

Abstract

The spore-forming bacterium *Bacillus cereus* is a major cause of foodborne outbreaks in Europe. Some *B. cereus* strains can grow at low temperatures and consequently during the storage of refrigerated foods. Bacterial cold adaptation is characterized by a lag phase in which the bacteria do not multiply and modify their physiology to cope with the constraints of low temperatures. During the lag phase, diverse events take place and these are poorly understood. From a practical point of view, the risk of *B. cereus* multiplication in refrigerated foods is consequently difficult to predict. Our aim is to determine a sequence of molecular and physiological events during the lag phase at low temperature in *B. cereus*. The expression of specific genes was studied by transcriptional reporter systems with the fluorescent proteins GFP and mCherry. At the physiological level, the kinetics of fatty acid modifications during cold growth was investigated. The increase in desaturations in the $\Delta 5$ position was observed at the end of lag in the three strains tested at low temperature and continues throughout the growth. For other modifications, *B. cereus* strains have kinetics of their own and appear to use different means to adapt to low temperatures. Despite this, the *desA* gene (desaturase), which causes desaturations in the $\Delta 5$ position, has a different kinetics of expression in two mesophilic *B. cereus* strains. For one, it was expressed in the exponential phase, for the other at the end of the stationary phase and very weakly. Similarly, the *abrB* gene (transcriptional regulator) is not expressed at the same time in three strains of *B. cereus*. A strong promoter activity of this gene was observed in strain ATCC 14579 during lag but this activity started in the middle of the exponential phase in the other two strains. On the other hand, it was observed that the *csHA* gene (RNA helicase), at cold or optimal temperature, at neutral or acidic pH, was always expressed during the lag phase in three strains from different phylogenetic groups of *B. cereus*. This gene is therefore a biomarker of the lag phase in *B. cereus*. The *ftsAZ* operon (involved in cell division) could, with its expression starting with the first cell divisions, constitute a potential biomarker of the exit of lag phase, and with a peak of expression in the exponential phase, a good marker of this phase.

Keywords: *B. cereus* – Lag phase – Cold adaptation – Fatty acids – Fluorescence

Résumé

Bacillus cereus est une bactérie sporulante pathogène, cause majeure de toxi-infections alimentaires en Europe. Certaines souches de *B. cereus* peuvent croître à basses températures et donc se multiplier durant la conservation d'aliments réfrigérés. L'adaptation au froid d'une bactérie se traduit par une phase de latence durant laquelle la bactérie ne se multiplie pas et modifie sa physiologie pour répondre aux contraintes imposées par les basses températures. La durée de la latence est particulièrement variable et les mécanismes déterminant cette phase sont mal connus. D'un point de vue pratique, il en résulte une difficulté à prévoir le risque de multiplication de *B. cereus* dans les aliments réfrigérés. Notre objectif est de déterminer une séquence d'événements moléculaires et physiologiques pendant la phase de latence observée à basse température chez *B. cereus*. L'expression de gènes spécifiques est étudiée grâce à des systèmes rapporteurs dans lequel le promoteur du gène contrôle la synthèse de protéines fluorescentes GFP ou mCherry. Au niveau physiologique, la cinétique de modifications des acides gras lors de croissance au froid a été étudiée. L'augmentation des désaturations en position $\Delta 5$ a été observée en sortie de latence chez les trois souches testées au froid et se poursuit tout à long de la croissance. Pour les autres modifications, les souches de *B. cereus* présentent des cinétiques qui leur sont propres et semblent utiliser des moyens différents pour s'adapter aux basses températures. Le gène *desA* (désaturase), à l'origine des désaturations en position $\Delta 5$, présente une cinétique d'expression différente chez deux souches de *B. cereus* mésophiles. Pour l'une, il était exprimé en phase exponentielle, pour l'autre en fin de phase stationnaire et très faiblement. Pareillement, le gène *abrB* (régulateur de transcription) ne s'exprime pas au même moment dans trois souches de *B. cereus*. Une forte activité promotrice de ce gène a été observée chez la souche ATCC 14579 pendant la latence mais cette activité a démarré en milieu de phase exponentielle chez les deux autres souches. En revanche, on a pu observer que le gène *csHA* (hélicase à ARN), à température froide ou optimale, à pH neutre ou acide, était toujours exprimé pendant la phase de latence dans trois souches issues de différents groupes phylogénétiques de *B. cereus*. Ce gène constitue donc un biomarqueur de la phase de latence chez *B. cereus*. L'opéron *ftsAZ* (impliqué dans la division cellulaire) pourrait, grâce à son expression simultanée avec les premières divisions cellulaires, constituer un biomarqueur potentiel de la sortie de latence, et par son pic d'activité, un bon marqueur de la phase exponentielle.

Mots clés : *B. cereus* – Phase de latence – Adaptation au froid – Acides gras – Fluorescence