biofilm de *Clostridium difficile*

Véronique Pantaléon¹, Anna Philibertine Soavelomandroso¹, Sylvie Bouttier¹, Romain Briandet^{2,3}, Bryan Roxas⁴, Michele Chu⁴, Anne Collignon¹, Claire Janoir¹, Gayatri Vedantam^{4,5} and
Thomas Candela¹

¹ EA4043, Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud, Châtenay-Malabry, France.

² INRA, UMR1319 Micalis, Jouy-en-Josas France.

³ AgroParisTech, UMR Micalis, Massy, France.

C. difficile est une bactérie à Gram positif sporulant anaérobie stricte. La spore est retrouvée dans l'environnement et permet la contamination d'un hôte. La présence de *C. difficile* chez l'Homme peut être asymptomatique ou peut entraîner, en cas de la perte de l'effet barrière du microbiote intestinal, différentes pathologies, allant de la diarrhée simple jusqu'à la colite pseudomembraneuse. Un des problèmes lié aux infections à *C. difficile* est la survenue fréquente de récurrences. À ce jour, la contribution des biofilms au développement des infections à *C. difficile* ou de sa persistance dans l'intestin n'est pas encore définie. Cependant, *C. difficile* forme des biofilms in vitro.

Nous avons étudié différentes souches de *C. difficile* et nous les avons classées pour leur capacité à former des petits biofilms, des biofilms intermédiaires ou des biofilms épais. Il est à noter que toutes les souches non mobiles sont retrouvées dans le groupe « petits biofilms ». Parmi les souches testées, la souche modèle 630E fait partie du groupe "petit biofilm". Dans cette souche, un mutant du gène codant la protéase Cwp84 à l'origine de la maturation de la couche S de *C. difficile* forme un biofilm épais. Nos résultats privilégient deux hypothèses afin d'expliquer ce phénotype, une impliquant l'abondance de SlpA non clivée et l'autre proposant une ou plusieurs autres cibles pour la protéase Cwp84.

Liste des participants

Nom de famille	Prénom	email contact	Entreprise/Institution	Ville	Pays
Afiri	Malika	drafiri@yahoo.fr	CHU Nedir Mohamed	Tizi-ouzou	Algérie
Andre	Stéphane	sandre@ctcpa.org	Ctcpa	Avignon	France
Baliarda	Aurélie	Aurelie.Baliarda@grignon.inra.fr	Micalis	Thiverval-Grignon	France
Bidnenko	Elena	jj-micalis-carstedu@listes.inra.fr		Jouy en Josas	France
Bidnenko	Vladimir	vladimir.bidnenko@jouy.inra.fr		Jouy en Josas	France
Bolotine	Alexandre	alexandre.bolotine@jouy.inra.fr	INRA	Jouy en Josas	France
Bressuire-isoard	Christelle	christelle.bressuire@paca.inra.fr	INRA	Avignon	France
Broussolle	Veronique	veronique.broussolle@avignon.inra.fr	INRA UMR 408 SQPOV	Avignon	France
Candela	Thomas	thomas.candela@u-psud.fr	Université Paris Sud, EA4043 UBAPS	Chatenay Malabry	France
Carlin	Frédéric	frederic.carlin@avignon.inra.fr	Inra	Avignon	France
Castiaux	Virginie	virginie.castiaux@uclouvain.be	UCL	Louvain-la-Neuve	Belgique
Caulier	Simon	simon.caulier@student.uclouvain.be	UCL	Louvain-la-Neuve	Belgique
Chamot	Stéphanie	stephanie.chamot@avignon.inra.fr	INRA centre de recherche PACA	AVIGNON	France
Clavel	Thierry	thierry.clavel@univ-avignon.fr	Université d'Avignon	Avignon	France
Consentino	Laurent	lconsentino2704@gmail.com	INRA	Jouy en Josas	France
Couvert	Olivier	olivier.couvert@univ-brest.fr	LUBEM	QUIMPER	France
Dargaignaratz	claire	claire.dargaignaratz@avignon.inra.fr	INRA	AVIGNON	France
Dedieu	Luc	luc.dedieu@univ-avignon.fr	INRA, Univ Avignon, UMR 408 SQPOV	Avignon	France
Dervyn	Rozenn	rozenn.dervyn@jouy.inra.fr	INRA	Jouy en Josas	France
Doublet	Bénédicte	benedicte.doublet@avignon.inra.fr	INRA	Roussillon	France
Dubois	Thomas	thomas.dubois@pasteur.fr	INSTITUT PASTEUR	PARIS	France
Duport	Catherine	duport@avignon.inra.fr	Umr Inra-Universite	Avignon	France
Dupuy	Bruno	bruno.dupuy@pasteur.fr	Institut Pasteur	Paris	France
El Chamy	Laure	laure.chamy@usj.edu.lb	Faculté des Sciences- Université Saint-Joseph de Beyrouth	Beyrouth	Liban
Esposito	Marie-paule	marie-paule.esposito@paca.inra.fr	INRA	Sophia Antipolis	France
Fach	Patrick	patrick.fach@anses.fr	ANSES Laboratoire de Sécurité des Aliments	Maisons-Alfort	France
Faille	Christine	christine.faille@lille.inra.fr	INRA, UMR8207	Villeneuve d'Ascq	France
Firmesse	Olivier	Olivier.firmesse@anses.fr	Anses	Maisons-Alfort Cedex	France
Gagnier Oriol	Stéphanie	gagnier@avignon.inra.fr	INRA	Avignon	France
Gauvry	Emilie	Emilie.Gauvry@univ-brest.fr	LUBEM	Quimper	France
Gélis-jeanvoine	Sébastien	sgelis@jouy.inra.fr	INRA	Jouy-en-Josas	France
Gillis	Annika	annika.gillis@uclouvain.be	UCL	Louvain-la-Neuve	Belgique
Gilois	Nathalie	nathalie.gilois@jouy.inra.fr	INRA	Jouy en Josas	France
Girault	Guillaume	guillaume.girault@anses.fr	Anses	Maisons-Alfort	France
Glasset	Benjamin	benjamin.glasset@anses.fr	Anses	MAISONS ALFORT	France
Gohar	Michel	michel.gohar@jouy.inra.fr	INRA	Jouy en Josas	France
Guérin	Alizée	alizee.guerin@paca.inra.fr	INRA	Avignon	France
Henriques	Adriano	aoh@itqb.unl.pt	Microbial Development lab, ITQB	Oeiras	Portugal
Herbin	Sabine	sabine.herbin@anses.fr	Anses	Maisons-Alfort Cedex	France
Huchet	Veronique	veronique.huchet@adria.tm.fr	ADRIA	quimper	France
Huillet	Eugénie	eugenie.huillet@jouy.inra.fr	INRA	Jouy en Josas	France
Issac	Stéphanie	stephanie.isaac@jouy.inra.fr	INRA	Jouy en Josas	France
Jan	Sophie	sophie.jan@agrocampus-ouest.fr	UMR STLO INRA Agrocampus Ouest	RENNES	France

Nom de famille	Prénom	email contact	Entreprise/Institution	Ville	Pays
Jobin	Michel, Philippe	michel.jobin@univ-avignon.fr	Inra Umr A 408	Avignon	France
Kalassy	Mireille	mireille.kalassy@usj.edu.lb	Laboratoire de biotechnologie, Université Saint- Joseph, Beyrouth. Liban	Beyrouth	Liban
Kint	Nicolas	nicolas.kint@pasteur.fr	INSTITUT PASTEUR	PARIS	France
Kolstø	Anne-brit	a.b.kolsto@farmasi.uio.no	University of Oslo	Oslo	Norvège
Lefevre	Marie	mle@safisis.fr	SAFISIS / Lesaffre	Soustons	France
Lemy	Christelle	christelle.lemy@jouy.inra.fr	INRA	Jouy en Josas	France
Lereclus	Didier	Didier.Lereclus@jouy.inra.fr	INRA	Jouy-en-Josas	France
Madeira	Jean-paul	ophidien@hotmail.com		LUNEL	France
Mahillon	Jacques	jacques.mahillon@uclouvain.be	UCL	Louvain-la-Neuve	Belgique
Majed	Racha	rmajed@jouy.inra.fr	INRA	Jouy-en-Josas	France
Malleck	Tiffany	t.malleck@ctcpa.org	CTCPA	Avignon	France
Martin Verstraete	Isabelle	isabelle.martin-verstraete@pasteur.fr	Institut Pasteur	Paris	France
Membré	Jeanne- marie	jeanne-marie.membre@oniris- nantes.fr	INRA	Nantes	France
Miled	Rabeb	rabeb.miled@anses.fr	Anses	Maisons-Alfort	France
Mistou	Michel-yves	michel-yves.mistou@anses.fr	Anses	Maisons Alfort cédex	France
Modugno	Chloé	Chloe_Modugno@etu.u-bourgogne.fr	UMR PAM	Dijon	France
Morieux	Paul	polomorieux@hotmail.fr	INRA-PIHM	VILLENEUVE D'ASCQ	France
Mtimet	Narjes	narjesmtimet@gmail.com	LUBEM_Bonduelle	QUIMPER	France
Nguyen The	Christophe	christophe.nguyen-the@avignon.inra.fr	Inra	Avignon	France
Nielsen-leroux	Christina	christina.nielsen@jouy.inra.fr	INRA - Micalis	Jouy en Josas	France
Ouendi	Imene	samir.ouendi@yahoo.fr	universite tlemcen	tlemcen	Algérie
Patino Navarrete	Rafael	rafael.patino-navarrete@jouy.inra.fr	INRA	Jouy en Josas	France
Peltier	Johann	johann.peltier@pasteur.fr	INSTITUT PASTEUR	PARIS	France
Perchat	Stéphane	stephane.perchat@jouy.inra.fr	INRA	Jouy en Josas	France
Perriet-cornet	Jean-marie	jeanmarie.perrier@gmail.com	UMR PAM	Dijon	France
Pires Fazion	Fernanda Aparecida	ffazion@jouy.inra.fr	INRA	Jouy-en-Josas	France
Poncet	Sandrine	sandrine.poncet@grignon.inra.fr	INRA MICALIS Bat 442	Jouy en Josas	France
Poquet	Isabelle	isabelle.poquet@jouy.inra.fr	INRA	jouy en josas	France
Raffin	Christelle	christelleraffin@eurofins.com	EUROFINS ELMO	NANTES	France
Rama Rao	Nalini	nalini.ramarao@jouy.inra.fr	INRA	Jouy en Josas	France
Rejasse	Agnès	agnes.rejasse@jouy.inra.fr	INRA	Jouy en Josas	France
Rossi	Oriana	oriana.rossi@jouy.inra.fr	INRA	Jouy en Josas	France
Sanchis Borja	Vincent	vincent.sanchis@jouy.inra.fr	INRA	Jouy en Josas	France
Sennia	Omar	omar.sennia@gmail.com		Paris	France
Slamti	Leyla	leyla.slamti@jouy.inra.fr	INRA	Jouy en Josas	France
Sorokine	Alexei	alexei.sorokine@jouy.inra.fr	INRA	Jouy en Josas	France
Stahl	Valérie	v.stahl@aerial-crt.com	Aérial ITAI	ILLKIRCH	France
Steunou	Gilbert	gsteunou@euroserum.com	Eurosérum		France
Trunet	Clément	clement.trunet@gmail.com	LUBEM ADRIA Développement	Quimper	France
Valero Rello	Ana	avalerorell@jouy.inra.fr	INRA	Jouy en Josas	France
Verplaetse	Emilie	emilie.verplaetse@jouy.inra.fr	INRA	Jouy en Josas	France
Vilas-boas	Gislayne	gtvboas@gmail.com	Universidade Estadual de Londrina	Londrina Paraná	Brésil
Winkler	Michele	michele.winkler@agroparistech.fr	Agroparistech/TGU Micalis	Thiverval grignon	France
Woudstra	Cedric	cedric.woudstra@anses.fr	Anses	Maisons Alfort	France

Notes

Programme BSPIT 2015

Lundi 6 Juillet 2015

- 10:00 Session 1 : Génomique et évolution
- 14:00 Session 2: Mécanismes de différenciation
- 16:30 Session 3 : Pathogénie et virulence
- 18:30 Fin de la journée

Mardi 7 juillet 2015

- 09:00 Session 4 : Spores bactériennes en industries alimentaires et santé publique
- 14:00 Session 5 : Physiologie, génétique et biotechnologies
- 17:30 Remise des prix SFM et conclusions du colloque