

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iv
AVANT-PROPOS	vi
RÉSUMÉ	viii
LISTE DES FIGURES	xv
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xvi
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Groupe <i>Bacillus cereus</i>	1
1.1.1 <i>Bacillus cereus sensus stricto</i>	2
1.1.2 <i>Bacillus anthracis</i>	3
1.1.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
1.1.4 <i>Bacillus mycoides</i> et <i>Bacillus pseudomycoides</i>	6
1.1.5 <i>Bacillus cytotoxicus</i>	7
1.1.6 <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	8
1.2 La psychrotolérance.....	8
1.3 Relation génétique entre les espèces du groupe <i>B. cereus</i>	9
1.3.1 Hybridation ADN-ADN	9
1.3.2 L'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S)	10
1.3.3 Électrophorèse des allozymes (MLEE)	11
1.3.4 Typage par séquençage multilocus (MLST).....	11
1.3.5 Analyse par séquençage multilocus (MLSA).....	12
1.4 Les avantages des gènes de ménage	13
1.5 L'origine de <i>B. thuringiensis</i> sérovars <i>navarrensis</i> , <i>bolivia</i> et <i>vazensis</i>	15
1.5.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>navarrensis</i>	15
1.5.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>bolivia</i>	16
1.5.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>vazensis</i>	17
1.6 Les souches atypiques de <i>B. thuringiensis</i>	17
1.7 Les protéines de la couche S.....	18

1.8	Résumé de la problématique.....	20
1.9	Objectif.....	21
1.10	Hypothèses.....	22

CHAPITRE II

***BACILLUS THURINGIENSIS* SEROVARS *BOLIVIA*, *VAZENSIS* AND *NAVARRENSIS* MEET THE DESCRIPTION OF *BACILLUS WEIHENSTEPHANENSIS***

	Résumé.....	25
	Abstract	27
	Introduction.....	28
	Materials and Methods.....	29
	Bacterial strains, culture conditions and DNA isolation.....	29
	Bacterial cultures at 7 and 43°C.....	29
	16S rRNA gene	29
	<i>cspA</i> gene amplification	30
	DNA cloning and sequencing	30
	Nucleotide sequence accession number	31
	Results.....	31
	Bacterial growth curves.....	31
	16S rRNA gene signature sequence.....	32
	<i>cspA</i> gene signature sequence	32
	Discussion	33
	References.....	35
	Figure legend.....	37

CHAPITRE III

MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SEROVARS *NAVARRENSIS*, *BOLIVIA* AND *VAZENSIS* AND *BACILLUS WEIHENSTEPHANENSIS* REVEALS A COMMON PHYLOGENY

	Résumé.....	43
	Abstract	45
	Introduction.....	46
	Materials and methods	48

Bacterial strains and culture conditions	48
Housekeeping genes amplification.....	48
DNA cloning and sequencing	49
Phylogenetic analysis	49
Nucleotide sequence accession number	49
Results	50
Amplification of housekeeping genes	50
Housekeeping gene phylogenetic analyses	50
Housekeeping gene specific signature sequences and single nucleotide polymorphisms	51
Discussion	51
References	55
Figure legends	58
CHAPITRE IV	
<i>BACILLUS WEIHENSTEPHANENSIS</i> CHARACTERISTICS ARE PRESENT IN <i>BACILLUS CEREUS</i> AND <i>BACILLUS MYCOIDES</i> STRAINS..	75
Résumé.....	76
Abstract	78
Introduction.....	79
Materials and Methods.....	80
Bacterial strains, culture conditions and DNA isolation	80
Bacterial cultures at 7 °C and 43 °C	81
Amplification of 16S rRNA, <i>cspA</i> , <i>glpF</i> , <i>gmk</i> , <i>purH</i> and <i>tpi</i> genes.....	81
DNA cloning and sequencing	81
Phylogenetic analysis	82
<i>B. weihenstephanensis</i> gene signature sequences	82
Nucleotide sequence accession number	82
Results	83
Bacterial cultures at 7 °C and 43 °C	83
Amplification of 16S rRNA, <i>cspA</i> , <i>glpF</i> , <i>gmk</i> , <i>purH</i> and <i>tpi</i> genes.....	83
Phylogenetic analysis	83
<i>B. weihenstephanensis</i> -specific signature sequences and psychrotolerance....	84

Discussion	85
References	90
Figure legends	94

CHAPITRE V

DISCRIMINATION BETWEEN MESOPHILIC AND PSYCHROTOLERANT STRAINS IN THE *BACILLUS CEREUS* GROUP BASED ON THE PstI DIGESTION OF THE *PYCA* GENE 117

Résumé.....	118
Abstract	120
Introduction	121
Materials and Methods.....	121
Bacterial strains and DNA isolation.....	121
Bacterial cultures at 7 °C.....	122
Amplification of <i>pycA</i> gene.....	122
PstI digestion	123
<i>In silico</i> digestion	123
DNA cloning and sequencing	123
Nucleotide sequence accession number	123
Results	124
Discussion	125
References	127
Figure legends	129

CHAPITRE VI

MUTUALLY EXCLUSIVE DISTRIBUTION OF THE *SAP* AND *EAG* S-LAYER GENES AND THE *LYTB/LYTA* CELL WALL HYDROLASE GENES IN *BACILLUS THURINGIENSIS*..... 136

Résumé.....	137
Abstract	139
Introduction	140
Materials and Methods.....	141
Bacterial strains, distribution of <i>sap</i> , <i>eag</i> and <i>lytB/lytA</i> genes and culture conditions	141
PCR primer design and amplification of <i>sap</i> , <i>eag</i> and <i>lytB/lytA</i> genes.....	142

<i>sap</i> S-layer gene	142
<i>eag</i> S-layer gene.....	143
<i>lytB/lytA</i> genes	144
DNA cloning and sequencing	144
Phylogenetic analysis	145
Nucleotide sequence accession number	145
Results	146
Organisation and distribution of the <i>sap</i> and <i>eag</i> S-layer and <i>lytB/lytA</i> cell wall hydrolase genes in fully sequenced genomes	146
Amplification of <i>sap</i> , <i>eag</i> and <i>lytB/lytA</i> genes	148
Phylogenetic analyses	149
Sap	149
EA1	150
LytB/LytA	150
Distribution of the <i>sap</i> and <i>eag</i> S-layer and <i>lytB/lytA</i> cell wall hydrolase genes in <i>B. thuringiensis</i>	151
Discussion	151
References	154
Figure legends	158
CHAPITRE VII	
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS	166
2.1 Caractéristiques de <i>B. weihenstephanensis</i> chez <i>B. thuringiensis</i> sérovars <i>navarrensis</i> , <i>bolivia</i> et <i>vazensis</i>	167
2.2 Analyses par MLSA de <i>B. weihenstephanensis</i> et <i>B. thuringiensis</i>	169
2.3 Caractéristiques de <i>B. weihenstephanensis</i> chez les autres espèces du groupe <i>B. cereus</i>	172
2.4 Développement d'un outil moléculaire pour distinguer les souches psychrotolérantes des mésophiles.....	179
2.5 Distribution des gènes de la couche S, <i>sap</i> et <i>eag</i> chez <i>B. thuringiensis</i>	181
2.6 Conclusion	184
2.7 Perspectives de recherche	186
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	189

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Cellules végétatives de la souche <i>B. cereus</i> NVH 0075/95 en microscopie électronique à balayage.....	1
1.2	Cellules sporulées de <i>Bacillus thuringiensis</i> en contraste de phase	6
1.3	Colonies rhizoïdes de <i>Bacillus mycoides</i> sur milieu "TYA" (Tryptone Yeast Agar)	7
1.4	Les cellules de <i>B. thuringiensis</i> sérovar <i>navarrensis</i> en contraste de phase (A)(X500 barre = 2 µm) et le cristal en microscopie électronique à balayage (B)(X110 000 barre = 250 nm).....	16
1.5	Les cellules de <i>B. thuringiensis</i> sérovar <i>bolivia</i> en contraste de phase (A) (X800) et en microscopie électronique à transmission (B) (X30 000 barre = 0,5 µm).	16
1.6	Les cellules de <i>B. thuringiensis</i> sérovar <i>vazensis</i> en contraste de phase (A) (X800) et en microscopie électronique à transmission (B) (X30 000 barre = 0,5 µm)	17
1.7	Schéma montrant la composition de la paroi chez les bactéries à Gram positif ainsi que la position de la couche S.....	18
1.8	Microscopie électronique à transmission de la couche S d'une cellule bactérienne organisée en treillis hexagonale. Barre = 100 nm	19
7.1	La disposition schématique des gènes <i>csaA</i> et <i>csaB</i> par rapport aux gènes <i>sap</i> , <i>eag</i> et <i>lytB/lytA</i> au niveau du chromosome chez <i>B. cereus</i> Q1 et <i>B. cereus</i> ATCC 14579 (la souche type)	183

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AICAR	5-aminoimidazole -4-carboxamide -1-β-D-ribofuranoside
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
C	Cristal
CoA	Coenzyme A
FAICAR	5-Formamidoimidazole -4-carboxamide ribotide
GDP	Guanosine diphosphate
GMP	Guanosine monophosphate
kda	Kilodalton
m	Mètre
S	Spore

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Groupe *Bacillus cereus*

Le groupe *Bacillus cereus* est parmi les bactéries cultivables les plus abondantes du sol (von Stetten *et al.*, 1999). Ce sont des bacilles Gram positifs, aérobies ou parfois anaérobies facultatifs, capables de produire une endospore quand les conditions deviennent défavorables. Elles ont des capacités physiologiques très diversifiées. En effet, elles peuvent être impliquées dans la minéralisation du phosphate (Fernandez-Herrera *et al.*, 1987), la dénitrification (Li *et al.*, 1989), la protéolyse (Bach *et al.*, 1999) ou la production d'antibiotiques (Milner *et al.*, 1996). Le groupe *Bacillus cereus* regroupe sept espèces génétiquement très proches; *Bacillus cereus sensu stricto* (au sens strict), *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus cytotoxicus* et *Bacillus weihenstephanensis* (Logan et De Vos, 2009). Les cellules végétatives de ces espèces se ressemblent à tel point qu'il est très difficile de les distinguer à ce stade. Au moment de la sporulation, seule l'espèce *B. thuringiensis* se distingue des autres par la production d'une inclusion parasporale.

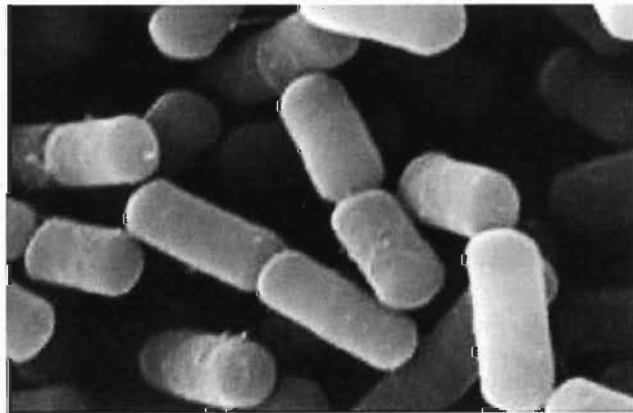


Figure 1.1 Cellules végétatives de la souche *B. cereus* NVH 0075/95 en microscopie électronique à balayage (Lund et Granum, 1996).

1.1.1 *Bacillus cereus sensus stricto*

L'espèce *B. cereus* au sens strict est capable de coloniser différents habitats. Elle est fréquemment isolée à partir du sol, de plantes et de l'intestin de différents animaux. Elle est capable de synthétiser des enzymes extracellulaires d'intérêt industriel, des toxines et des antibiotiques.

En 1887, Frankland et Frankland ont isolé *Bacillus cereus* à partir de l'air d'une étable au Royaume-Uni. La bactérie isolée est la souche type de *B. cereus* (ATCC 14579) (Skerman *et al.*, 1980). Depuis 1906, plusieurs épidémies d'empoisonnements alimentaires ont été déclarées en Europe. De 1947 à 1949, Steinar Hauge, un chercheur norvégien, a examiné quatre cas d'empoisonnement alimentaire chez 600 personnes. Il a remarqué que le dessert consommé par ces personnes contenait de la farine de maïs qui était contaminée avec des spores de *B. cereus* (10^4 spores par gramme). Il devient alors le premier chercheur à fournir un rapport complet sur les cas d'empoisonnements et à prouver l'implication de *B. cereus* dans ces intoxications alimentaires (Hauge, 1955). En 1961, les autorités sanitaires américaines reconnaissent pour la première fois le rôle de *B. cereus* dans l'empoisonnement alimentaire.

La pathogénicité de *B. cereus* provient de sa capacité à produire plusieurs facteurs de virulence tels que des phospholipases, des entérotoxines et des toxines émétiques (céréulides) entraînant des toxi-infections alimentaires. Les souches pathogènes de *B. cereus* sont capables de contaminer toutes sortes de nourriture comme le lait, les légumes, la viande, le poisson, le riz, la pomme de terre, le fromage, etc. Les spores des souches pathogènes de *B. cereus* adhèrent à l'épithélium de l'intestin grêle, germent et produisent des toxines (Granum et Lund, 1997; Kotiranta *et al.*, 2000). Aussi, certaines souches de *B. cereus* sont responsables d'infections locales ou systémiques sévères chez l'homme comme la septicémie et l'énophtalmie (Drobniewski, 1993; Helgason *et al.*, 2000; Kotiranta *et al.*, 2000).

La présence de spores de *B. cereus* cause de sérieux problèmes à l'industrie agroalimentaire et en particulier à l'industrie laitière, car elles sont résistantes à la chaleur et adhèrent fortement à de nombreuses surfaces y compris l'acier inoxydable. Cette adhésion est liée à l'hydrophobicité de la surface des spores et à la présence de filaments (Tauveron *et al.*, 2006).

L'espèce *B. cereus* ne contient pas uniquement des souches pathogènes. Elle contient également des souches bénéfiques à l'homme qui sont utilisées comme probiotiques. Ces derniers sont des suppléments alimentaires qui contribuent au rétablissement de la microflore intestinale chez l'homme et les animaux (Fuller 1989, 1991). Les espèces *B. cereus*, *B. clausii* et *B. pumilus* sont présentes sous forme de spores dans cinq produits commerciaux de probiotiques. Ces produits ont prouvé leurs potentiels dans la colonisation, la stimulation du système immunitaire et l'activité antimicrobienne (Duc *et al.*, 2004; Pinchuk *et al.*, 2001).

1.1.2 *Bacillus anthracis*

L'espèce *B. anthracis* est responsable de la maladie du charbon chez les herbivores et en particulier les ruminants qui sont les plus exposés et les plus sensibles à l'infection. Cette maladie est transmise à l'homme par contact direct avec les animaux infectés ou leurs produits (Spencer, 2003).

La maladie du charbon était souvent associée aux ouvriers qui travaillaient avec la laine de mouton. Vers 1850, des études plus poussées ont permis à John Bell, un médecin anglais, de déterminer qu'une bactérie était à l'origine de la maladie. La bactérie responsable de la maladie, *Bacillus anthracis*, fut isolée pour la première fois par Robert Koch en 1876. En 1881, trois chercheurs, dont Louis Pasteur, démontrèrent la possibilité de l'immunisation contre cette maladie avec des cultures affaiblies de la bactérie. Lors de l'infection, les spores germent et produisent des facteurs de virulence dont la capsule et deux toxines. La capsule est composée uniquement d'acide poly D-glutamique, un polymère d'acide glutamique, ce qui lui permet d'échapper à la

phagocytose. Les deux toxines sont composées de trois protéines : l'antigène protecteur, le facteur oedématogène et le facteur léthal. La gravité de l'infection dépend de la combinaison de ces facteurs de virulence. Grâce à son pouvoir hautement pathogène, *B. anthracis* est utilisé comme arme biologique. La contamination peut se faire par des spores qui pénètrent dans l'organisme par des blessures cutanées, inhalation ou ingestion. Les souches de *B. anthracis* sont sensibles à la pénicilline G et autres β -lactamines. Par conséquent, une antibiothérapie précoce est efficace pour prévenir la maladie du charbon chez les personnes exposées.

1.1.3 *Bacillus thuringiensis*

L'espèce *B. thuringiensis* est caractérisée par la production d'une inclusion parasporale au moment de la sporulation. Cette inclusion parasporale, appelée également cristal, présente chez certaines souches des propriétés insecticides.

La bactérie *Bacillus thuringiensis* a été isolée initialement en 1901 par le bactériologiste japonais Shigetane Ishiwata à partir de larves mortes de vers à soie (*Bombyx mori*, *Lepidoptera* : *Bombycidae*). Il l'a alors appelé « Sottokin », ce qui signifie « mort soudaine *Bacillus* ». Ishiwata a décrit les symptômes observés chez les larves de vers à soie quand elles étaient exposées à ce *Bacillus*. Ensuite, il a conclu que les intoxications observées étaient provoquées par des toxines (Ishiwata 1905a, 1905b). En 1911, un scientifique allemand, Ernst Berliner, a isolé une bactérie similaire à partir de larves mortes de la pyrale de la farine (*Anagasta kuehniella*, *Lepidoptera* : *Pyralidae*) dans l'état de Thuringe en Allemagne (Berliner 1911, 1915). Berliner a fourni une description scientifique de cette bactérie qu'il a ensuite nommé *Bacillus thuringiensis* en utilisant la nomenclature scientifique binomiale. En 1916, deux scientifiques japonais, Aoki et Chigasaki ont rapporté que la toxicité de l'isolat d'Ishiwata était présente dans une culture sporulée, mais absente dans une jeune culture composée de cellules végétatives. D'après leurs données sur l'inactivation de la toxine par des acides, le phénol, le chlorure de mercure et la chaleur, ils conclurent que la toxine était de nature protéique. Vers 1930, on assistait à la première utilisation de *B. thuringiensis* comme

insecticide biologique, d'abord en Hongrie, ensuite en Yougoslavie. Suite aux résultats prometteurs, la France a entamé la première production commerciale de *B. thuringiensis* qu'elle a nommée Sporeine. Vers 1950, l'intérêt grandissait aux États-Unis pour utiliser *B. thuringiensis* afin de contrôler les lépidoptères ravageurs de cultures. Grâce au succès des formulations à base de *B. thuringiensis* contre les insectes de l'ordre des lépidoptères, les recherches pour trouver d'autres bactéries entomopathogènes contre les insectes ravageurs des ordres des diptères et coléoptères se sont intensifiées. Aujourd'hui, on estime que plus de 50 000 souches de *B. thuringiensis* (Sanchis *et al.*, 1996) sont conservées dans les collections publiques et privées constituant ainsi un « réservoir » potentiel pour de nouvelles toxines.

Le système initial utilisé pour identifier et classier les souches de *B. thuringiensis* était basé sur les caractéristiques morphologiques et biochimiques (Heimpel et Angus, 1958). Ce système a été graduellement remplacé par les analyses sérologiques appelées sérotypie. Cette dernière, qui correspond à la réaction immunologique à l'antigène flagellaire H, a permis l'établissement d'un nouveau système de classification pour *B. thuringiensis*. Basé sur des caractères stables et spécifiques, ce nouveau système a permis de grouper les milliers de souches de *B. thuringiensis* isolés dans le monde entier dans des H-sérotypes (de Barjac et Bonnefoi, 1962, 1968). En 1999, les résultats issus de la sérotypie ont été mis à jour par Lecadet (Lecadet *et al.*, 1999). Maintenant, il existe 69 H-sérotypes différents et 82 sérovars.

L'utilisation de *B. thuringiensis* constitue une alternative de grande valeur par rapport aux pesticides chimiques, grâce d'une part à sa grande spécificité et au respect de l'environnement, et d'autre part au faible coût de sa production. Les bio-insecticides à base de *B. thuringiensis* occupent ainsi 80-90 % du marché mondial des agents de contrôle biologique (Gough *et al.*, 2002). Les premières formulations à base de *B. thuringiensis* étaient utilisées contre les lépidoptères qui étaient les principaux ravageurs. Les années 1960 ont été marquées par la découverte de la souche *B. thuringiensis* sérovar *kurstaki* HD1 qui était 2 à 200 fois plus toxique que la souche utilisée dans les formulations précédentes (Dulmage, 1970). Les formulations à base de

B. thuringiensis sérovar *kurstaki* HD1 contre les lépidoptères ont été largement utilisées en agriculture et en foresterie. En 1976, une nouvelle souche de *B. thuringiensis* très toxique contre les diptères a été découverte en Israël et fut nommée *B. thuringiensis* sérovar *israelensis* (de Barjac, 1978; Goldberg et Margalit, 1977). Cette découverte est arrivée à un moment crucial en raison de la résistance des moustiques et des mouches noires aux pesticides chimiques. Considérant que les moustiques et les mouches noires sont des vecteurs de plusieurs maladies pour l'homme, de nouvelles formulations à base de *B. thuringiensis* sérovar *israelensis* ont été produites. En 1983, une nouvelle souche très toxique contre les coléoptères a été découverte en Allemagne et fut nommée *B. thuringiensis* sérovar *morrisoni*, biotype *tenebrionis*. Les efforts se sont poursuivis pour isoler des souches de *B. thuringiensis* présentant de nouvelles spécificités insecticides et pesticides. L'activité entomopathogène de *B. thuringiensis* s'est étendue pour inclure les insectes de l'ordre des hyménoptères (Garcia-Robles *et al.*, 2001) et d'autres invertébrés comme les nématodes (Marroquin *et al.*, 2000; Wellman-Desbiens *et al.*, 2011).

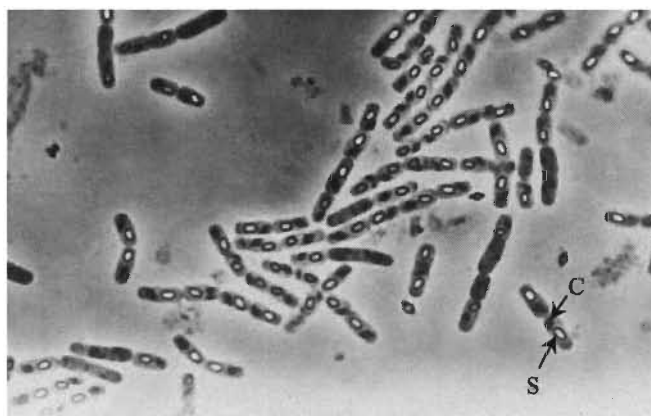


Figure 1.2 Cellules sporulées de *Bacillus thuringiensis* en contraste de phase.

1.1.4 *Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycoides*

Les espèces *B. mycoides* et *B. pseudomycoides* sont des organismes saprophytes qui se distinguent des autres espèces du groupe *B. cereus* par des bâtonnets non mobiles et la morphologie de ses colonies qui sont rhizoïdes ou mycoïdes. Les deux espèces sont très proches, mais elles peuvent être distinguées par la composition en acides gras de

leurs parois et le pourcentage d'homologie en acide nucléique. Très peu d'études se sont intéressées à ces deux espèces et leur importance économique demeure inconnue (Nakamura et Jackson, 1995; Nakamura, 1998). Des souches de *B. mycoides* sont associées aux racines de certaines plantes et elles sont impliquées dans la stimulation de la croissance de ces plantes.



Figure 1.3 Colonies rhizoïdes de *Bacillus mycoides* sur milieu “TYA” (Tryptone Yeast Agar).

1.1.5 *Bacillus cytotoxicus*

Cette espèce a été isolée à partir de purées végétales et de semoules contaminées. En 1998, elle a été responsable des décès de trois personnes suite à un empoisonnement alimentaire en France. Elle est capable de produire une entérotoxine appelée cytotoxine K, très pathogène pour l'homme. Elle présente des différences phénotypiques et génétiques avec les autres espèces du groupe *B. cereus* (Afchain *et al.*, 2008; Auger *et al.*, 2008; Fagerlund *et al.*, 2007; Rau *et al.*, 2009). En effet, elle se distingue par son incapacité à croître à une température inférieure à 17 °C. Cependant, elle est capable de se multiplier à 53 °C, c'est une espèce thermotolérante (Auger *et al.*, 2008; Guinebretière *et al.*, 2013).

1.1.6 *Bacillus weihenstephanensis*

Cette espèce a été isolée initialement à partir de lait pasteurisé et conservé à basse température. Elle est caractérisée par sa capacité à croître à 7 °C mais non à 43 °C. De plus, elle possède deux séquences signatures au niveau des gènes ARNr 16S (codant pour la petite sous-unité ribosomale) et *cspA* (codant pour la protéine majeure en réponse à un stress dû au froid) (Lechner *et al.*, 1998). C'est une espèce psychrotolérante.

1.2 La psychrotolérance

La psychrotolérance (du latin *tolerare*, supporter) décrit la capacité d'un microorganisme de survivre à un climat froid et à une forte variation de température (von Stetten *et al.*, 1999). Contrairement aux bactéries psychrophiles (du grec *psukhros*, froid; *philein*, aimer) qui colonisent les environnements naturels froids de façon permanente telle que les régions polaires, les océans et les hautes montagnes, les bactéries psychrotolérantes coexistent avec les mésophiles dans des habitats variés. Les bactéries psychrotolérantes préoccupent énormément les autorités sanitaires et l'industrie alimentaire puisqu'elles sont actives à basse température et, par conséquent, capables de dégrader et de réduire la durée de conservation des produits alimentaires. Les bactéries psychrotolérantes du genre *Bacillus* et *Paenibacillus* sont les plus importantes parce qu'elles sont capables de produire des endospores qui vont leur permettre de survivre et de se proliférer après décontamination des produits alimentaires par la chaleur ou par des produits chimiques. En plus, les bactéries psychrotolérantes du genre *Bacillus* sont capables de produire des enzymes telles que les lipases et protéases affectant considérablement la qualité et la stabilité des produits alimentaires. Parmi les espèces du groupe *Bacillus cereus*, *B. weihenstephanensis* constitue un contaminant important des produits réfrigérés à cause de sa capacité à croître à basse température et de synthétiser des entérotoxines et des toxines émétiques (cereulides) (Lechner *et al.*, 1998; Stenfors *et al.*, 2002; Thorsen *et al.*, 2006). Plusieurs industries ont su tirer profit des molécules produites par les bactéries psychrotolérantes. Ces dernières fournissent

plusieurs protéines et enzymes qui sont utilisées dans des secteurs divers notamment en cosmétique, en médecine et dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Gounot, 1991).

1.3 Relation génétique entre les espèces du groupe *B. cereus*

Le groupe *B. cereus* regroupe sept espèces qui sont classées non pas en fonction de leur divergence génétique, mais en se basant sur des critères phénotypiques et physiologiques qui les distinguent les unes des autres comme la virulence (*B. anthracis* et *B. cereus*), la présence de l'inclusion parasporale (*B. thuringiensis*), la forme des colonies (*B. mycoides* et *B. pseudomycoides*), la thermotolérance (*B. cytotoxicus*) et la psychrotolérance (*B. weihenstephanensis*) (Guinebretière et Sanchis, 2003; Helgason *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2004; Priest *et al.*, 2004).

Les cinq techniques moléculaires les plus utilisées pour étudier les relations phylogénétiques entre les espèces du groupe *B. cereus* sont :

1.3.1 Hybridation ADN-ADN

Depuis les années 1960, la méthode d'hybridation ADN-ADN (DDH) constituait la méthode de choix des taxinomistes dans la caractérisation et l'identification des souches bactériennes (Stackebrandt *et al.*, 2002; Wayne *et al.*, 1987). Le pourcentage d'homologie à 70 % constitue la norme recommandée pour définir l'espèce (Wayne *et al.*, 1987). Ce pourcentage peut être déterminé par plusieurs méthodes (Brenner *et al.*, 1969; Crosa *et al.*, 1973; de Ley *et al.*, 1970; Ezaki *et al.*, 1989). La méthode d'hybridation ADN-ADN a été la pierre angulaire pour décrire une espèce bactérienne. Cependant, cette méthode n'est pas très populaire à cause de plusieurs inconvénients majeurs tels que les hybridations croisées, l'exigence pour l'utilisation d'isotope et la grande difficulté d'établir une base de données centrale.

Entre les espèces du groupe *B. cereus*, les pourcentages d'homologie ADN-ADN se situent entre 54 et 80 % (Seki *et al.*, 1978). Cependant, les espèces *B. pseudomycoïdes* et *B. mycoïdes* ont des pourcentages d'homologie ADN-ADN d'environ 30 % (Nakamura, 1998). Aussi, la méthode d'hybridation ADN-ADN donne parfois des résultats contradictoires. En effet, les pourcentages d'homologie sont inférieurs à 70 % entre des souches de la même espèce alors qu'ils peuvent atteindre 83,3 % entre des souches de deux espèces différentes.

1.3.2 L'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S)

En 1987, le microbiologiste américain Carl Woese était le premier à proposer l'utilisation du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S), comme marqueur phylogénétique. Ce gène de 1500 paires de base répond à trois critères essentiels pour la taxinomie :

1. Il est universel, c'est-à-dire présent chez tous les procaryotes, où il remplit la même fonction.
2. Il peut être facilement séquencé car il possède des régions hautement conservés avec peu de mutations.
3. Il présente des séquences variables chez deux espèces phylogénétiquement éloignées.

Le séquençage rapide du gène ARNr 16S et la création d'une grande base de données avaient permis d'envisager le remplacement ou le renforcement de la méthode d'hybridation ADN-ADN par l'analyse des séquences du gène ARNr 16S dans la délimitation de l'espèce (Stackebrandt et Goebel, 1994). La classification basée sur l'ARNr 16S a modifié de façon considérable notre vision du monde bactérien. D'une part, elle est clairement différente de celle établie sur les critères physiologiques et a induit une réforme de la phylogénie bactérienne. Également, elle a permis de mettre en évidence des groupes phylétiques entiers n'ayant aucun représentant cultivable.

Chez le groupe *B. cereus*, les séquences nucléotidiques du gène ARNr 16S montrent un niveau d'homologie très élevé (99 %), si l'on exclut *B. pseudomycooides* et *B. weihenstephanensis*. L'utilisation des gènes indispensables à la survie cellulaire (gènes de ménage) à la place du gène ARNr 16S a permis d'instaurer des méthodes analyses phylogénétiques fiables chez le groupe *B. cereus*. La particularité des gènes de ménage est qu'ils sont capables de s'exprimer dans tous les types cellulaires et dont les produits assurent des fonctions vitales pour les cellules.

1.3.3 Électrophorèse des allozymes (MLEE)

Cette méthode est utilisée pour caractériser des organismes en se basant sur la mobilité par électrophorèse d'un grand nombre d'allozymes. Ces dernières sont des enzymes intracellulaires codées par différents allèles du même gène. Les différences de mobilité des allozymes sont directement liées aux mutations présentes dans le gène (Stanley et Wilson, 2003).

Afin de suivre les variations qui pourraient s'accumuler lentement à l'intérieur d'une population, la méthode MLEE a été utilisée chez *B. anthracis*, *B. thuringiensis* et *B. cereus*. Cette méthode a permis de comparer les modèles d'allozymes de plusieurs gènes. Les résultats ont montré une forte similarité entre les génomes de *B. anthracis*, *B. thuringiensis* et *B. cereus*. Par conséquent, il a été proposé de regrouper ces trois espèces en une seule espèce (Helgason *et al.*, 2000).

1.3.4 Typage par séquençage multilocus (MLST)

Cette méthode mesure directement les variations des séquences nucléotidiques chez un certain nombre de gènes de ménage localisés dans différents endroits au niveau du chromosome. Cette méthode se base sur des amplifications par PCR (polymerase chain reaction) de multiples gènes de ménage suivies du séquençage et de l'analyse des séquences. Cette technique a prouvé son efficacité lors de l'étude de 11 gènes de ménage chez 107 souches de *Neisseria meningitidis* (Maiden *et al.*, 1998). Par la suite, elle a été

utilisée pour identifier et caractériser plusieurs souches bactériennes d'espèces pathogènes, notamment *Streptococcus pneumoniae* (Enright et Spratt, 1998), *Streptococcus pyogenes* (Enright et al., 2001), *Haemophilus influenzae* (Meats et al., 2003), *Staphylococcus aureus* (Enright et al., 2000), *Campilobacter jejuni* (Dingle et al., 2001), *Enterococcus faecium* (Homan et al., 2002), *Bordetella pertussis* (van Loo et al., 2002), *Escherichia coli* (Adiri et al., 2003; Noller et al., 2003) et *Salmonella* (Kotetishvili et al., 2002). La méthode MLST a été utilisée avec succès pour explorer la structure d'une population bactérienne, étudier l'évolution des propriétés liées à la virulence et identifier des souches résistantes aux antibiotiques. Chez le groupe *B. cereus*, cette méthode a été utilisée en analysant les séquences nucléotidiques de sept gènes de ménage chez 105 souches (Priest et al., 2004). Les résultats montrent que le groupe *B. cereus* est composé d'une population clonale avec quelques recombinaisons. Les souches du groupe *B. cereus* ont été subdivisées en huit lignées distinctes distribuées dans deux groupes majeurs. Le premier groupe contenait les souches de *B. anthracis* et la majorité des souches de *B. cereus* alors que le deuxième groupe contenait essentiellement les souches de *B. thuringiensis* et quelques souches de *B. cereus* (Priest et al., 2004).

1.3.5 Analyse par séquençage multilocus (MLSA)

Une autre méthode moléculaire récemment développée et utilisée avec succès dans la systématique microbienne est "Multilocus Sequence Analysis" (MLSA). Cette méthode a été développée initialement pour des études épidémiologiques (Chaloner et al., 2011). Elle permet une analyse phylogénétique basée sur des séquences concaténées de 4 à 12 gènes de ménage. Cette méthode a un pouvoir de résolution très élevé grâce au nombre important de caractères analysés et sa faible sensibilité aux impacts dus à d'éventuels transferts horizontaux des gènes. En effet, elle s'est avérée très efficace pour identifier les groupes d'espèces ayant une forte recombinaison chez les populations de *Neisseria* (Hanage et al., 2005). Elle est également capable de différencier entre les souches et les espèces présentant peu ou pas de divergence au niveau des séquences du gène ARNr 16S (Papke et al., 2004, 2007).

1.4 Les avantages des gènes de ménage

Le pouvoir discriminatoire des gènes de ménage est beaucoup plus puissant que celui des gènes ARNr 16S et ARNr 23S. En effet, Yamamoto et Harayama, (1995) ont démontré que chez *Pseudomonas putida*, le gène de ménage *gyrB* (codant pour la gyrase B) a un nombre de substitutions nucléotidiques plus élevé que le gène ARNr 16S et par conséquent constitue un meilleur outil de classification taxinomique chez cette espèce. Aussi, chez les espèces de *Nocardia*, les analyses phylogénétiques ont montré que le gène *gyrB* a un pouvoir discriminatoire quatre fois plus important que celui du gène ARNr 16S permettant ainsi de distinguer facilement les espèces de *Nocardia* des autres actinomycètes (Takeda *et al.*, 2010). Chez les espèces du groupe *B. cereus*, les analyses phylogénétiques des gènes ARNr 16S, *gyrB* et *aroE* (codant pour la shikimate déhydrogénase) montrent clairement que le pouvoir discriminatoire des gènes *gyrB* et *aroE* est neuf fois plus puissant que celui du gène ARNr 16S (Soufiane et Côté, 2009).

Grâce à leur pouvoir discriminatoire, les gènes *gyrB* et *aroE* ont placé *B. thuringiensis* serovars *bolivia* et *vazensis* avec *B. weihenstephanensis*, loin des autres souches de *B. thuringiensis* (Soufiane et Côté, 2009). Également, l'analyse phylogénétique du gène *panC*, a placé *B. thuringiensis* sérovar *navarrensis* avec les souches de *B. weihenstephanensis* (Guinebretière *et al.*, 2008). L'espèce *B. thuringiensis* est mésophile alors que *B. weihenstephanensis* est psychrotolérante. Il devient intéressant de déterminer si *B. thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* possèdent les mêmes caractéristiques physiologiques et génétiques que *B. weihenstephanensis*.

Dans ce projet de doctorat, nous avons travaillé avec sept gènes de ménage qui ont démontré leur efficacité dans des analyses taxinomiques précédentes (Priest *et al.*, 2004). Ces gènes de ménage sont :

1. le gène *glpF* lequel code pour une protéine transmembranaire appelée "glycerol uptake facilitator". Cette protéine permet le transport du glycérol vers l'intérieur de la cellule où il sera transformé en glycérol-3-phosphate

grâce à l'enzyme glycérol kinase. Le glycérol intervient principalement dans le métabolisme des lipides.



2. le gène *gmk* lequel code pour une “guanylate kinase”, une protéine membranaire qui intervient dans le métabolisme des bases purines et la production d'énergie. Elle catalyse la réaction suivante :



3. le gène *ilvD* lequel code pour l'enzyme “dihydroxy-acid déshydratase”. Cette enzyme participe dans la biosynthèse des acides aminés valine, leucine et isoleucine. Elle catalyse la réaction suivante :



4. le gène *pta* qui code pour une “phosphate acetyltransferase”, intervient dans les métabolismes de pyruvate et de propanoate. Elle catalyse la réaction suivante :



5. le gène *purH* code pour une “phosphoribosylaminoimidazole carboxamide formyltransferase” qui est impliquée dans le métabolisme des bases puriques. Elle catalyse la réaction suivante :



6. le gène *pycA* code pour l'enzyme “pyruvate carboxylase”, qui intervient dans le cycle de Krebs. Elle est activée par l'accumulation d'acétyl-CoA et permet la formation de l'oxaloacétate qui relance le cycle de Krebs.



7. le gène *tpi* code pour l'enzyme "triosephosphate isomérase" qui joue un rôle important dans la glycolyse. Elle est essentielle dans la production d'énergie. Elle catalyse la réaction suivante :



1.5 L'origine de *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis*

Les études précédentes sur *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis* et *bolivia* ont rapporté que ces deux souches avaient des inclusions parasporales ayant des formes particulières. La nature de ces inclusions parasporales n'a pas été identifiée. *B. thuringiensis* sérovar *vazensis* n'a pas été caractérisé auparavant et aucune information n'est disponible sur la forme et la nature de son inclusion parasporale.

1.5.1 *Bacillus thuringiensis* serovar *navarrensis*

La souche de *B. thuringiensis* sérovar *navarrensis* (serotype H50) a été isolée par Iriarte *et al.*, (1998) à partir du sol en Espagne. Son cristal est de petite taille, sphérique et de contour irrégulier. Elle est composée d'une seule protéine de 66 kDa. Aucune toxicité n'a été enregistrée contre huit lépidoptères (*Agrotis segetum*, *Heliothis armigera*, *Plusia gamma*, *Mamestra brassicae*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera frugiperda* et *Plutella xylostella*), six coléoptères (*Crioceris asparagi*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Colaspidema atrum*, *Rhizoperta dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus oryzae*) et six diptères (*Tipula oleracea*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*, *Anopheles stephensi*, *Ceratitis capitata* et *Bactrocera oleae*) (Iriarte *et al.*, 2000).

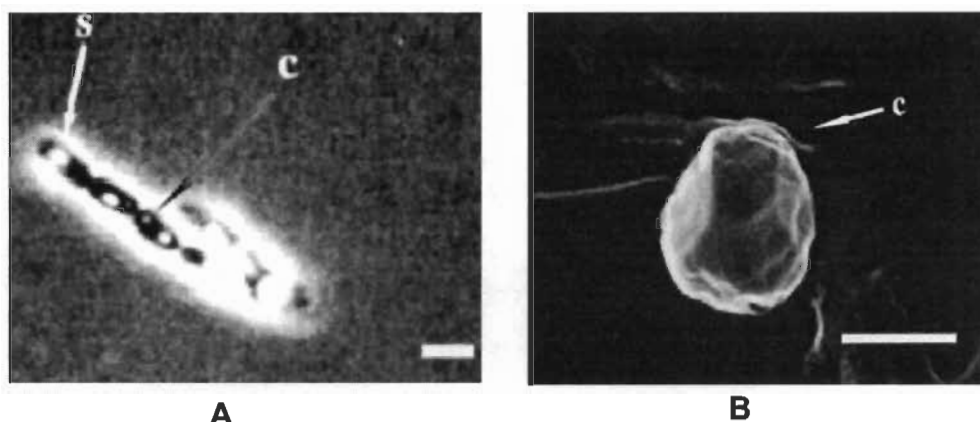


Figure 1.4 Les cellules de *B. thuringiensis* sérovar *navarrensensis* en contraste de phase (A)(X500 barre = 2 µm) et le cristal en microscopie électronique à balayage (B)(X110 000 barre = 250 nm).

1.5.2 *Bacillus thuringiensis* serovar *bolivia*

La souche de *B. thuringiensis* sérovar *bolivia* (serotype H63) a été isolée par Iriarte *et al.*, (1998) à partir d'une larve morte de coléoptère (*Rhigopsidius tucumanus*) dans la vallée des Andes (Bolivie) à 3400 m d'altitude. L'inclusion parasporale présente une forme atypique ressemblant à un prisme cuboïde. Elle est composée d'une protéine de 155 kDa (Ferrandis *et al.*, 1999). Une légère toxicité a été enregistrée contre deux lépidoptères (*Plutella xylostella* et *Trichoplusia ni*).

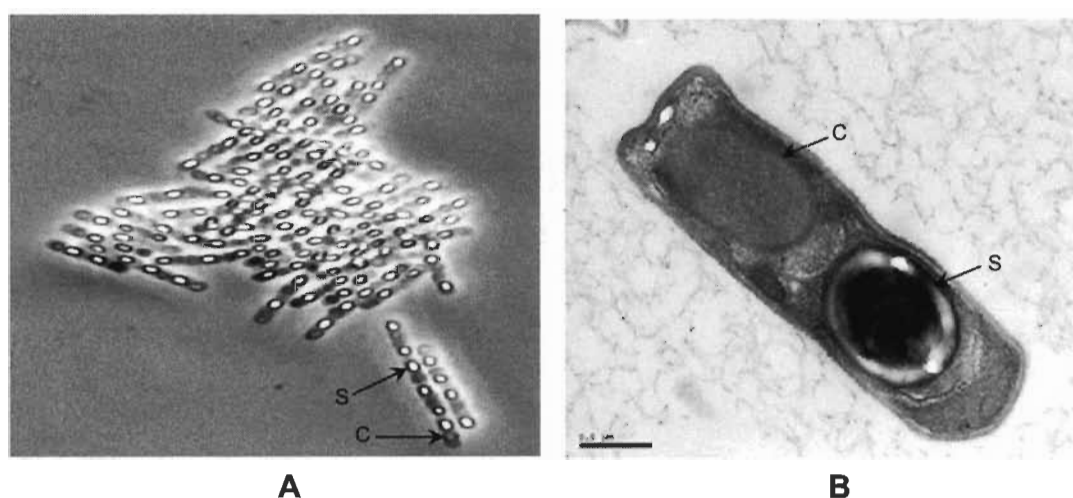


Figure 1.5 Les cellules de *B. thuringiensis* sérovar *bolivia* en contraste de phase (A) (X800) et en microscopie électronique à transmission (B) (X30 000 barre = 0,5 µm).

1.5.3 *Bacillus thuringiensis* serovar *vazensis*

La souche de *B. thuringiensis* sérovar *vazensis* (serotype H67) a été isolée à partir du sol d'un vignoble à 20 m d'altitude dans les Açores (Portugal) par Cándido Santiago-Alvarez de l'université de Córdoba (Espagne). La nature et la forme de l'inclusion parasporale de cette souche n'ont pas été déterminées auparavant.

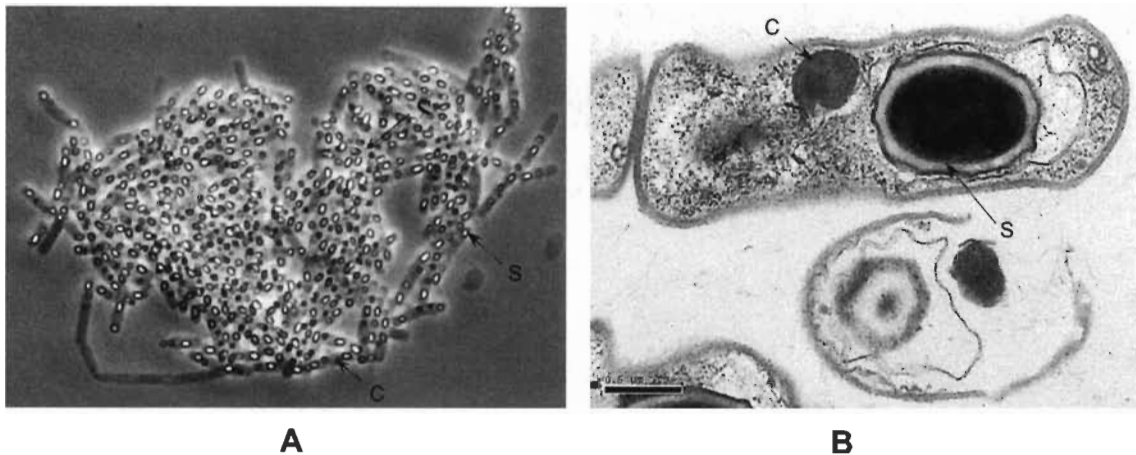


Figure 1.6 Les cellules de *B. thuringiensis* sérovar *vazensis* en contraste de phase (A) (X800) et en microscopie électronique à transmission (B) (X30 000 barre = 0,5 μm).

1.6 Les souches atypiques de *B. thuringiensis*

Les souches de *B. thuringiensis* produisent des inclusions parasporales de différentes morphologies. Les inclusions parasporales ayant des formes bipyramidales, sphériques, rectangulaires ou cuboïdes sont considérées typiques à l'espèce *B. thuringiensis*. La majorité des souches de *B. thuringiensis* ayant des inclusions parasporales de formes bipyramidales et cuboïdes manifestent une toxicité contre les lépidoptères. Les inclusions parasporales de formes sphériques et rectangulaires sont souvent actives contre les diptères et les coléoptères respectivement. Des souches de *B. thuringiensis* sont considérées comme atypiques si la forme et/ou la composition de leurs inclusions parasporales sont inhabituelles. En effet, deux souches de *B. thuringiensis* CTC et GP1 possèdent des inclusions parasporales formées par les protéines de la couche S, EA1 (Peña *et al.*, 2006) et Sap (Zhu et Yu, 2008) respectivement. L'implication des protéines de la couche S dans la virulence chez

B. thuringiensis n'a jamais été étudiée auparavant. Pour savoir si les deux protéines de la couche S, EA1 et Sap sont exclusives aux souches *B. thuringiensis* CTC et GP1, il devient intéressant d'étudier la distribution des gènes *sap* et *eag* codant respectivement pour les protéines Sap et EA1, chez l'ensemble des souches de *B. thuringiensis*.

1.7 Les protéines de la couche S

La surface cellulaire de plusieurs archées et eubactéries est couverte de couche cristalline de nature protéique nommée couche S (S-layer). Cette structure macromoléculaire résulte de forces ioniques et d'auto-assemblage des protéines (Sára et Sleytr, 2000). Plusieurs protéines peuvent couvrir la surface cellulaire notamment chez *Bacillus anthracis*, *Brevibacillus brevis*, *Aquaspirillum serpens*, *Bacillus stearothermophilus* et *Campylobacter fetus*. Des études ont montré que les protéines de la couche S constituent souvent les seuls composants de l'enveloppe cellulaire chez les archées et par conséquent elles sont impliquées dans l'intégrité et le maintien de la forme cellulaire (Mescher et Strominger, 1976; Wildhaber et Baumeister, 1987). Les protéines de la couche S interviennent dans la régulation des échanges avec l'environnement et peuvent également être impliquées dans la virulence chez les bactéries pathogènes (Kotiranta *et al.*, 1998; Pei et Blaser, 1990; Sára et Sleytr, 1987; Sára *et al.*, 1992).

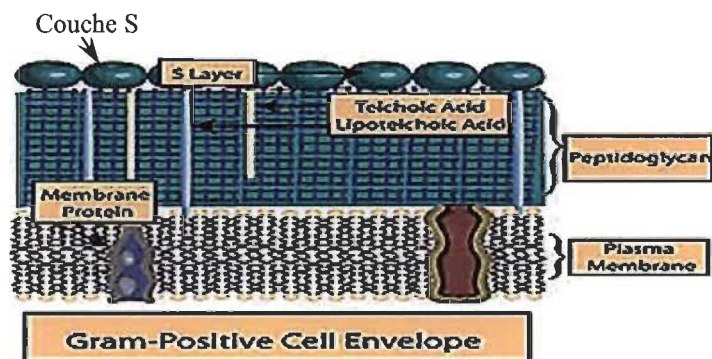


Figure 1.7 Schéma montrant la composition de la paroi chez les bactéries à Gram positif ainsi que la position de la couche S (Université de Cornell, département de microbiologie).

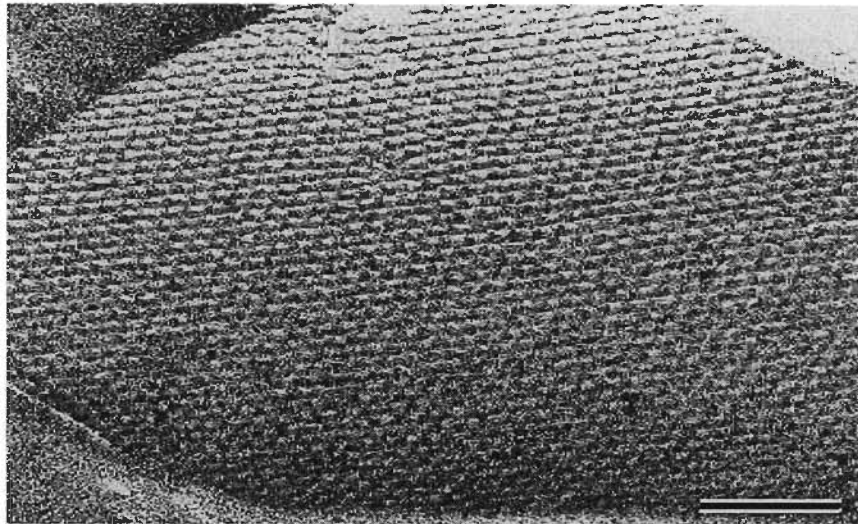


Figure 1.8 Microscopie électronique à transmission de la couche S d'une cellule bactérienne organisée en treillis hexagonale. Barre = 100 nm (Pum *et al.*, 2000).

Chez les microorganismes, les protéines de la couche S sont produites en abondance et nécessitent une dépense énergétique importante. Il devient évident de penser que ces protéines interviennent dans la sélection des différents habitats pour les microorganismes.

Chez *B. anthracis*, les protéines Sap (Surface array protein) et EA1 (Extractable Antigen 1) sont abondantes à la surface cellulaire. Les protéines Sap et EA1 sont codées par les gènes *sap* et *eag* respectivement. Ces gènes sont localisés l'un à proximité de l'autre sur le chromosome et organisés en deux unités de transcription indépendantes. L'analyse par microscopie électronique a montré que les protéines Sap et EA1 ont toutes les deux la capacité de former un réseau cristallin bidimensionnel. Les composants de couche S de *B. anthracis* possèdent à leur extrémité N-terminale trois motifs SLH (S-Layer Homology) qui s'organisent en un domaine structural suffisant pour permettre l'ancrage à la surface des bactéries. Le domaine SLH interagit avec un polysaccharide associé de façon covalente au peptidoglycane. Les extrémités terminales N et C de ces deux protéines sont impliquées dans l'ancrage à la paroi cellulaire et l'assemblage des protéines de surface respectivement (Mesnage *et al.*, 1999). La synthèse de Sap et EA1 est régulée par la phase de croissance chez *B. anthracis*. En effet, des analyses par

microscopie immunoélectronique révèlent que la protéine Sap couvre la totalité de la cellule depuis le début de la croissance jusqu'au début de la phase stationnaire. Pendant cette période, la protéine EA1 est très faiblement représentée au niveau de la surface cellulaire. Les cellules analysées en phase stationnaire ont montré que la surface cellulaire est fortement représentée par la protéine EA1 alors que la protéine Sap est presque inexistante au niveau cellulaire, mais elle a été retrouvée dans le milieu de culture (Mignot *et al.*, 2002).

Chez les souches du groupe *Bacillus cereus*, les gènes codant pour les protéines de la couche S sont toujours précédés par le gène *csaB* qui est impliqué dans l'ancrage des protéines de la couche S à la paroi cellulaire (Mesnage *et al.*, 2000). Cependant, la structure des protéines de la couche S n'est pas conservée chez l'ensemble des souches du groupe *Bacillus cereus*.

1.8 Résumé de la problématique

Le groupe *Bacillus cereus* regroupe sept espèces très proches génétiquement; *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* et *B. weihenstephanensis*. Les souches de *B. thuringiensis* sont mésophiles. Elles sont capables à croître à 43 °C mais pas à 7 °C. Leur température optimale de croissance est 30 °C. Les souches de *B. weihenstephanensis* sont psychrotolérantes. Elles sont capables à croître à 7 °C mais pas à 43 °C. Leur température optimale de croissance se situe entre 20 °C et 30 °C.

Dans une étude précédente (Soufiane et Côté, 2009), les analyses phylogénétiques des gènes ARNr 16S, *gyrB* et *aroE* ont placé *B. thuringiensis* serovars *bolivia* et *vazensis* avec *B. weihenstephanensis*, loin des autres souches de *B. thuringiensis*. Dans une étude antérieure, l'analyse phylogénétique du gène *panC* a placé *B. thuringiensis* sérovar *navarrensensis* avec les souches de *B. weihenstephanensis* (Guinebretière *et al.*, 2008). Pour expliquer la proximité de ces trois sérovars de *B. thuringiensis* avec *B. weihenstephanensis*, nous avons étudié les caractéristiques physiologiques et

généétiques de *B. weihenstephanensis* chez *B. thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis*. Cette étude a été renforcée par une analyse phylogénétique de plusieurs gènes de ménage chez plusieurs souches de *B. thuringiensis* et *B. weihenstephanensis*. Les caractéristiques spécifiques à *B. weihenstephanensis* ont été retrouvées chez *B. thuringiensis*. Par conséquent, il devient logique d'étudier les caractéristiques de *B. weihenstephanensis* chez des souches de *B. cereus*, *B. mycoides* et *B. pseudomycoïdes*.

Il est très difficile de distinguer les souches mésophiles des souches psychrotolérantes en se basant sur des observations microscopiques. D'où la nécessité de développer une méthode moléculaire rapide et fiable pour distinguer entre les souches mésophiles et les souches psychrotolérantes.

Dans le groupe *B. cereus*, les protéines de la couche S, Sap et EA1, ont été bien étudiées chez *B. anthracis*. Cependant, la présence de ces protéines chez *B. thuringiensis* n'est pas claire. De plus, deux études distinctes ont montré que les inclusions parasporales de deux souches de *B. thuringiensis*, CTC et GP1, ne sont pas formées de protéines Cry mais de protéines de la couche S, Sap et EA1. Il devient important d'étudier la distribution des gènes *sap* (Sap) et *eag* (EA1) chez *B. thuringiensis* pour déterminer si les protéines Sap et EA1 sont exclusives aux souches *B. thuringiensis* CTC et GP1 ou non. Aussi, le contact direct des protéines de la couche S avec l'environnement permettrait d'établir une corrélation entre la psychrotolérance et la synthèse des protéines Sap et EA1 chez les souches du groupe *B. cereus*.

1.9 Objectif

L'objectif général de cette thèse consiste à déterminer si les caractéristiques physiologiques et génétiques spécifiques de l'espèce *B. weihenstephanensis* sont présentes chez certaines souches des autres espèces du groupe *B. cereus* et à étudier la distribution des gènes de la couche S, *sap* et *eag*, chez des souches de *B. thuringiensis* et des autres espèces du groupe *B. cereus*.

Les objectifs spécifiques correspondants à chacun des cinq chapitres sont les suivants :

1. Déterminer si les caractéristiques physiologiques et génétiques de *B. weihenstephanensis* sont présentes chez *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis*;
2. Déterminer la relation entre *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* avec *B. weihenstephanensis* en analysant les séquences de sept gènes de ménage à l'aide de la méthode "MLSA";
3. Déterminer si les caractéristiques physiologiques et génétiques de *B. weihenstephanensis* sont présentes chez *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides* et *B. pseudomycoides*;
4. Développer un outil moléculaire rapide et fiable pour distinguer les souches psychrotolérantes des souches mésophiles dans le groupe *B. cereus*;
5. Étudier la distribution des gènes *sap* et *eag* codant pour les protéines de la couche S, Sap et EA1, chez tous les sérovars de *B. thuringiensis*;

1.10 Hypothèses

Les caractéristiques spécifiques à *B. weihenstephanensis* sont le résultat de l'adaptation de cette espèce au froid et aux fluctuations de température. Ces caractéristiques pourraient se retrouver chez certaines souches des autres espèces du groupe *B. cereus*. Les protéines de la couche S, Sap et EA1, ont été bien étudiées chez *B. anthracis* mais pas chez *B. thuringiensis*. Leur implication dans la formation des inclusions parasporales chez les souches *B. thuringiensis* CTC et GP1 constitue une donnée importante qui devrait d'être vérifiée chez les autres souches de *B. thuringiensis*. Les hypothèses spécifiques se rattachant à chacun des cinq chapitres sont les suivantes :

1. Les souches de *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* possèdent-elles les mêmes caractéristiques physiologiques et génétiques que *B. weihenstephanensis*?
2. Les analyses phylogénétiques de sept gènes de ménage regroupent-elles *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* avec *B. weihenstephanensis*?
3. Les caractéristiques physiologiques et génétiques de *B. weihenstephanensis* sont-elles présentes chez des souches de *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides* et *B. pseudomycoides*?
4. Les substitutions nucléotidiques identifiées dans le gène *pycA* qui distinguent les souches psychrotolérantes des souches mésophiles pourraient-elles constituer des sites de restriction pour des enzymes afin de discriminer entre les deux thermogroupes?
5. Les gènes de la couche S, *sap* et *eag* sont-ils présents chez toutes les souches de *B. thuringiensis* ou bien seulement chez les souches *B. thuringiensis* CTC et GP1?

CHAPITRE II

BACILLUS THURINGIENSIS* SEROVARS *BOLIVIA*, *VAZENSIS* AND *NAVARRENSIS* MEET THE DESCRIPTION OF *BACILLUS WEIHENSTEPHANENSIS

Le contenu de ce chapitre provient d'une publication de Brahim Soufiane et Jean-Charles Côté (2010). *Bacillus thuringiensis* serovars *bolivia*, *vazensis* and *navarrensis* meet the description of *Bacillus weihenstephanensis*. Current Microbiology 60 : 343-349.

Résumé

Le groupe *Bacillus cereus sensu lato* comprend six espèces génétiquement très proches : *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis* et *B. cytotoxicus*. L'espèce de *Bacillus thuringiensis* est mésophile. Elle est distinguée des autres membres du groupe de *B. cereus* par l'apparition d'une inclusion parasporale au moment de la sporulation. L'espèce de *B. weihenstephanensis* est psychrotolérante. Elle est capable à croître à 7 °C, mais pas à 43 °C. En plus, elle est caractérisée par la présence de deux séquences signatures spécifiques au niveau des gènes ARNr 16S (codant pour la petite sous-unité ribosomale) et *cspA* (codant pour la protéine majeure liée au choc au froid). Lors de deux études précédentes portant sur l'analyse des séquences de cinq gènes : ARNr 16S, *gyrB*, *aroE*, *panC* et *cspA*, *B. thuringiensis* sérovars *bolivia*, *vazensis*, *navarrensensis*, *azorensis* et *asturiensis* ont été regroupées avec *B. weihenstephanensis* et loin des autres souches de *B. thuringiensis*. Dans cette étude, les cinq souches de *B. thuringiensis* ont été cultivées à 7 °C et à 43 °C. Ensuite, les séquences signatures au niveau des gènes ARNr 16S et *cspA*, spécifiques à *B. weihenstephanensis* ont été déterminées. En se basant sur les résultats de croissance à 7 °C et à 43 °C ainsi que les séquences signatures au niveau des gènes ARNr 16S et *cspA*, les souches *B. thuringiensis* sérovars *bolivia*, *vazensis* et *navarrensensis* possèdent les mêmes caractéristiques que *B. weihenstephanensis*.

***Bacillus thuringiensis* serovars *bolivia*, *vazensis* and *navarrensis*
meet the description of *Bacillus weihenstephanensis***

Brahim Soufiane and Jean-Charles Côté

Agriculture and Agri-Food Canada, Research Centre, 430 Gouin Blvd,
Saint-Jean-sur-Richelieu, Quebec, Canada, J3B 3E6

Correspondence to Jean-Charles Côté

e-mail: Jean-Charles.Cote@agr.gc.ca

Tel: 1-450-515-2137

Fax: 1-450-346-7740

Short title: *B. thuringiensis* and *B. weihenstephanensis*

Abstract

The *Bacillus cereus sensu lato* group comprises six related species: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* and *B. weihenstephanensis*. *Bacillus thuringiensis* is a mesophile. It is distinguished from other members of the *B. cereus* group by the apparition of an inclusion body upon sporulation. *B. weihenstephanensis*, however, is a psychrotolerant. It grows at 7°C but not at 43°C. It is further characterised by the presence of specific signature sequences on two genes, the 16S rRNA gene (the small subunit ribosomal RNA gene) and *cspA* (encoding the major cold shock protein). Five *B. thuringiensis* serovars selected from previous studies, *bolivia*, *vazensis*, *navarrensis*, *azorensis* and *asturiensis* were studied here for their capability to grow at 7°C but not at 43°C. Next, their 16S rRNA and *cspA* genes were analysed for the presence of *B. weihenstephanensis*-specific signature sequences. *Bacillus thuringiensis* serovars *bolivia*, *vazensis* and *navarrensis* met the description of *B. weihenstephanensis*.

Introduction

The *Bacillus cereus sensu lato* group comprises six related species: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* [4], *B. pseudomycooides* [10] and *B. weihenstephanensis* [9]. They are gram-positive, rod-shaped, aerobic, spore-forming bacteria [4]. *Bacillus thuringiensis* was first described nearly a century ago [2]. Its description has been refined over the last several decades [4]. It is often presented as an insecticidal bacterium (reviewed in [6]), but the number of strains actually insecticidal is limited [5]. The wide diversity of *B. thuringiensis* isolates has been classified into 69 H serotypes and 80 serovars [8]. *Bacillus weihenstephanensis* was first described a decade ago [9]. It is distinguished from the other species in the *B. cereus sensu lato* group on the basis of some key physiological and genetic differences. It is psychrotolerant, grows aerobically at 7°C but not at 43°C, and is further characterised by the presence of specific signature sequences on two genes, the 16S rRNA gene (the small subunit ribosomal RNA gene) and *cspA* (encoding the major cold shock protein).

We recently investigated the capability of each of three genes, 16S rRNA, *gyrB* (encoding the subunit B protein of DNA gyrase, topoisomerase type I) and *aroE* (encoding the shikimate dehydrogenase), to discriminate, first, among *B. thuringiensis* H serotypes; second, among *B. thuringiensis* serovars from same H serotype and third, among *B. thuringiensis* strains from same serovar [13]. Bacteria in the *B. cereus sensu lato* group were added for comparison purposes. Surprisingly enough, out of the 25 *B. thuringiensis* serovars studied, two, namely *bolivia* and *vazensis*, were phylogenetically closer to *B. weihenstephanensis* than to the other *B. thuringiensis* serovars. In a study on the genetic diversity of the *B. cereus sensu lato* group conducted at the same time, Guinebretière *et al.* [7] showed that five *B. thuringiensis* serovars were grouped with *B. weihenstephanensis*. These were: *bolivia* and *vazensis*, also revealed in our study [13], and *navarrensensis*, *azorensis* and *asturiensis*. These five *B. thuringiensis* serovars; *bolivia*, *vazensis*, *navarrensensis*, *azorensis* and *asturiensis* were studied here for their capability to grow aerobically at 7°C but not at 43°C. Next, their 16S rRNA and *cspA* genes were analysed for the presence of *B. weihenstephanensis*-specific signature sequences. These should help better clarify the relationships between *B. thuringiensis*

serovars *bolivia*, *vazensis*, *navarrensis*, *azorensis* and *asturiensis* and *B. weihenstephanensis* based on key physiological and genetic characteristics specific to the latter.

Materials and Methods

Bacterial strains, culture conditions and DNA isolation

The bacterial strains used in the present study are listed in Table 1. When necessary, bacterial strains were cultured and their total DNAs isolated as described previously [12, 16]. *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada) was used for cloning PCR fragments. It was cultured as described elsewhere [12, 16].

Bacterial cultures at 7 and 43°C

Seven *B. thuringiensis* serovars; *konkukian*, *kurstaki*, *bolivia*, *vazensis*, *navarrensis*, *azorensis* and *asturiensis*, and two *B. weihenstephanensis* strains, CCM 4965 and CCM 4966, were tested first for their ability to grow at 7 and 43°C in liquid medium. All nine strains were first inoculated on LB (Luria–Bertani) plates and incubated at 30°C, overnight. For each strain, a single colony was used to inoculate 30 ml of LB medium in 250 ml flasks and incubated at 7 and 43°C, respectively, on a rotary shaker (180 rpm). Bacterial growth was monitored by recording O.D. at 600 nm at different intervals. These were 0, 27, 30, 50, 73 and 145 h for the cultures at 7°C, and 0, 2, 4, 6, 23 and 30 h for the cultures at 43°C. The rich LB medium was selected to support growth and prevent premature sporulation. Second, the bacterial strain's ability to grow at 7°C was further assessed by inoculating them on LB plates and incubating at 7°C for 14 days.

16S rRNA gene

The 43 bacterial strains used for analysing the 16S rRNA gene signature sequence are listed in Table 1. These bacterial strains encompass 27 *Bacillus thuringiensis* serovars

and four *B. cereus*, three *B. anthracis*, four *B. mycoides* and five *B. weihenstephanensis* strains. The genomes had been fully sequenced for eight of these 43 bacterial strains: *B. thuringiensis* serovar *konkukian*, three of the four *B. cereus* strains, the three *B. anthracis* strains and *B. weihenstephanensis* strain KBAB4. Their sequences were available from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Their 16S rRNA gene nucleotide sequences were retrieved directly. The 16S rRNA gene nucleotide sequence of *B. weihenstephanensis* WSBC 10204^T was reported by Lechner *et al.* [9]. The 16S rRNA gene nucleotide sequences of the other 34 bacterial strains were determined in a previous study following specific PCR amplification and DNA cloning [13].

cspA gene amplification

The 25 bacterial strains used for analysing the nucleotide sequences of the *cspA* gene (coding for the major cold shock protein) are listed in Table 1. The *cspA* gene was amplified with primer pair *cspA*-F1/-R1: *cspA*-F1 (5'-ATTTGATAATGTGTGGATTC-3') and *cspA*-R1 (5'-GCCATCCTTTTTTYATMAT-3'). Primers were designed based on the consensus sequence of the *cspA* gene in *B. thuringiensis* serovar *konkukian*, *B. cereus* ATCC 14579, *B. cereus* ATCC 10987, *B. cereus* E33L, *B. weihenstephanensis* strain KBAB4, *B. anthracis* Ames Ancestor, *B. anthracis* Ames and *B. anthracis* Sterne, all publicly available from GenBank. The *cspA* gene is 204 bp in length. The 5' end of primer *cspA*-F1 is located 80 nucleotides upstream on the *cspA* gene ATG initiation codon. The 5' end of primer *cspA*-R1 is located 31 nucleotides downstream of the TAA stop codon. A 315-bp amplification product would be expected. The *cspA* gene signature sequences of *B. weihenstephanensis* WSBC 10204^T was reported by Lechner *et al.* [9]. The *cspA* gene of the other 16 strains was amplified for 30 cycles at a denaturing temperature of 95°C for 30 s, annealing at 41°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s.

DNA cloning and sequencing

Cloning of the amplified products, selection of transformants, isolation and analyses of recombinant plasmids, and determination of the nucleotide sequences were done as

described previously [12, 16]. Briefly, the amplified DNAs were cloned into pCR2.1-TOPO cloning vector using the TOPO TA Cloning kit (Invitrogen Canada) following the manufacturer's instructions. Transformants were selected on LB agar plates supplemented with kanamycin (50 µg/ml) and X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside; 40 µg/ml). Recombinant plasmids were isolated using the alkaline-lysis method [3] with some modifications [14, 15], digested with *EcoRI* and visualised on agarose gels to confirm the presence of an inserted fragment.

The nucleotide sequences were determined by the dideoxynucleotide chain-termination method [11] using a capillary array automated DNA sequencer (ABI3730xl DNA Analyzer, Applied Biosystems, Foster, CA, USA). The sequences were determined for both strands.

Nucleotide sequence accession number

Sequence data from the present study have been deposited with GenBank under accession no. FJ177016 to FJ177029 and FJ358615 to FJ358619.

Results

Bacterial growth curves

Bacillus thuringiensis is a mesophilic species. *Bacillus thuringiensis* strains do not grow at 7°C but grow at 43°C. Conversely, *B. weihenstephanensis* is a psychrotolerant species. *B. weihenstephanensis* strains are characterised by their ability to grow at 7°C but not at 43°C. Here, capabilities of *B. thuringiensis* serovars *bolivia*, *vazensis*, *navarrensis*, *azorensis* and *asturiensis* to grow at 7°C and 43°C were monitored. Two *B. thuringiensis* serovars, *konkukian* and *kurstaki*, and two *B. weihenstephanensis* strains, CCM 4965 and CCM 4966 were included as controls. Growth curves in LB broth are shown in Fig. 1. As expected, *B. thuringiensis* serovars *azorensis* and *asturiensis* did not grow at 7°C but grew at 43°C, like *B. thuringiensis* serovars

konkukian and *kurstaki*. Interestingly, however, *B. thuringiensis* serovars *bolivia*, *vazensis* and *navarrensis* grew at 7°C (Fig. 1a) but not at 43°C (Fig. 1b), like *B. weihenstephanensis* strains CCM 4965 and CCM 4966.

These results were further confirmed by monitoring the bacterial strains ability to grow at 7°C on LB plates over a 14-day period. Here also, *B. thuringiensis* serovars *azorensis* and *asturiensis*, like serovars *konkukian* and *kurstaki*, did not grow at 7°C. Serovars *bolivia*, *vazensis* and *navarrensis*, however, like *B. weihenstephanensis* CCM 4965 and CCM 4966, grew at 7°C.

16S rRNA gene signature sequence

The 16S rRNA gene sequences were analysed in the 43 bacterial strains listed in Table 1. The *B. weihenstephanensis* species is characterised by the presence of a 16S rRNA gene signature sequence ¹⁰⁰³TCTAGAGATAGA, specific to psychrotolerant strains. All five *B. weihenstephanensis* strains listed in Table 1 harboured this signature sequence. Interestingly, this was also the case for *B. thuringiensis* serovars *bolivia*, *vazensis* and *navarrensis*. Two of the four *B. mycoides* strains, namely BGSC 6A20 and ATCC 6462 harboured the same signature sequence. *B. thuringiensis* serovars *azorensis* and *asturiensis*, like the 22 other *B. thuringiensis* serovars, the other two *B. mycoides* strains, BGSC 6A13 and 6A19, the four *B. cereus* and the three *B. anthracis* strains all harboured the different ¹⁰⁰³CCTAGAGATAGG sequence, specific to mesophilic strains.

cspA gene signature sequence

A single pair of primers, *cspA*-F1/-R1, proved sufficient to amplify the *cspA* gene from 16 bacterial strains listed in Table 1. All 16 strains yielded a single amplicon of the expected size of approximately 300 bp. The *cspA* gene was cloned and analysed. DNA sequences of nine additional strains were publicly available. These 25 bacterial strains are listed in Table 1. The *B. weihenstephanensis* species is characterised by the presence of a *cspA* signature sequence ⁴ACAGTT, specific to psychrotolerant strains. All five

B. weihenstephanensis strains listed in Table 1 harboured this signature sequence. Interestingly, this was also the case for *B. thuringiensis* serovars *bolivia*, *vazensis* and *navarrensis*. One of the two *B. mycoides* strains, BGSC 6A20, harboured the same signature sequence. *B. thuringiensis* serovars *azorensis* and *asturiensis*, like the seven other *B. thuringiensis* serovars, the other *B. mycoides* strain, BGSC 6A13, the four *B. cereus* and the three *B. anthracis* strains all harboured the different ⁴GCAGTAA sequence, specific to mesophilic strains.

Discussion

In a previous study, we showed that *B. thuringiensis* serovars *bolivia* and *vazensis* 16S rRNA, *gyrB* and *aroE* gene nucleotide sequences were more closely related to *B. weihenstephanensis* orthologous sequences than to those of *B. thuringiensis* [13]. Whether these two *B. thuringiensis* serovars shared other characteristics with *B. weihenstephanensis* was unknown. We have shown here that *B. thuringiensis* serovars *bolivia*, *vazensis* and *navarrensis* were closely related to *B. weihenstephanensis* based on their capability to grow at 7°C in broth but not at 43°C. This was further confirmed by growth on Petri dishes at 7°C. In addition, these three *B. thuringiensis* serovars, *bolivia*, *vazensis* and *navarrensis*, shared the *B. weihenstephanensis* psychrotolerant-specific 16S rRNA and *cspA* gene signature sequences. These results are in agreement with those published very recently by Guinebretière *et al.* [7]. Because this latter paper indicated that *B. thuringiensis* serovars *asturiensis* and *azorensis* were also grouped with the *B. weihenstephanensis* psychrotolerant strains, on the basis of molecular and phenotypic data, they were added in our current study. Our results with both serovars, however, differ. Here, *B. thuringiensis* serovars *asturiensis* and *azorensis* did not grow at 7°C in broth but grew at 43°C. This was further confirmed by an absence of growth on Petri dishes incubated at 7°C over an extended period. In addition, these two *B. thuringiensis* serovars, *asturiensis* and *azorensis*, did not share the *B. weihenstephanensis* 16S rRNA and *cspA* gene signature sequences, but shared the 16S rRNA and *cspA* gene sequences present in the mesophilic strains under study.

In conclusion, based on growth at 7°C and absence of growth at 43°C, and based on specific 16S rRNA and *cspA* gene signature sequences, *B. thuringiensis* serovars *bolivia*, *vazensis* and *navarrensis* met the description of *B. weihenstephanensis* [9].

Interestingly, at the time this manuscript was under consideration for publication, Bartoszewicz *et al.* [1] have shown that several *B. thuringiensis* isolates, from soil and milk, displayed genetic and psychrotrophic properties characteristic of *B. weihenstephanensis*. Clearly, the presence of *B. weihenstephanensis*-like bacteria in the *B. thuringiensis* species may be more common than initially expected. We have shown here that at least three *B. thuringiensis* serovars: *bolivia*, *vazensis* and *navarrensis* met the description of *B. weihenstephanensis*. In addition, two *B. mycoides* strains, BGSC 6A20 and ATCC 6462 harboured the 16S rRNA gene signature sequence specific to psychrotolerant strains. These findings raise several questions. First, *B. thuringiensis* isolates are distinguished from other *B. cereus* by the presence of a parasporal inclusion body. What is the nature, if any, of the parasporal inclusion bodies in *B. thuringiensis* serovars *bolivia*, *vazensis* and *navarrensis*? Second, have *B. mycoides* strains BGSC 6A20 and ATCC 6462 correctly been assigned to the *B. mycoides* species? Third, *B. weihenstephanensis* is distinguished from the other species in the *B. cereus sensu lato* group on the basis of it grows aerobically at 7°C but not at 43°C, and is further characterised by the presence of specific signature sequences on 16S rRNA and *cspA* genes [9]. Should *B. thuringiensis* and *B. mycoides* that meet this description be classified as *B. weihenstephanensis*? Is *B. weihenstephanensis* a psychrotolerant variant of *B. cereus*? These are the type of questions that cannot be answered here but we are planning to address in the near future.

References

1. Bartoszewicz M, Bideshi DK, Kraszewska A, Modzelewska E, Swiecicka I (2009) Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* display genetic and psychrotrophic properties characteristic of *Bacillus weihenstephanensis*. *J Appl Microbiol* 106:1967–1975
2. Berliner E (1915) Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kühniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. *Z. Angew-Entomol* 2:29–56
3. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513–1523
4. Claus D, Berkeley RCW (1986) The genus *Bacillus*. In: Sneath PHA (ed) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 2. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA., pp 1105–1139
5. Côté J-C (2007) How early discoveries about *Bacillus thuringiensis* prejudiced subsequent research and use. In: Vincent C, Goettel MS, Lazarovits G (eds) *Biological control: a global perspective*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp 169–180
6. Glare TR, O'Callaghan M (2000) *Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety*. Wiley, Toronto, Canada
7. Guinebretière M-H, Thompson FL, 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. *Environ Microbiol* 10:851–865
8. Lecadet M-M, Frachon E, Cosmao Dumanoir V, Ripouteau H, Hamon S, Laurent P, Thiéry I (1999) Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol* 86:660–672
9. Lechner S, Mayr R, Francis KP, Prüß BM, Kaplan T, Wießner-Gunkel E, Stewart GSAB, Scherer S (1998) *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol* 48:1373–1382
10. Nakamura LK (1998) *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 48:1031–1035
11. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463–5467

12. Soufiane B, Côté J-C (2007) Flagellin (FliC) protein sequence diversity among *Bacillus thuringiensis* does not correlate with H serotype diversity. *Antonie van Leeuwenhoek* 92:449–461
13. Soufiane B, Côté J-C (2009) Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, *gyrB* and *aroE* gene sequence analyses. *Antonie van Leeuwenhoek* 95:33–45
14. Stephen D, Jones C, Schofield JP (1990) A rapid method for isolating high quality plasmid DNA suitable for DNA sequencing. *Nucleic Acids Res* 18:7463–7464
15. Xu D, Côté J-C (2003) Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:695–704
16. Xu D, Côté J-C (2006) Sequence diversity of the *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus sensu lato* flagellin (H antigen) protein: Comparison with H serotype diversity. *Appl Environ Microbiol* 72:4653–4662

Figure legend**Figure 1**

Bacterial growth curves at 7°C (**a**) and 43°C (**b**) for seven *Bacillus thuringiensis* serovars; *kurstaki*, *konkukian*, *navarrensis*, *azorensis*, *asturiensis*, *bolivia*, *vazensis* and two *Bacillus weihenstephanensis* strains; CCM 4965 and CCM 4966

Table 1 Psychrotolerant and mesophilic 16S rRNA and *cspA* gene signature sequences in *Bacillus weihenstephanensis* and other species in the *B. cereus sensu lato* group

Species	Source or strain ^a	16S rRNA gene Signature sequences	<i>cspA</i> gene Signature sequences	GenBank accession no.		
				Entire genome	16S rRNA	<i>cspA</i> gene
<i>B. weihenstephanensis</i>	WSBC 10204 ^T	TCTAGAGATAGA ^c	ACAGTT ^{d,e}		AM747230	-
<i>B. weihenstephanensis</i>	WSBC 10001	TCTAGAGATAGA	ACAGTT		EF210307	FJ177029
<i>B. weihenstephanensis</i> ^b	CCM 4965	TCTAGAGATAGA	ACAGTT		EF210282	FJ177018
<i>B. weihenstephanensis</i> ^b	CCM 4966	TCTAGAGATAGA	ACAGTT		EF210298	FJ177024
<i>B. weihenstephanensis</i>	KBAB4	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	CP000903		
<i>Bt. serovar navarrensis</i> ^b	IEBC-T50 001	TCTAGAGATAGA	ACAGTT		FJ358615	FJ358619
<i>Bt. serovar bolivia</i> ^b	IEBC-T63 001	TCTAGAGATAGA	ACAGTT		EF210299	FJ177017
<i>Bt. serovar vazensis</i> ^b	IEBC-T67 001	TCTAGAGATAGA	ACAGTT		EF210293	FJ177027
<i>B. mycoides</i>	BGSC 6A20	TCTAGAGATAGA	ACAGTT		EF210313	FJ177028
<i>B. mycoides</i>	ATCC 6462	TCTAGAGATAGA	-		EF210295	-
<i>B. mycoides</i>	BGSC 6A13	CCTAGAGATAGG	GCAGTA		EF210296	FJ177023
<i>B. mycoides</i>	BGSC 6A19	CCTAGAGATAGG	-		EF210306	-
<i>B. cereus</i>	ATCC 14579	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	AE016877		
<i>B. cereus</i>	ATCC 10987	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	AE017194		
<i>B. cereus</i>	E33L	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	CP000001		
<i>B. cereus</i>	BGSC 6A17	CCTAGAGATAGG	GCAGTA		EF210297	FJ177022
<i>B. anthracis</i>	Ames Ancestor	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	AE017334		

Table 1 continued

Species	Source or strain ^a	16S rRNA gene Signature sequences	<i>cspA</i> gene Signature sequences	GenBank accession no.		
				Entire genome	16S rRNA	<i>cspA</i> gene
<i>B. anthracis</i>	Ames	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	AE016879		
<i>B. anthracis</i>	Sterne	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	AE017225		
<i>Bt. serovar finitimus</i>	BGSC 4B2	CCTAGAGATAGG	GCAGTA		EF210291	FJ177020
<i>Bt. serovar azorensis</i> ^b	BGSC 4CB1	CCTAGAGATAGG	GCAGTA		EF210303	FJ358617
<i>Bt. serovar kurstaki</i> ^b	HD1	CCTAGAGATAGG	GCAGTA		DQ683076	FJ177016
<i>Bt. serovar alesti</i>	IEBC-T03 001	CCTAGAGATAGG	GCAGTA		EF210300	FJ177021
<i>Bt. serovar fukuokaensis</i>	IEBC-T03C001	CCTAGAGATAGG	-		EF210301	-
<i>Bt. serovar sotto</i>	IEBC-T04 001	CCTAGAGATAGG	-		EF210309	-
<i>Bt. serovar kenya</i>	IEBC-T04B001	CCTAGAGATAGG	-		EF210315	-
<i>Bt. serovar entomocidus</i>	IEBC-T06 001	CCTAGAGATAGG	-		EF210312	-
<i>Bt. serovar ostrinia</i>	IEBC-T08A001	CCTAGAGATAGG	-		EF210314	-
<i>Bt. serovar tolworthi</i>	IEBC-T09 001	CCTAGAGATAGG	-		EF210288	-
<i>Bt. serovar thompsoni</i>	IEBC-T12 001	CCTAGAGATAGG	-		EF210310	-
<i>Bt. serovar tohokuensis</i>	IEBC-T17 001	CCTAGAGATAGG	GCAGTA		EF210294	FJ177026
<i>Bt. serovar shandongensis</i>	IEBC-T22 001	CCTAGAGATAGG	-		EF210287	-
<i>Bt. serovar konkukian</i> ^b	97-27	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	AE017355		-
<i>Bt. serovar seoulensis</i>	IEBC-T35 001	CCTAGAGATAGG	-		EF210286	-
<i>Bt. serovar oswaldocruzi</i>	IEBC-T38 001	CCTAGAGATAGG	-		EF210284	-
<i>Bt. serovar higo</i>	IEBC-T44 001	CCTAGAGATAGG	-		EF210308	-

Table 1 continued

Species	Source or strain ^a	16S rRNA gene Signature sequences	<i>cspA</i> gene Signature sequences	GenBank accession no.		
				Entire genome	16S rRNA	<i>cspA</i> gene
<i>Bt.</i> serovar <i>roskildiensis</i>	IEBC-T45 001	CCTAGAGATAGG	-		EF210304	-
<i>Bt.</i> serovar <i>wratislaviensis</i>	IEBC-T47 001	CCTAGAGATAGG	-		EF210311	-
<i>Bt.</i> serovar <i>asturiensis</i> ^b	IEBC-T53 001	CCTAGAGATAGG	GCAGTA		FJ358616	FJ358618
<i>Bt.</i> serovar <i>poloniensis</i>	IEBC-T54 001	CCTAGAGATAGG	GCAGTA		EF210305	FJ177025
<i>Bt.</i> serovar <i>zhaodongiensis</i>	IEBC-T62 001	CCTAGAGATAGG	-		EF210289	-
<i>Bt.</i> serovar <i>pulsiensis</i>	IEBC-T65 001	CCTAGAGATAGG	-		EF210285	-
<i>Bt.</i> serovar <i>graciosensis</i>	IEBC-T66 001	CCTAGAGATAGG	-		EF210302	-

^a IEBC, International Entomopathogenic *Bacillus* Centre, Institut Pasteur, Paris, France; BGSC, *Bacillus* Genetic Stock Center, The Ohio State University, Columbus, OH, USA; ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA; WSBC, *B. weihenstephanensis* genomic DNA was kindly provided by the Microbial Ecology Group, Technical University of Munich, Freising, Germany; CCM, Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University Brno, Brno, Czech Republic

^b Strains used in Figure 1

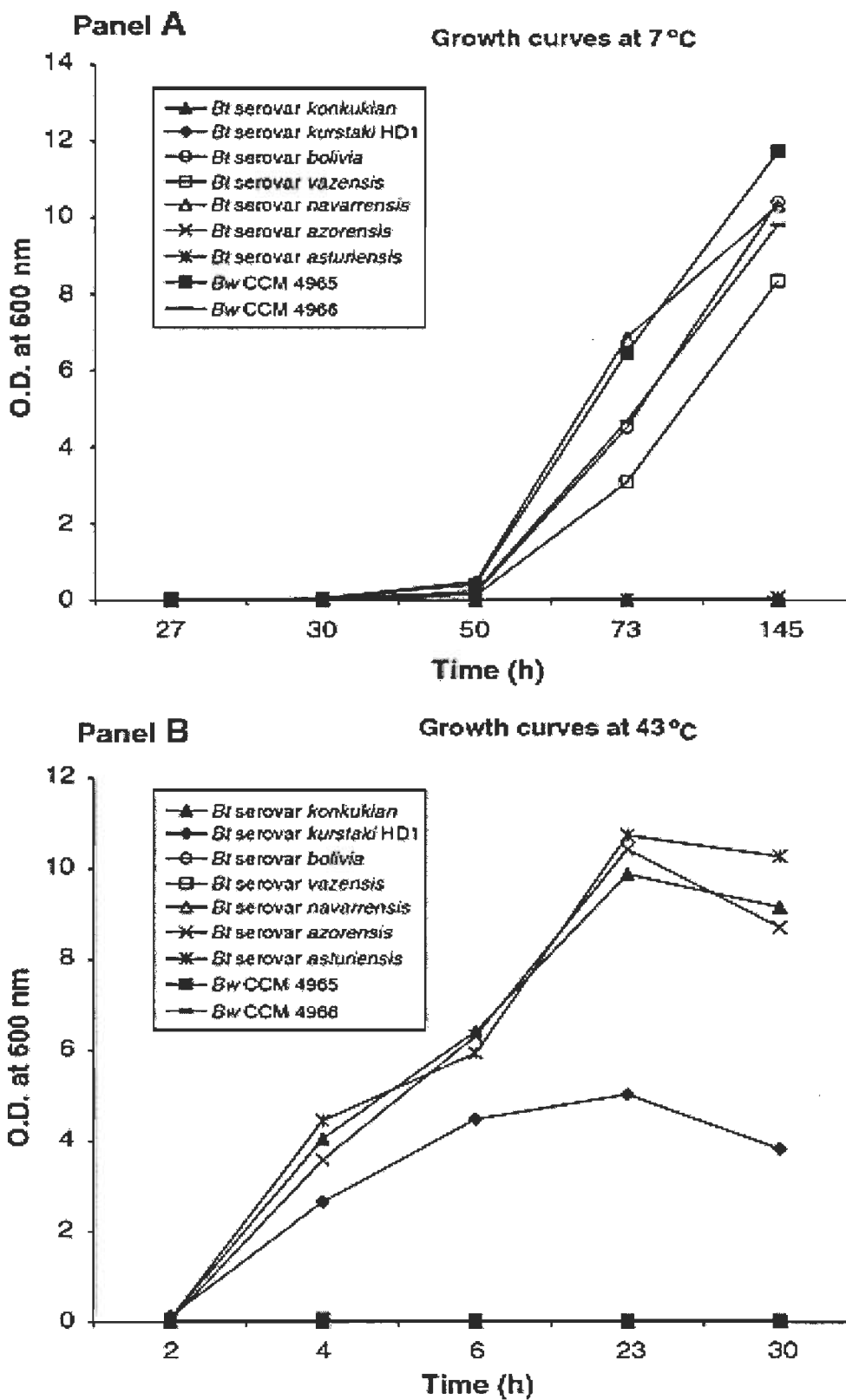
^c Bold letters, T and A, indicate nucleotides in the 16S rRNA gene signature sequences specific for psychrotolerant strains, different from those in mesophilic strains

^d Bold letters, A and T, indicate nucleotides in the *cspA* signature sequences specific for psychrotolerant strains, different from those in mesophilic strains

^e Reference [9]

^T Type strain

Figure 1



CHAPITRE III

MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SEROVARS *NAVARRENSIS*, *BOLIVIA* AND *VAZENSIS* AND *BACILLUS WEIHENSTEPHANENSIS* REVEALS A COMMON PHYLOGENY

Le contenu de ce chapitre provient d'une publication de Brahim Soufiane, Mathilde Baizet et Jean-Charles Côté (2013). *Bacillus thuringiensis* serovars *bolivia*, *vazensis* and *navarrensis* and *Bacillus weihenstephanensis* share similar housekeeping gene sequences indicative of a common phylogeny. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology 103: 195-205.

Résumé

Le groupe *Bacillus cereus sensu lato* comprend sept espèces génétiquement très proches : *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis* et *B. cytotoxicus*. L'espèce de *B. thuringiensis* se distingue des autres espèces par l'apparition au moment de la sporulation d'une inclusion parasporale. L'espèce de *B. weihenstephanensis* est distinguée par sa psychrotolérance et la présence de séquences signatures spécifiques au niveau des gènes ARNr 16S et *cspA*. Dans le but de déterminer la relation de *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* avec *B. weihenstephanensis*, des analyses phylogénétiques de sept gènes de ménages "Housekeeping genes" ont été effectuées. Les gènes *glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *purH*, *pycA* et *tpi* de plusieurs souches de *B. thuringiensis* et de *B. weihenstephanensis* ont été amplifiés et leur séquences déterminées. L'analyse par MLSA (Multilocus sequence analysis) des séquences concaténées des sept gènes de ménages place *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* avec les souches de *B. weihenstephanensis*, loin des autres souches de *B. thuringiensis*. Ce résultat indique une phylogénie commune. Aussi, des nouvelles séquences signatures et substitutions nucléotidiques spécifiques à *B. weihenstephanensis* ont été identifiées chez *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* et non chez les autres souches de *B. thuringiensis*.

Multilocus sequence analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis* and *Bacillus weihenstephanensis* reveals a common phylogeny

Brahim Soufiane^{1,2}, Mathilde Baizet¹ and Jean-Charles Côté¹

¹ Agriculture and Agri-Food Canada, Research Centre, 430 Gouin Blvd, Saint-Jean-sur-Richelieu, QC, Canada, J3B 3E6.

² Université du Québec à Trois-Rivières, Département de Chimie-Biologie, 3351 Boul. des Forges, P.O. Box 500, Trois-Rivières, QC, Canada, G9A 5H7

Correspondence to Jean-Charles Côté

e-mail: Jean-Charles.Cote@agr.gc.ca

Tel: 1-450-515-2137

Fax: 1-450-346-7740

Short title: *B. thuringiensis* and *B. weihenstephanensis*

Abstract

The *Bacillus cereus* group *sensu lato* includes six closely-related bacterial species: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycooides* and *B. weihenstephanensis*. *Bacillus thuringiensis* is distinguished from the other species mainly by the apparition of an inclusion body upon sporulation. *B. weihenstephanensis* is distinguished based on its psychrotolerance and the presence of specific signature sequences on the 16S rRNA gene and *cspA* genes. A total of seven housekeeping genes, *glpF*, *gmK*, *ilvD*, *pta*, *purH*, *pycA* and *tpi*, from different *Bacillus thuringiensis* serovars and *Bacillus weihenstephanensis* strains were amplified and their nucleotide sequences determined. A maximum likelihood phylogenetic tree was inferred from comparisons of the concatenated sequences. *Bacillus thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis* clustered not with the other *B. thuringiensis* serovars but rather with the *B. weihenstephanensis* strains, indicative of a common phylogeny. In addition, specific signature sequences and single nucleotide polymorphisms common to *B. thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis* and the *B. weihenstephanensis* strains, and absent in the other *B. thuringiensis* serovars were identified.

Keywords *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus cereus* group, phylogeny

Introduction

The *Bacillus cereus* group *sensu lato* comprises six genetically closely related species: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* and *B. weihenstephanensis*. They are gram-positive, rod-shaped, aerobic, spore-forming bacteria (Vilas-Bôas *et al.* 2007; Logan and De Vos 2009).

Bacillus weihenstephanensis is a psychrotolerant species. It grows at 7 °C but not at 43 °C. It is further characterized by the presence of specific signature sequences on two genes, the 16S rRNA gene (which codes for the RNA component of the ribosome small subunit) and *cspA* (which codes for the major cold shock protein) (Lechner *et al.* 1998). It is a contaminant of dairy products and could potentially cause food poisoning (Stenfors *et al.* 2002; Thorsen *et al.* 2006).

Bacillus thuringiensis is a mesophilic species. Its optimal growth temperature is 30 °C; it can grow at 43 °C but not at 7 °C. It is distinguished from other members of the *B. cereus* group by the formation upon sporulation of a parasporal inclusion body, the crystal. This crystal is made of proteins, the Cry proteins, which often exhibit specific insecticidal activities (Schnepf *et al.* 1998). These Cry proteins are plasmid-encoded. Several *B. thuringiensis*-based formulations have been developed for the control of insect pests in agriculture, forestry and for the control of insect vectors in several human and animal diseases (Glare and O'Callaghan 2000). The wide diversity of *B. thuringiensis* strains has been classified by H-serotyping, the immunological reaction to the bacterial flagellar antigen, into 69 H-serotypes comprising 80 serovars (Lecadet *et al.* 1999).

The present study focuses on three *Bacillus thuringiensis* serovars, *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis*, for reasons that will become clear below. *Bacillus thuringiensis* serovar *navarrensis* (serotype H50) was isolated by Iriarte *et al.* (1998) from soil samples in Spain. Its crystal was small, irregular and almost spherical, and was made of proteins of 66 Kda. No toxicity was found against the eight lepidopteran, six coleopteran and six dipteran species assayed (Iriarte *et al.* 2000). *Bacillus thuringiensis* serovar *bolivia*

(serotype H63) was isolated by Iriarte *et al.* (1998) from a dead larvae of the Andean weevil, *Rhigopsidius tucumanus*, in Bolivia. Its crystal had an unusual shape, resembling cuboid prisms, and was made of proteins of 155 Kda (Ferrandis *et al.* 1999). Slight toxicity was found against the diamondback moth, *Plutella xylostella*, and cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Bacillus thuringiensis* serovar *vazensis* (serotype H67) was isolated from soil samples in Azores (Portugal) by Cándido Santiago-Alvarez at Universidad de Córdoba, Spain (personal communication) (Lecadet *et al.* 1999). No further characterization is available on the latter.

In a previous study on the capability of specific genes to distinguish different *B. thuringiensis* serovars, we showed that the 16S rRNA, *gyrB* and *aroE* gene nucleotide sequences from *B. thuringiensis* serovars *bolivia* and *vazensis* were more closely related to the *B. weihenstephanensis* orthologous sequences than to those of the other *B. thuringiensis* serovars (Soufiane and Côté 2009). We later showed that *B. thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis* were psychrotolerant, they grew at 7 °C but not at 43 °C, and they shared the *B. weihenstephanensis*-specific 16S rRNA and *cspA* gene signature sequences (Soufiane and Côté 2010).

Multilocus sequence analysis (MLSA) has established itself as a powerful tool for the elucidation of genomic relatedness at the inter- and intraspecific level. It is widely used in bacterial taxonomy. The method rests on the comparative analysis of concatenated sequence of several evolutionary conserved housekeeping genes (Gevers *et al.* 2005). It has proven very useful in the study of the population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group (Priest *et al.* 2004).

Here, we used MLSA to determine whether *B. thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis* were genetically more closely related to the other *B. thuringiensis* serovars or to the *B. weihenstephanensis* species. A total of seven housekeeping genes were analyzed in *B. thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis*, 22 additional *B. thuringiensis* serovars, seven *B. weihenstephanensis* strains, and one strain each from the other four *B. cereus* group species. Phylogenetic trees were

constructed, first from the concatenated sequences of the seven loci, second from each of the seven loci. Next, each of the seven loci was examined to determine whether *B. weihenstephanensis*-specific signature sequences are restricted to the 16S rRNA and *cspA* genes or are more widely distributed.

Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

The 36 bacterial strains used in this study and their provenance are listed in Table 1. These include 25 *B. thuringiensis* and seven *B. weihenstephanensis* strains. *Bacillus cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides* and *B. pseudomycoides* were added for comparison purposes. When available, the nucleotide sequences of the seven housekeeping genes under study were retrieved directly from GenBank. To cover a wider range of different *B. thuringiensis* serovars and a greater diversity of *B. weihenstephanensis* strains, additional strains were included in this study. They were cultured and their total DNAs were isolated as described previously (Soufiane and Côté 2009). Presence of a parasporal inclusion body was confirmed in sporulated cultures of *B. thuringiensis* serovars *nararrensis*, *bolivia* and *vazensis*.

Housekeeping genes amplification

The seven housekeeping genes were chosen here on the basis of their proven usefulness in multilocus sequence typing for the *B. cereus* group (Priest *et al.* 2004). They are *glpF* (Glycerol uptake facilitator protein), *gmk* (Guanylate kinase), *ilvD* (Dihydroxyacid dehydratase), *pta* (Phosphate acetyltransferase), *purH* (Phosphoribosylaminoimidazole carboxamide formyltransferase), *pycA* (Pyruvate carboxylase) and *tpi* (Triosephosphate isomerase). The primer pairs of each housekeeping gene used in this study were designed based on consensus sequences between *B. thuringiensis* strain Al Hakam, *B. thuringiensis* serovar *konkukian* strain 97-27 and *B. weihenstephanensis* strain KBAB4. The primer pair sequences and the conditions of amplifications are listed in Table 2.

DNA cloning and sequencing

The cloning of the amplified housekeeping genes and the selection of transformants were done as described before (Soufiane *et al.* 2011). The isolation of recombinant plasmids was performed by using a Qiagen Spin Miniprep Kit (Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA) following the manufacturer's instructions. The nucleotide sequences were determined by the dideoxynucleotide chain-termination method (Sanger *et al.* 1977) using a capillary array automated DNA sequencer (ABI3730XL DNA Analyzer, Applied Biosystems, Foster, CA, USA). When necessary, additional internal primers were synthesized (data not shown) and used to create overlapping fragments. The nucleotide sequences were determined for both strands.

Phylogenetic analysis

The phylogenetic analysis was carried out using MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; version 5.05; Tamura *et al.* 2011). For each housekeeping gene, the nucleotide sequences from the *B. thuringiensis* and *B. weihenstephanensis* strains under study (Table 1) were aligned using Clustal W (Thompson *et al.* 1994). The nucleotide sequence alignments, first of each gene, second of the concatenated sequences were optimized manually based on the translated amino acid sequences of two reference strains, *B. thuringiensis* var. *konkukian* 97-27 and *B. weihenstephanensis* KBAB4. A supermatrix of 36 bacterial strains with their respective concatenated sequences was prepared. Phylogenies were estimated by maximum likelihood using MEGA. The maximum likelihood phylogenetic tree was tested using 1000 bootstrap replications, with the Tamura-Nei model for nucleotide substitutions (Tamura and Nei 1993), displayed and printed with Tree Explorer, all part of the MEGA software package.

Nucleotide sequence accession number

Sequences data from this study were deposited with GenBank under accession number JQ250645 to JQ250700, JQ661256 to JQ661269 and JQ728624 to JQ728651 (Table 1).

Results

Amplification of housekeeping genes

The nucleotide sequences of seven housekeeping genes, *glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *purH*, *pycA* and *tpi*, were analysed in the 25 *B. thuringiensis*, seven *B. weihenstephanensis* and one *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides* and *B. pseudomycoides* strains listed in Table 1.

For each of the seven housekeeping genes, a single pair of primers proved sufficient to amplify the respective gene. All 14 strains yielded a single amplicon of 0.5 kbp (later determined at 549 bp), 0.5 kbp (564 bp), 1.3 kbp (1292 bp), 0.5 kbp (576 bp), 1.4 kbp (1385 bp), 3.3 kbp (3293 bp) and 0.7 kbp (710 bp) in length, for *glpF*, *gmK*, *ilvD*, *pta*, *purH*, *pycA* and *tpi*, respectively (Table 2). The concatenated sequences were 8030 nucleotides in length.

Housekeeping gene phylogenetic analyses

A bootstrapped maximum likelihood phylogenetic tree was inferred from the alignment of the concatenated nucleotide sequences (Fig. 1). Three major phylogenetic groups were revealed, I, II and III. Group I contains 22 *B. thuringiensis* serovars, *B. cereus* and *B. anthracis*. This group is heterogeneous and could be further sub-divided into at least two sub-groups. Group II contains all seven *B. weihenstephanensis* strains. *Bacillus thuringiensis* serovars *navarrensensis*, *bolivia* and *vazensis* are located in group II, intertwined with the *B. weihenstephanensis* strains. In Group II, *B. weihenstephanensis* strains WSBC 10295 and WSBC 10365 are found very closely grouped, and more distant from the other *B. weihenstephanensis* strains. This pairing of *B. weihenstephanensis* strains WSBC 10295 and WSBC 10365 was also revealed in each of the seven bootstrapped maximum likelihood phylogenetic trees inferred from the seven different housekeeping genes under study (supplementary data). This is also in agreement with our earlier work on the mutually exclusive distribution of two S-layer genes, *sap* and *eag*, and a cell wall hydrolase tandem (*lytB/lytA*; Soufiane *et al.* 2011). Whereas *B. weihenstephanensis* strains WSBC 10295 and WSBC 10365 harbored the

lytB/lytA tandem, the other *B. weihenstephanensis* strains carried the *sap* and *eag* genes. This sub-clustering of *B. weihenstephanensis* strains WSBC 10295 and WSBC 10365 is indicative of two different clonal lineages originating from a common *B. weihenstephanensis* ancestor. Group III contains *B. mycoides* and *B. pseudomycoides*.

Seven bootstrapped maximum likelihood phylogenetic trees were inferred from the alignment of the nucleotide sequences of the *glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *purH*, *pycA* and *tpi* gene amplicons, respectively, to assess the congruence between each tree. They are presented in Supplementary data, Fig. S1 to S7. In each of the seven trees, three major groups were revealed, I, II and III. In each case, *B. thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis* clustered not with the 22 *B. thuringiensis* serovars, *B. cereus* and *B. anthracis* in group I, but with the seven *B. weihenstephanensis* strains in group II. Group III contained *B. mycoides* and *B. pseudomycoides*.

Housekeeping gene specific signature sequences and single nucleotide polymorphisms

Nucleotide sequence comparisons between the *B. thuringiensis* and *B. weihenstephanensis* strains revealed specific signature in the allelic sequences of five of the seven genes, *glpF*, *gmk*, *purH*, *pycA* and *tpi*, and additional specific single nucleotide polymorphisms (SNPs) were revealed in each of the seven genes. These, along with their nucleotide positions on their respective genes are shown in Table 3A and 3B, respectively. For each of the seven genes analyzed, the *B. thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis* shared the *B. weihenstephanensis* signature sequences and SNPs.

Discussion

In the *Bacillus cereus* group, the presence of a parasporal inclusion body is the single most discriminatory criterion for the identification of isolates in the *B. thuringiensis* species. Based on this, serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis* were originally correctly classified in the *B. thuringiensis* species. In the *B. cereus* group,

B. weihenstephanensis encompasses psychrotolerant isolates further characterized by specific signature sequences in the 16S rRNA and *cspA* genes (Lechner *et al.* 1998). We showed earlier that *B. thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis* were psychrotolerant and shared the 16S rRNA and *cspA* genes signature sequences typical of *B. weihenstephanensis* (Soufiane and Côté 2010). Had it not been of their earlier identification as *B. thuringiensis* species, based on the presence of a parasporal inclusion body, all three serovars could have been rightfully classified as *B. weihenstephanensis*. Both species, *B. thuringiensis* and *B. weihenstephanensis*, have been very narrowly defined which led to the conflict revealed in our previous studies on *B. thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis*.

In our current multilocus sequence analysis, a bootstrapped maximum likelihood phylogenetic tree inferred from the alignment of the concatenated nucleotide sequences of seven chromosomally encoded housekeeping genes revealed unambiguously that *B. thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis* and the *B. weihenstephanensis* strains share a common lineage, distant from the other *B. thuringiensis* serovars. Based on our earlier work and this current MLSA study, these three serovars should be re-classified as *B. weihenstephanensis*.

The genetic relationship in the *Bacillus cereus* group has been studied extensively using various methods such as multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) (Helgason *et al.* 1998, 2000), amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Hill *et al.* 2004), multilocus sequence typing (MLST; Helgason *et al.* 2004; Priest *et al.* 2004). Recently, an MLST-based supertree was generated (Tourasse and Kolstø 2008). Three clusters were revealed. Cluster I contained *B. anthracis* and related *B. cereus* and *B. thuringiensis* strains, cluster II comprised other *B. cereus* and *B. thuringiensis* strains, cluster III harbored the *B. weihenstephanensis* and *B. mycoides* strains. Clearly, *B. thuringiensis* and *B. weihenstephanensis* strains are genetically distinct enough as to cluster separately, lending additional support to our above proposal based on genetic data to re-classify the *B. thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis* into the *B. weihenstephanensis* species.

In *B. thuringiensis*, the *cry* genes are plasmid-encoded. They can be lost, gained, exchanged. A plasmid-cured *B. thuringiensis* strain does not produce a parasporal inclusion body and qualifies as a *B. cereus* strain. Conversely, a *B. cereus* strain transformed with a plasmid harboring a *cry* gene that leads to the accumulation of Cry proteins and crystal formation will be classified as *B. thuringiensis* (González *et al.* 1981, 1982). Such transformation has not been studied in *B. weihenstephanensis* but it is interesting to hypothesize that this mechanism may have been at work in ancestral *B. weihenstephanensis* strains that led to the apparition of what would become known as *B. thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis*.

Following the initial identification of a *B. thuringiensis* isolate based on the presence of a parasporal inclusion body, further classification is often based on H-serotyping, the immunological reaction to the flagellar antigen, to determine whether the isolate belongs to a known serovar or is a novel one. The latter was the case for the then newly recognized *B. thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis*. Interestingly, Shisa *et al.* (2002) showed an extremely high frequency of common flagellar antigens between *B. thuringiensis* and *B. cereus*. Moreover, in a separate study, we showed that the flagellin (*hag*) gene was present not only in the *B. thuringiensis* serovars but in all species of the *B. cereus* group, including *B. weihenstephanensis* strains (Xu and Côté 2006). These suggest that *B. weihenstephanensis* strains are amenable to H-serotyping possibly as exemplified here with *B. thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis*.

Serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis* are not the only bacterial strains identified as *B. thuringiensis* that share genetic and psychrotolerant properties typical of *B. weihenstephanensis*. Recently, some natural isolates of *B. thuringiensis*, defined by their capability to produce a parasporal inclusion body, were found to be psychrotolerant and to harbor the *B. weihenstephanensis*-specific 16S rRNA and *cspA* gene signature sequences (Bartoszewicz *et al.* 2009). It would be interesting to conduct an MLSA study similar to our on these bacterial strains to determine whether or not they also carry the *B. weihenstephanensis* signature sequences and SNPs identified here. Interestingly, it

has been postulated that the geographic distribution of psychrotolerant and mesophilic *B. thuringiensis* might be climate-related (Bartoszewicz *et al.* 2009). In an earlier study, the geographic distribution of psychrotolerant *B. weihenstephanensis* and mesophilic *B. cereus* isolates was found to depend significantly on the prevalent annual average temperature (von Stetten *et al.* 1999).

Finally, in our study, *B. weihenstephanensis* specific signature sequences were revealed for five genes, *glpF*, *gmk*, *purH*, *pycA* and *tpi*. In addition, several *B. weihenstephanensis* SNPs were revealed from each of the seven genes studied. Clearly, *B. weihenstephanensis* specific signature sequences are not restricted to the 16S rRNA and *cspA* genes as initially described (Lechner *et al.* 1998), but are also present in at least the additional genes studied here, and most likely in many other genes.

Our results show that additional genes disseminated throughout the chromosome harbor *B. weihenstephanensis*-specific signature sequences and SNPs, indicating that genetic differences between the *B. weihenstephanensis* species and the other species in the *B. cereus* group are more widely distributed, which lends additional support to the creation of this novel species.

We are planning to follow up on this work by studying whether psychrotolerant strains harboring the *B. weihenstephanensis* 16S rRNA and *cspA* gene signature sequences, and the additional signature sequences and SNPs identified here on the seven housekeeping genes studied, can be found in the other species of the *Bacillus cereus* group: *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. mycoides* and *B. pseudomycoides*. This would shed additional lights on the overall distribution of psychrotolerant strains in the *B. cereus* group.

References

- Bartoszewicz M, Bideshi DK, Kraszewska A, Modzelewska E, Swiecicka I (2009) Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* display genetic and psychrotrophic properties characteristic of *Bacillus weihenstephanensis*. *J Appl Microbiol* 106:1967–1975
- Ferrandis MD, Andrew R, Porcar M, Iriarte J, Cosmao-Dumanoir V, Lecadet M-M, Caballero P, Ferré J (1999) Characterization of *Bacillus thuringiensis* serovar *bolivia* (serotype H63), a novel serovar isolated from the Bolivian high valleys. *Lett Appl Microbiol* 28:440–444
- Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, Stackebrandt E, Van de Peer Y, Vandamme P, Thompson FL, Swings J (2005) Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol* 3:733–739
- Glare TR, O’Callaghan M (2000) *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. John Wiley and Sons, Toronto, Canada
- González JM Jr., Dulmage HT, Carlton BC (1981) Correlation between specific plasmid and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* 5:351–365
- González JM Jr., Brown BJ, Carlton BC (1982) Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:6951–6955
- Helgason E, Caugant DA, Lecadet MM, Chen Y, Mahillon J, Lövgren A, Hegna I, Kvaløy K, Kolstø A-B (1998) Genetic diversity of *Bacillus cereus*/*B. thuringiensis* isolates from natural sources. *Curr Microbiol* 37:80–87
- Helgason E, Økstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, Hegna I, Kolstø A-B (2000) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* 66:2627–263
- Helgason E, Tourasse NJ, Meisal R, Caugant DA, Kolstø A-B (2004) Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol* 70:191–201
- Hill KK, Ticknor LO, Okinaka RT, Asay M, Blair H, Bliss KA, Laker M, Pardington PE, Richardson AP, Tonks M, Beecher DJ, Kemp JD, Kolstø A-B, Lee Wong AC, Keim P, Jackson PJ (2004) Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol* 70:1068–1080

- Iriarte J, Bel Y, Ferrandis MD, Andrew R, Murillo J, Ferré J, Caballero P (1998) Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. *System Appl Microbiol* 21:97–106
- Iriarte J, Cosmao Dumanoir V, Bel Y, Porcar M, Ferrandis MD, Lecadet M-M, Ferré J, Caballero P (2000) Characterization of *Bacillus thuringiensis* ser. *balearica* (serotype H48) and ser. *navarrensensis* (serotype H50): Two novel serovars isolated in Spain. *Curr Microbiol* 40:17–22
- Lecadet M-M, Frachon E, Cosmao Dumanoir V, Ripouteau H, Hamon S, Laurent P, Thiéry I (1999) Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol* 86:660–672
- Lechner S, Mayr R, Francis KP, Prüß BM, Kaplan T, Wießner-Gunkel E, Stewart GSAB, Scherer S (1998) *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol* 48:1373–1382
- Logan NA, De Vos P (2009) Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174 dans P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer, W. B. Whitman (eds) *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, vol. 3. 2nd edn. NY, Springer, New York, USA, pp 21–128
- Priest FG, Barker M, Baillie LWJ, Holmes EC, Maiden MCJ (2004) Population Structure and Evolution of the *Bacillus cereus* Group. *J Bacteriol* 186:7959–7970
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463–5467
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean HD (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:775–806
- Shisa N, Wasano N, Ohgushi A, Lee D-H, Ohba M (2002) Extremely high frequency of common flagellar antigens between *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 213:93–96
- Soufiane B, Côté J-C (2009) Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, *gyrB* and *aroE* gene sequence analyses. *Antonie van Leeuwenhoek* 95:33–45
- Soufiane B, Côté J-C (2010) *Bacillus thuringiensis* serovars *bolivia*, *vazensis* and *navarrensensis* meet the description of *Bacillus weihenstephanensis*. *Current Microbiology* 60:343–349

- Soufiane B, Sirois M, Côté J-C (2011) Mutually exclusive distribution of the *sap* and *eag* S-layer genes and the *lytB/lytA* cell wall hydrolase genes in *Bacillus thuringiensis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 100:349–364
- Stenfors LP, Mayr R, Scherer S, Granum PE (2002) Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. *FEMS Microbiol Lett* 215:47–51
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Bio Evol* 10:512–526
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Likelihood, Distance, and Parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22:4673–4680
- Thorsen L, Hansen BM, Nielsen KF, Hendriksen NB, Phipps RK, Budde BB (2006) Characterization of Emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a New Cereulide-Producing Bacterium. *Appl Environ Microbiol* 72:5118–5121
- Tourasse NJ, Kolstø A-B (2008) SuperCAT: a supertree database for combined and integrative multilocus sequence typing analysis of the *Bacillus cereus* group of bacteria (including *B. cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*). *Nucleic Acids Res* 36:D461–D468
- Vilas-Bôas GT, Peruca AP, Arantes OM (2007) Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol* 53:673–687
- von Stetten F, Mayr R, Scherer S (1999) Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. *Environ Microbiol* 1:503–515
- Xu D, Côté J-C (2006) Sequence diversity of the *Bacillus thuringiensis*, and *B. cereus sensu lato* flagellin (H-antigen) protein: Comparison with H serotype diversity. *Appl Environ Microbiol* 72:4653–4662

Figure legends

Figure 1

Bootstrapped maximum likelihood phylogenetic tree inferred from the concatenated sequences of seven genes for *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), *B. weihenstephanensis* (*Bw*), *Bacillus anthracis* (*Ba*), *Bacillus cereus* (*Bc*), *Bacillus mycoides* (*Bm*) and *Bacillus pseudomycooides* (*Bpm*). Bootstrap values higher than 50% (of 1000 cycles) are indicated. Roman numerals, I, II and III, refer to the three clusters. The horizontal bar represents 1% differences in nucleotide identities. Type strains are indicated by the superscript ^T.

Figure legends of the Supplementary data

Figure S1

Bootstrapped maximum likelihood tree of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), *B. weihenstephanensis* (*Bw*), *Bacillus anthracis* (*Ba*), *Bacillus cereus* (*Bc*), *Bacillus mycoides* (*Bm*) and *Bacillus pseudomycooides* (*Bpm*) inferred from the alignment of *glpF* gene nucleotide sequences. Bootstrap values higher than 50% are indicated. Roman numerals, I, II and III, refer to the three clusters. The horizontal bar represents 1% differences in nucleotide identities. Type strains are indicated by the superscript ^T.

Figure S2

Bootstrapped maximum likelihood tree of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), *B. weihenstephanensis* (*Bw*), *Bacillus anthracis* (*Ba*), *Bacillus cereus* (*Bc*), *Bacillus mycoides* (*Bm*) and *Bacillus pseudomycooides* (*Bpm*) inferred from the alignment of *gmk* gene nucleotide sequences. Bootstrap values higher than 50% are indicated. Roman numerals, I, II and III, refer to the three clusters. The horizontal bar represents 1% differences in nucleotide identities. Type strains are indicated by the superscript ^T.

Figure S3

Bootstrapped maximum likelihood tree of *Bacillus thuringiensis* (Bt), *B. weihenstephanensis* (Bw), *Bacillus anthracis* (Ba), *Bacillus cereus* (Bc), *Bacillus mycoides* (Bm) and *Bacillus pseudomycooides* (Bpm) inferred from the alignment of *ilvD* gene nucleotide sequences. Bootstrap values higher than 50% are indicated. Roman numerals, I, II and III, refer to the three clusters. The horizontal bar represents 2% differences in nucleotide identities. Type strains are indicated by the superscript ^T.

Figure S4

Bootstrapped maximum likelihood tree of *Bacillus thuringiensis* (Bt), *B. weihenstephanensis* (Bw), *Bacillus anthracis* (Ba), *Bacillus cereus* (Bc), *Bacillus mycoides* (Bm) and *Bacillus pseudomycooides* (Bpm) inferred from the alignment of *pta* gene nucleotide sequences. Bootstrap values higher than 50% are indicated. Roman numerals, I, II and III, refer to the three clusters. The horizontal bar represents 0.5% differences in nucleotide identities. Type strains are indicated by the superscript ^T.

Figure S5

Bootstrapped maximum likelihood tree of *Bacillus thuringiensis* (Bt), *B. weihenstephanensis* (Bw), *Bacillus anthracis* (Ba), *Bacillus cereus* (Bc), *Bacillus mycoides* (Bm) and *Bacillus pseudomycooides* (Bpm) inferred from the alignment of *purH* gene nucleotide sequences. Bootstrap values higher than 50% are indicated. Roman numerals, I, II and III, refer to the three clusters. The horizontal bar represents 2% differences in nucleotide identities. Type strains are indicated by the superscript ^T.

Figure S6

Bootstrapped maximum likelihood tree of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and *B. weihenstephanensis* (Bw), *Bacillus anthracis* (Ba), *Bacillus cereus* (Bc), *Bacillus mycoides* (Bm) and *Bacillus pseudomycooides* (Bpm) inferred from the alignment of *pycA* gene nucleotide sequences. Bootstrap values higher than 50% are indicated. Roman numerals, I, II and III, refer to the three clusters. The horizontal bar represents 2% differences in nucleotide identities. Type strains are indicated by the superscript ^T.

Figure S7

Bootstrapped maximum likelihood tree of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), *B. weihenstephanensis* (*Bw*), *Bacillus anthracis* (*Ba*), *Bacillus cereus* (*Bc*), *Bacillus mycoides* (*Bm*) and *Bacillus pseudomycooides* (*Bpm*) inferred from the alignment of *tpi* gene nucleotide sequences. Bootstrap values higher than 50% are indicated. Roman numerals, I, II and III, refer to the three clusters. The horizontal bar represents 0.5% differences in nucleotide identities. Type strains are indicated by the superscript ^T.

Table 1 *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus weihenstephanensis* strains used in this study

Species	Strain or source ^a	GenBank accession no.							
		Entire genome	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>ilvD</i>	<i>pta</i>	<i>purH</i>	<i>pycA</i>	<i>tpi</i>
<i>B. thuringiensis</i>	IBL 200		EEM97561	EEM94816	EEM96872	EEM93250	EEM98238	EEM94893	EEM93741
<i>B. thuringiensis</i>	IBL 4222		EEN04306	EEN01777	EEN03580	EEN00319	EEN04978	EEN01703	EEN00578
<i>B. thuringiensis</i>	407		EEM30150	EEM27555	EEM29709	EEM25912	EEM30826	EEM27359	EEM26222
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>chinensis</i>	CT-43	CP001907							
<i>B. thuringiensis</i>	Al Hakam	CP000485							
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>berliner</i>	ATCC 10792 ^T		EEM67409	EEM64861	EEM66876	EEM63216	EEM68048	EEM64631	EEM63400
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i>	T01001		EEM36513	EEM33916	EEM35931	EEM32284	EEM37124	EEM33682	EEM32500
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>finitimus</i>	YBT-020	CP002508							
<i>B. thuringiensis</i>	BMB 171	CP001903							
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	HD1		JQ250655	JQ250664	JQ728625	JQ661265	JQ250680	JQ728651	JQ250694
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>Sotto</i>	T04001		EEM43067	EEM40478	EEM42319	EEM38839	EEM43720	EEM40266	EEM39083
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>Pakistani</i>	T13001		EEM49141	EEM46556	EEM48386	EEM45004	EEM49740	EEM46437	EEM45314
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tochigiensis</i>	BGSC 4Y 1		EEM23890	EEM21232	EEM23070	EEM19545	EEM24496	EEM21125	EEM19815
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>pondicheriensis</i>	BGSC 4BA1		EEM78989	EEM76331	EEM78198	EEM74877	EEM79569	EEM76406	EEM75262
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>mexicanensis</i>	IEBC-T27 001		JQ250652	JQ250660	JQ728627	JQ661267	JQ250685	JQ728650	JQ250689

Table 1 continued

Species	Strain or source ^a	GenBank accession no.							
		Entire genome	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>ilvD</i>	<i>pta</i>	<i>purH</i>	<i>pycA</i>	<i>tpi</i>
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>monterrey</i>	BGSC 4AJ1		EEM61186	EEM58441	EEM60461	EEM56904	EEM61726	EEM58517	EEM57148
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>konkukian</i>	97-27	AE017355							
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>huazhongensis</i>	BGSC 4BD1		EEM85051	EEM82395	EEM84522	EEM80988	EEM85599	EEM82314	EEM81338
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>sooncheon</i>	IEBC-T41 001		JQ250656	JQ250662	JQ728631	JQ661263	JQ250681	JQ728644	JQ250693
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>navarrensis</i>	IEBC-T50 001		JQ250657	JQ250661	JQ728629	JQ661266	JQ250683	JQ728647	JQ250691
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kim</i>	IEBC-T52 001		JQ250654	JQ250663	JQ728634	JQ661269	JQ250684	JQ728643	JQ250696
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>poloniensis</i>	IEBC-T54 001		JQ250650	JQ250666	JQ728624	JQ661262	JQ250682	JQ728640	JQ250687
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>bolivia</i>	IEBC-T63 001		JQ250653	JQ250669	JQ728636	JQ661264	JQ250675	JQ728638	JQ250695
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>pulsiensis</i>	BGSC 4CC1		EEM90932	EEM88169	EEM90232	EEM86776	EEM91444	EEM88245	EEM87083
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>vazensis</i>	IEBC-T67 001		JQ250651	JQ250659	JQ728632	JQ661268	JQ250677	JQ728642	JQ250698
<i>B. weihenstephanensis</i>	KBAB4	CP000903							
<i>B. weihenstephanensis</i>	CCM 4966		JQ250658	JQ250671	JQ728626	JQ661257	JQ250686	JQ728648	JQ250688
<i>B. weihenstephanensis</i>	WSBC 10001		JQ250647	JQ250670	JQ728635	JQ661256	JQ250673	JQ728639	JQ250697
<i>B. weihenstephanensis</i>	WSBC 10067		JQ250648	JQ250665	JQ728637	JQ661258	JQ250676	JQ728649	JQ250700
<i>B. weihenstephanensis</i>	WSBC 10204 ^T		JQ250645	JQ250668	JQ728633	JQ661261	JQ250678	JQ728641	JQ250699
<i>B. weihenstephanensis</i>	WSBC 10295		JQ250646	JQ250672	JQ728628	JQ661260	JQ250674	JQ728646	JQ250690
<i>B. weihenstephanensis</i>	WSBC 10365		JQ250649	JQ250667	JQ728630	JQ661259	JQ250679	JQ728645	JQ250692

Table 1 continued

Species	Strain or source [*]	GenBank accession no.							
		Entire genome	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>ilvD</i>	<i>pta</i>	<i>purH</i>	<i>pycA</i>	<i>tpi</i>
<i>B. anthracis</i>	Ames Ancestor	AE017334							
<i>B. cereus</i>	ATCC 14579 ^T	AE016877							
<i>B. mycoides</i>	Rock1-4		ACMV01000052	ACMV01000173	ACMV01000282	ACMV01000261	ACMV01000030	ACMV01000174	ACMV01000256
<i>B. pseudomycoides</i>	DSM 12442 ^T		ACMX01000022	ACMX01000067	ACMX01000030	ACMX01000085	ACMX01000009	ACMX01000068	ACMX01000081

^{*} IEBC, International Entomopathogenic *Bacillus* Centre, Institut Pasteur, Paris, France; BGSC, *Bacillus* Genetic Stock Center, The Ohio State University, Columbus, OH, USA; ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA; WSBC, Weihenstephan *Bacillus* Collection. Microbial Ecology Group, Technical University of Munich, Freising-Weihenstephan, Germany; CCM, Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University Brno, Czech Republic

^T Type strain

Table 2 Loci analyzed, primer pair sequences and amplification conditions used

Locus	Encoded protein	Genomic position ^a	Gene length (bp)	Fragment length (bp)	Primer pairs ^b	Amplification conditions (25 cycles)
<i>glpF</i>	Glycerol uptake facilitator protein	1024765	822	549	glpF-F1: ⁵⁹ GCGTTTGTGCTGGTGTAAAGT ⁷⁸ glpF-R1: ⁶⁰⁷ CTGCAATCGGAAGGAAGA ⁵⁹⁰	Denaturation : 94 °C/60 s Annealing : 47 °C/60 s Extension : 72 °C/90 s
<i>gmK</i>	Guanylate kinase (putative)	3771942	618	564	gmK-F1: ¹ ATGAGAAGTAGAAGAGGATTGCTCATC ²⁷ gmK-R1: ⁵⁶⁴ TGTTACCAACCACAA ⁵⁴⁸	Denaturation : 94 °C/45 s Annealing : 46 °C/45 s Extension : 72 °C/90 s
<i>ilvD</i>	Dihydroxyacid dehydratase	1758896	1674	1292	ilvD-F1: ²⁹² GCAGATTCAGTAGAAACG ³⁰⁹ ilvD-R1: ¹⁵⁸³ GGTTCGGTCGTTCCATTC ¹⁵⁶³	Denaturation : 94 °C/120 s Annealing : 40 °C/90 s Extension : 72 °C/150 s
<i>pta</i>	Phosphate acetyltransferase	5215282	972	576	pta-F1: ²¹ GCAGAGCGTTTAGCAAAAGAA ⁴¹ pta-R1: ⁵⁹⁶ TGCAATGCGAGTTGCTTCTA ⁵⁷⁷	Denaturation : 94 °C/60 s Annealing : 48 °C/60 s Extension : 72 °C/75 s
<i>purH</i>	Phosphoribosylaminoimidazole carboxamide formyltransferase	327712	1536	1385	purH-F1: ⁹ GCGTGCATTAGTAAGTGT ²⁶ purH-R 1: ¹³⁹³ CTGGCATTGGGAAGAAAGC ¹³⁷⁴	Denaturation : 94 °C/105 s Annealing : 42 °C/90 s Extension : 72 °C/150 s
<i>pycA</i>	Pyruvate carboxylase	3849718	3447	3293	pycA-F1: ¹ ATGACAAAGCTGCAACGT ¹⁸ pycA-R1: ³²⁹³ TCGCCTTCTTTTACAACACTAC ³²⁷³	Denaturation : 94 °C/120 s Annealing : 42 °C/120 s Extension : 72 °C/210 s
<i>tpi</i>	Triosephosphate isomerase	4941986	756	710	tpi-F1: ¹⁰ CCAATTATCGCAGGTAAGTGG ³⁰ tpi-R1: ⁷¹⁹ GGCTCTAAGCTAGCACCGCC ⁷⁰⁰	Denaturation : 94 °C/45 s Annealing : 42 °C/45 s Extension : 72 °C/75 s

^a Respective to the *Bacillus thuringiensis* strain BMB171 genome (GenBank accession number: CP001903)

^b The superscript number indicates the nucleotide position respective to the beginning of the gene

Table 3 Housekeeping genes signature sequences (panel A) and single nucleotide polymorphisms (panel B) between the *Bacillus weihenstephanensis* (*Bw*) and *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) species

A

Species	Signature sequences									
	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>			<i>purH</i>	<i>pycA</i>				<i>tpi</i>
<i>Bw</i>	²⁵⁰ ATG	⁹⁰ AGAC	⁵³¹ CGACC	¹²⁸⁴ AGGC	⁷⁰² TTGC	⁷¹⁷ ACGC	²⁴⁵¹ TCCA	³⁰⁹⁶ TTCC	³¹⁵³ ACAACCG	¹⁵⁷ AAW
<i>Bt</i>	GGT	GGAT	TGAWA	CGGT	CTGT	TCGT	ACCG	ATCA	TCAACCA	GCR

B

Genes	Species	Single nucleotide polymorphisms																								
<i>glpF</i>	<i>Bw</i>	¹⁵⁰ G	¹⁶² A	¹⁹⁵ G	²¹³ T	²⁹⁵ C	³⁹⁴ A	⁴⁵⁶ A	⁴⁷⁷ T	⁵⁶¹ T	⁵⁸² T															
	<i>Bt</i>	T	G	A	R	A	G	T	A	R	C															
<i>gmk</i>	<i>Bw</i>	³⁶ G	⁵¹ C	¹³² A	¹⁹² A	²¹³ G	²²² A	²³⁷ T	²⁷⁹ G	³⁰⁰ G	³⁴⁵ C	⁴⁹² T														
	<i>Bt</i>	A	T	G	G	A	G	A	A	A	T	C														
<i>ilvD</i>	<i>Bw</i>	³⁹⁹ A	⁴⁴⁴ G	⁴⁵⁹ G	⁵⁰¹ C	⁸⁹⁷ G	⁹²⁴ T	⁹⁴⁵ C	¹⁰⁰⁸ C	¹⁰⁶⁹ C	¹³⁶⁸ A	¹³⁸⁹ T	¹⁴⁸⁵ A													
	<i>Bt</i>	T	A	A	T	W	M	T	T	A	T	V	G													
<i>pta</i>	<i>Bw</i>	²⁸¹ A	³⁷⁴ A	⁴⁰⁷ G																						
	<i>Bt</i>	C	T	A																						
<i>purH</i>	<i>Bw</i>	⁶⁹ T	¹⁸⁹ A	⁵⁸⁵ C	⁷⁴¹ T	⁷⁵³ C	⁷⁶² G	¹²⁶³ T	¹²⁶⁶ G																	
	<i>Bt</i>	A	G	W	R	T	A	A	A																	
<i>pycA</i>	<i>Bw</i>	³⁵¹ C	³⁶⁹ T	⁴⁰⁶ A	⁴³⁹ A	⁵⁰⁷ C	⁵¹⁶ C	⁵³⁵ G	⁶⁰⁹ G	⁶⁹³ T	⁷³⁵ T	⁷⁵⁰ C	⁷⁹⁵ A	⁸³¹ T	⁸⁸⁵ C	¹⁵⁰⁹ G	¹⁵⁸¹ G	²¹³³ A	²¹⁶⁰ G	²⁴⁰⁰ C	²⁵⁷⁷ T	²⁵⁸³ G	²⁵⁹⁸ T	²⁸⁹⁵ C	²⁹⁸¹ G	
	<i>Bt</i>	T	R	G	T	K	T	A	W	C	A	T	T	A	T	A	W	T	A	T	R	A	G	T	A	
	<i>Bw</i>	³⁰⁶³ C	³¹⁷¹ A	³¹⁸⁰ T																						
	<i>Bt</i>	T	Y	C																						
<i>tpi</i>	<i>Bw</i>	¹⁴⁸ T	³⁷⁵ T	⁴⁸² T																						
	<i>Bt</i>	C	A	C																						

The list of *Bw* and *Bt* strains is given in Table 1.

The *B. thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis* shared the *B. weihenstephanensis* signature sequences and SNPs.

The list of the housekeeping genes and their encoded proteins is given in Table 2.

The arabic numbers indicate the nucleotide position(s) of the single nucleotide polymorphisms and signature sequences.

For signature sequences (Panel A), the nucleotides in bold indicate specific substitutions.

Abbreviations are:

Symbol	Nucleotides
R	A or G
Y	C or T
W	A or T
S	C or G
M	A or C
K	G or T
V	A or C or G

Figure 1

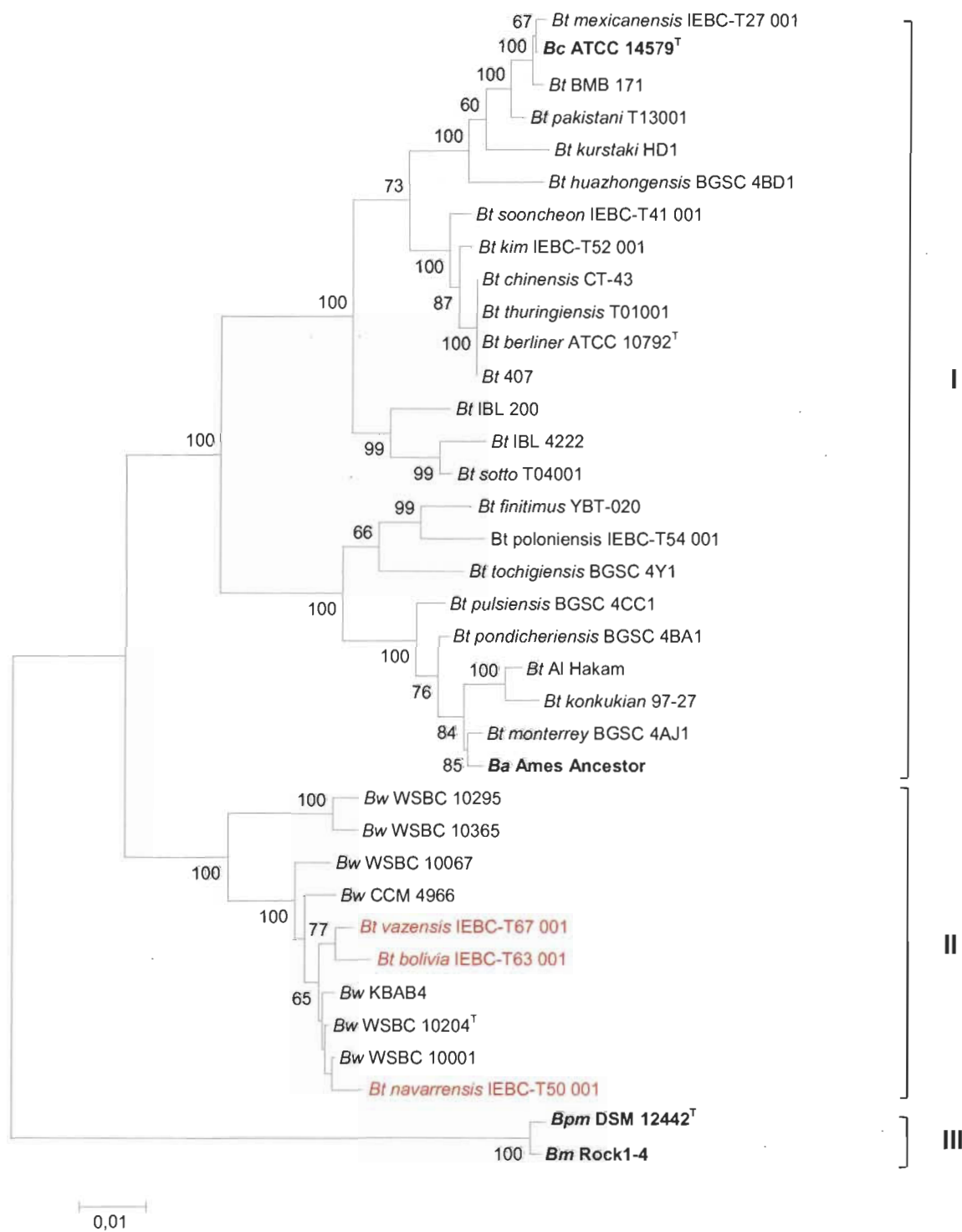


Figure S1

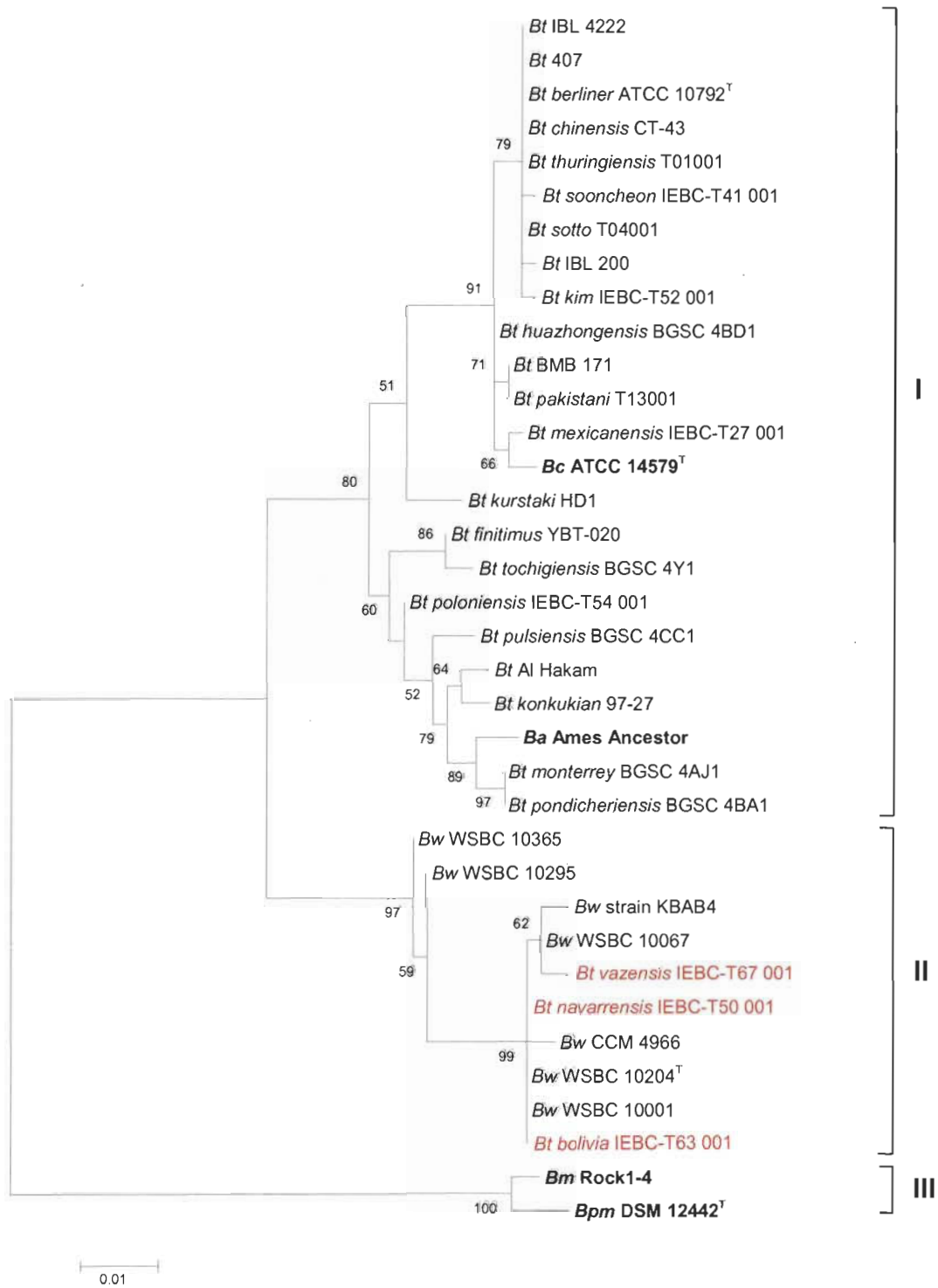


Figure S2

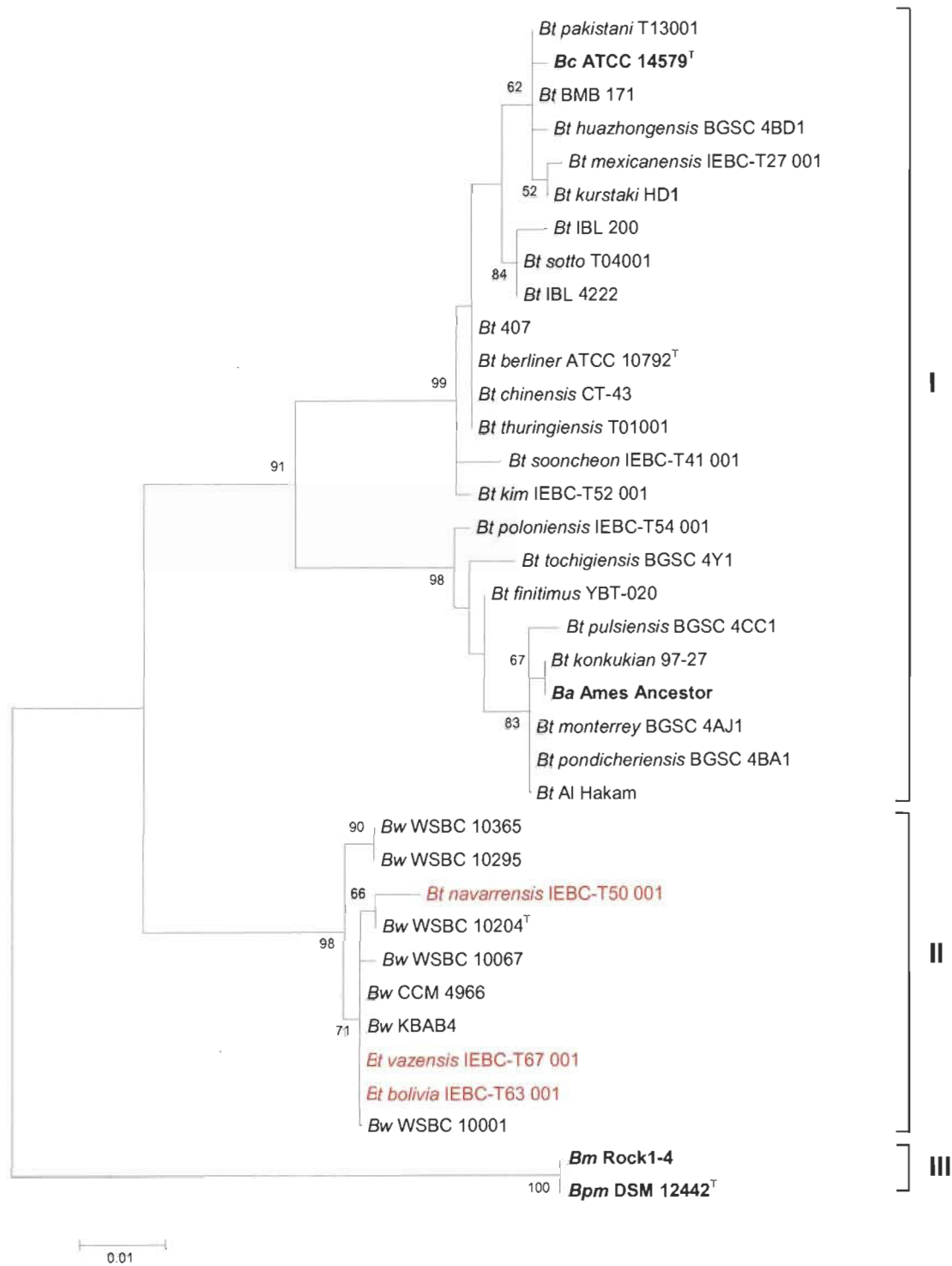


Figure S3

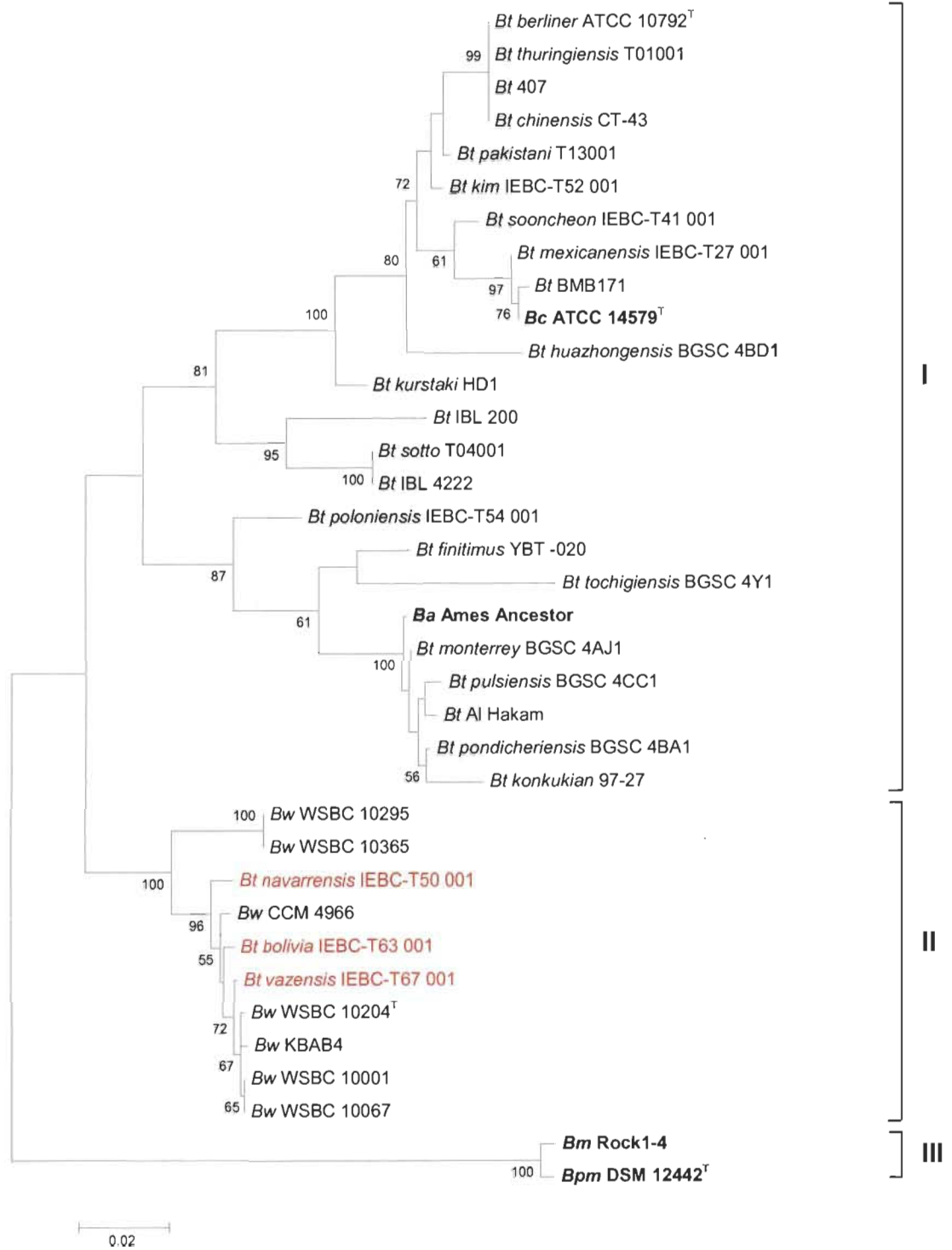


Figure S4

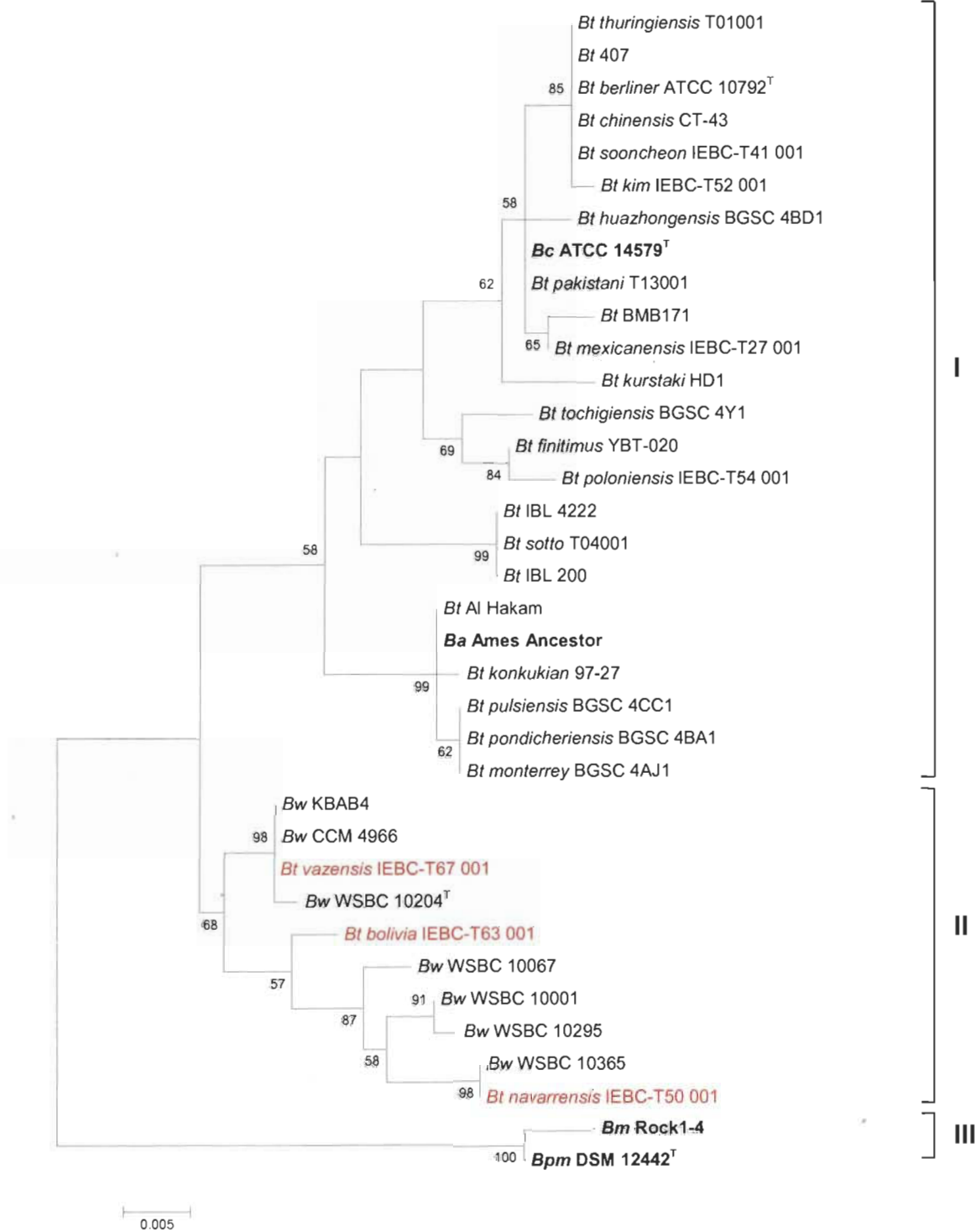


Figure S5

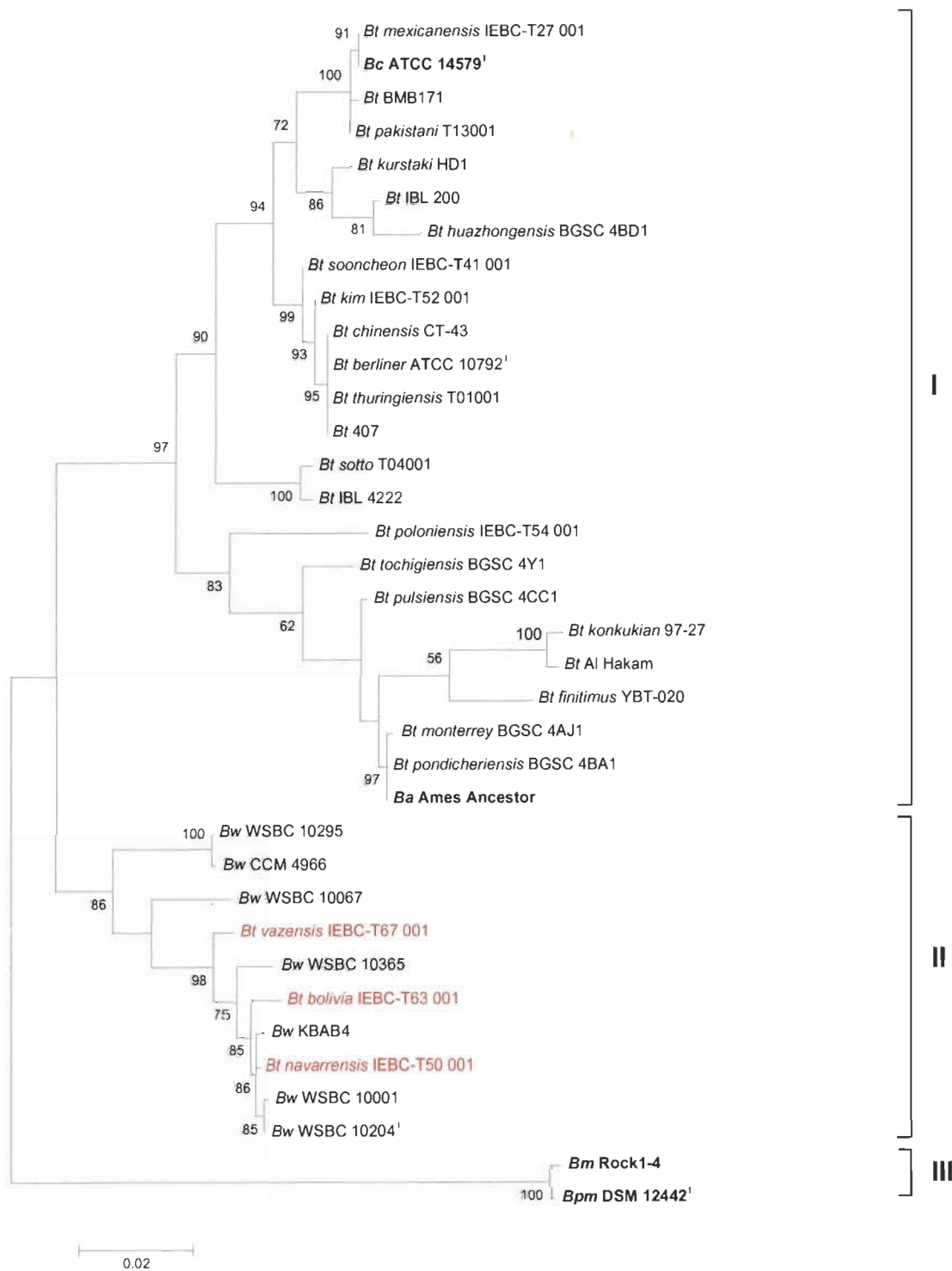


Figure S6

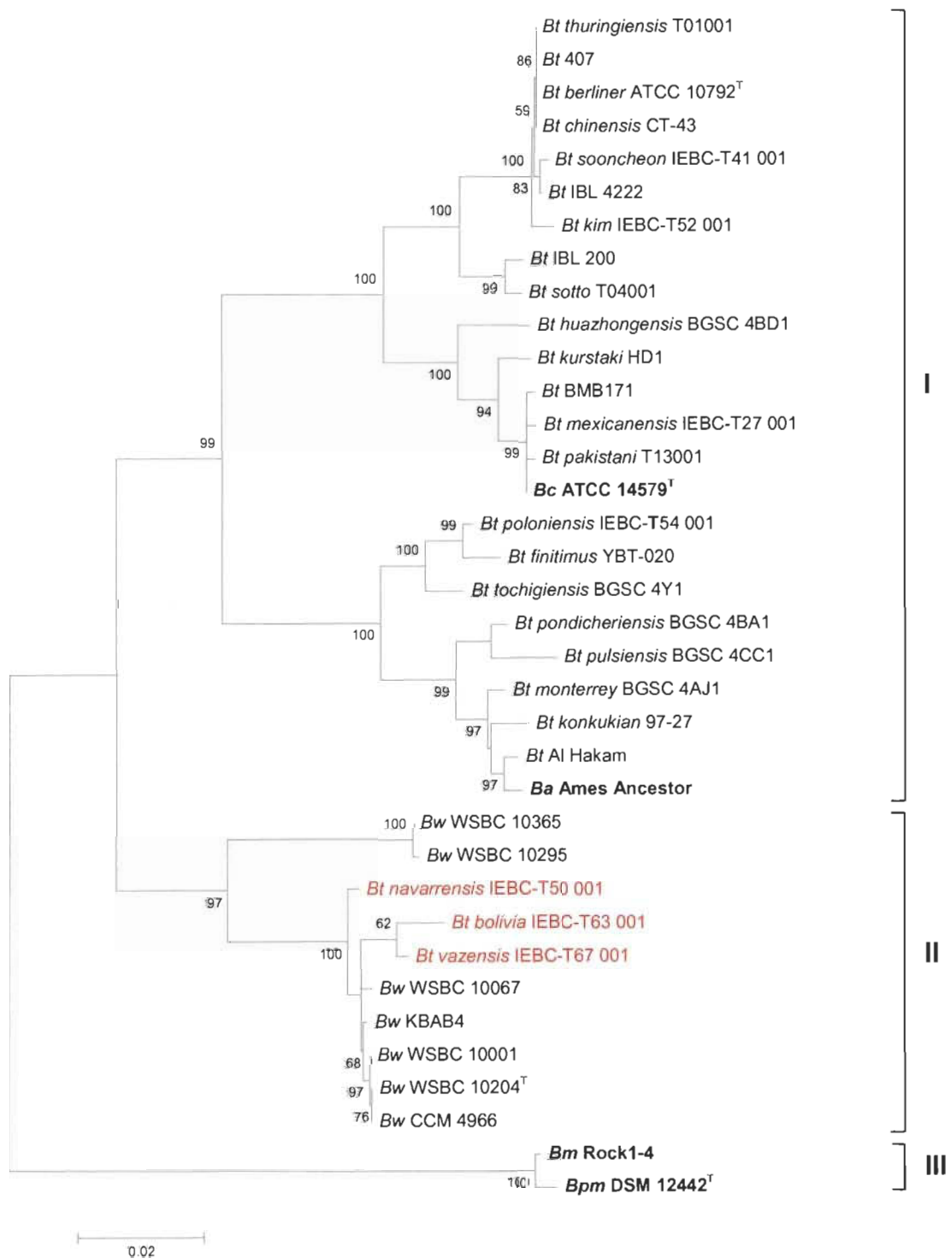
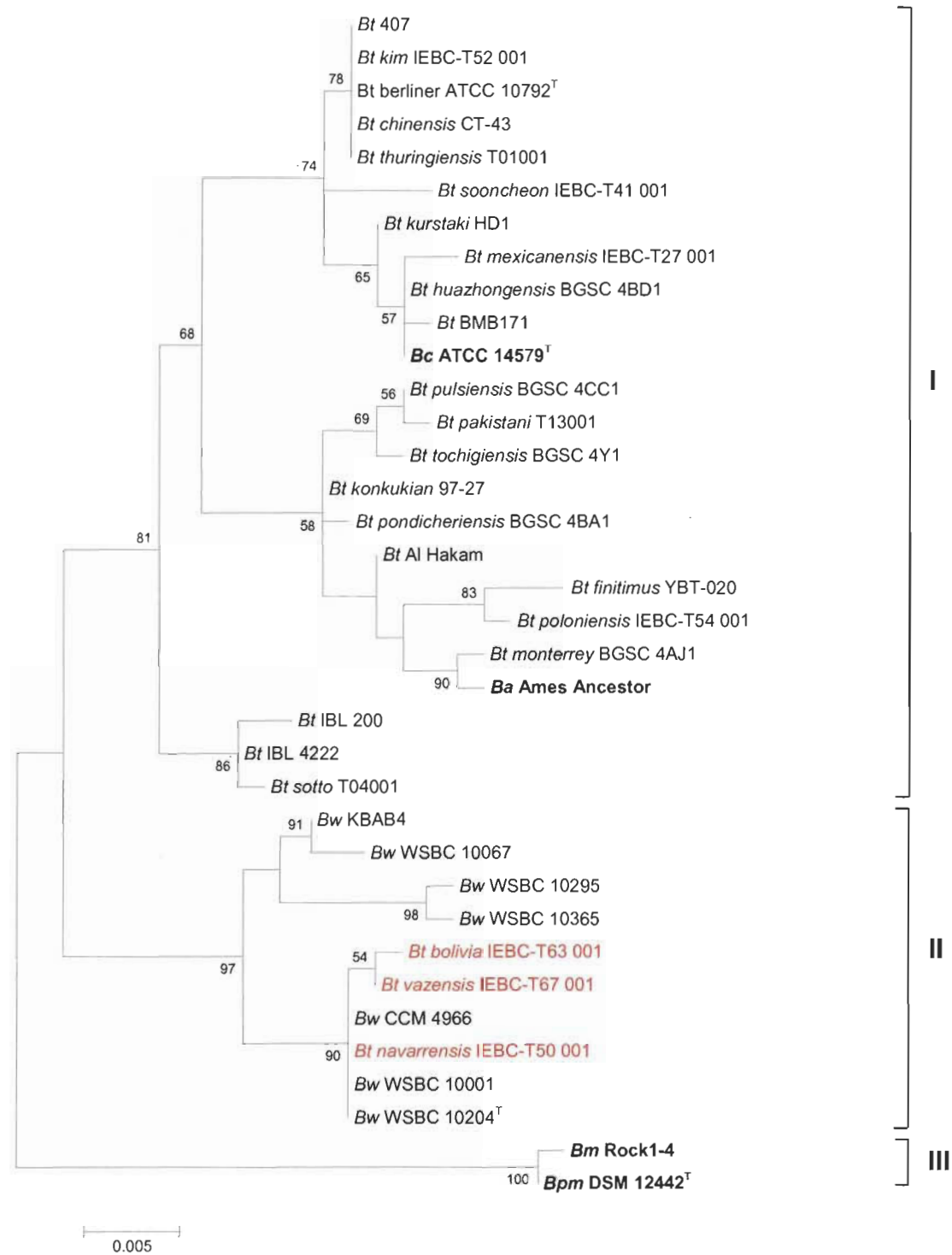


Figure S7



CHAPITRE IV

***BACILLUS WEIHENSTEPHANENSIS* CHARACTERISTICS ARE PRESENT IN *BACILLUS CEREUS* AND *BACILLUS MYCOIDES* STRAINS**

Le contenu de ce chapitre provient d'une publication de Brahim Soufiane et Jean-Charles Côté (2013). *Bacillus weihenstephanensis* characteristics are present in *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. FEMS Microbiology Letters 341: 127-137.

Résumé

Le groupe *Bacillus cereus* comprend sept espèces bactériennes : *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus cytotoxicus* et *Bacillus weihenstephanensis*. Cette dernière espèce est caractérisée par sa capacité à croître à 7 °C mais non à 43 °C et la présence de séquences signatures au niveau des gènes ARNr 16S, *cspA*, *glpF*, *gmk*, *purH* et *tpi*. Ces séquences signatures qui sont spécifiques à *B. weihenstephanensis* ont été retrouvées chez quelques souches de *B. cereus* et *B. mycoides* qui sont probablement des souches psychrotolérantes. La psychrotolérance de ces souches a été confirmée par la croissance à 7 °C mais non à 43 °C. Les autres souches de *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* et toutes souches de *B. anthracis* possèdent les séquences signatures des mésophiles. La mésophilie de ces souches a été confirmée par la croissance à 43 °C mais non à 7 °C. La comparaison des séquences nucléotidiques concaténées a permis de générer un arbre phylogénétique contenant trois groupes et une branche. Le groupe I contient les souches mésophiles de *B. cereus*, quelques souches mésophiles de *B. mycoides*, les souches de *B. thuringiensis* et toutes les souches de *B. anthracis*. Le groupe II contient les souches psychrotolérantes de *B. cereus* et de *B. mycoides* et toutes les souches de *B. weihenstephanensis*. Le groupe III contient quelques souches mésophiles de *B. mycoides* et toutes les souches de *B. pseudomycoides*. La branche correspond à la souche de *B. cytotoxicus*. En se basant sur les résultats de croissance à 7 °C et à 43 °C ainsi que les analyses des séquences des gènes de ménage, certaines souches de *B. cereus* et *B. mycoides* doivent être reclassifiées comme *B. weihenstephanensis*.

***Bacillus weihenstephanensis* characteristics are present in
Bacillus cereus and *Bacillus mycoides* strains**

Brahim Soufiane^{1,2} & Jean-Charles Côté¹

¹ Agriculture and Agri-Food Canada, Research Centre, 430 Gouin Blvd,
Saint-Jean-sur-Richelieu, QC, Canada, J3B 3E6

² Université du Québec à Trois-Rivières, Département de Chimie-Biologie, 3351 Boul.
des Forges, P.O. Box 500, Trois-Rivières, QC, Canada, G9A 5H7

Correspondence to Jean-Charles Côté

e-mail: Jean-Charles.Cote@agr.gc.ca

Tel: 1-450-515-2137

Fax: 1-450-346-7740

Keywords

Bacillus cereus, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycooides*,
Bacillus cytotoxicus, *Bacillus weihenstephanensis*

Abstract

The *Bacillus cereus* group comprises seven bacterial species: *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus cytotoxicus* and *Bacillus weihenstephanensis*. *B. weihenstephanensis* is distinguished based on its capability to grow at 7 °C but not at 43 °C, and the presence of specific signature sequences in the 16S rRNA and *cspA* genes and in several housekeeping genes: *glpF*, *gmK*, *purH* and *tpi*. *Bacillus weihenstephanensis* specific signature sequences were found in some *B. cereus* and *B. mycoides* strains suggesting psychrotolerance. This was confirmed by growth at 7 °C but not at 43 °C. The other *B. cereus* and *B. mycoides* strains and all *B. anthracis*, *B. thuringiensis* and *B. pseudomycoides* harbored the mesophilic signature sequences. The strains tested grew at 43 °C but did not grow at 7 °C. A maximum likelihood phylogenetic tree was inferred from comparisons of the concatenated nucleotide sequences. Three Groups and one branch were revealed. Group I, II and III comprised the mesophilic *B. cereus*, some mesophilic *B. mycoides*, and all *B. anthracis* and *B. thuringiensis* strains; the psychrotolerant *B. cereus* and *B. mycoides* and all *B. weihenstephanensis* strains; and some mesophilic *B. mycoides* and all *B. pseudomycoides* strains, respectively. The branch corresponds to the single *B. cytotoxicus* strain. Based on psychrotolerance and multi-locus sequence analysis, further confirmed by comparisons of amino-acid sequences, we show that some *B. cereus* and *B. mycoides* strains should be reclassified as *B. weihenstephanensis*.

Introduction

The *Bacillus cereus* group *sensu lato* comprises seven genetically closely related species: *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus cytotoxicus* and *Bacillus weihenstephanensis*. All are Gram-positive, rod-shaped, aerobe, sporulating bacteria. The optimal growth temperatures for most species range from 25 °C to 35 °C (Vilas-Bôas *et al.*, 2007; Logan & De Vos, 2009).

Bacillus cereus is a ubiquitous soil bacterium. Some strains are used as probiotics (Duc *et al.*, 2004), while others are opportunistic human pathogens that can cause emesis and diarrhoea (Drobniewski, 1993; Schoeni & Wong, 2005). *Bacillus anthracis* is the etiologic agent of anthrax, an acute disease which affects primarily herbivorous mammals (Mock & Fouet, 2001). *Bacillus thuringiensis* is distinguished by the formation upon sporulation of a parasporal inclusion body. This inclusion body is made of proteins, the Cry proteins, some of which exhibit specific insecticidal activities (Glare & O'Callaghan, 2000). *Bacillus mycoides* is characterized by the formation of rhizoid or mycoid colonies and the absence of motility (Logan & De Vos, 2009). *Bacillus pseudomycoides* is phenotypically similar to *B. mycoides* and is distinguished by DNA relatedness and fatty acid composition (Nakamura, 1998). *Bacillus cytotoxicus* is thermotolerant and is occasionally associated with food poisoning (Auger *et al.*, 2008; Guinebretière *et al.*, 2013). *Bacillus weihenstephanensis* is psychrotolerant; it can grow at 7 °C but not at 43 °C, and is further characterized by the presence of specific signature sequences in the 16S rRNA (small subunit ribosomal RNA) and *cspA* (cold-shock protein) genes (Lechner *et al.*, 1998). It is a contaminant of dairy products and refrigerated food (Meer *et al.*, 1991, Larsen & Jørgensen, 1997).

In a recent study on *B. thuringiensis* serovars, we revealed that three of them, *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis*, were psychrotolerant; they grew at 7 °C but not at 43 °C, and harbored the 16S rRNA and *cspA* gene signature sequences typical of the psychrotolerant species *B. weihenstephanensis* (Soufiane & Côté, 2010). In a separate study, Bartoszewicz *et al.* (2009) showed that some *B. thuringiensis* isolates displayed

genetic and psychrotrophic properties characteristic of *B. weihenstephanensis*. Lately, in a comparative analysis of the nucleotide sequences of housekeeping genes, we revealed additional *B. weihenstephanensis*-specific signature sequences on the *glpF* (which codes for a glycerol uptake facilitator protein), *gmk* (guanylate kinase), *purH* (phosphoribosylaminoimidazole carboxamide formyltransferase), and *tpi* (triosephosphate isomerase) genes. We also showed that these additional signature sequences were present in the three *B. thuringiensis* psychrotolerant serovars, *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis*, and absent in all other *B. thuringiensis* serovars studied (Soufiane *et al.*, 2013).

We set here to determine whether or not these *B. weihenstephanensis*-specific signature sequences in the 16S rRNA, *cspA*, *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi* genes were also present in strains of the other five species of the *B. cereus* group : *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* and *B. cytotoxicus*, and if present whether they correlated with psychrotolerance.

Materials and Methods

Bacterial strains, culture conditions and DNA isolation

The 73 bacterial strains used in this study and their provenance are listed in Table 1. These include 23 *B. cereus*, 12 *B. anthracis*, 14 *B. mycoides*, ten *B. thuringiensis*, two *B. pseudomycoides*, one *B. cytotoxicus* and 11 *B. weihenstephanensis* strains. Their corresponding numbers in different culture collections worldwide are given in Supplementary data, Table S1. The nucleotide sequences of the 16S rRNA, *cspA*, *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi* genes were retrieved directly from GenBank for 40 bacterial strains: 12 *B. cereus*, all 12 *B. anthracis*, three *B. mycoides*, ten *B. thuringiensis*, one *B. pseudomycoides*, one *B. cytotoxicus* and one *B. weihenstephanensis* (Supplementary data, Table S2). The remaining 33 strains: 11 *B. cereus*, 11 *B. mycoides*, one *B. pseudomycoides* and ten *B. weihenstephanensis*, were cultured here and their total DNAs were isolated as described previously (Soufiane & Côté, 2009). Formation of

rhizoid or mycoid colonies was confirmed for the *B. mycoides* and *B. pseudomycooides* strains.

Bacterial cultures at 7 °C and 43 °C

A total of 41 bacterial strains available for culture were tested for their ability to grow at 7 °C and 43 °C in LB (Luria-Bertani) liquid medium (Table 1). They were first inoculated on LB plates and incubated at 30 °C, overnight. For each strain, a single colony was used to inoculate 2 ml of LB medium in 14 ml tubes and incubated at 7 °C and 43 °C on a rotary shaker (200 rpm) for 168 h and 48 h, respectively. Negative and positive growths were assessed visually by absence or presence of turbidity using LB medium as the negative control. The psychrotolerant *B. weihenstephanensis* WSBC 10204^T and mesophilic *B. cereus* ATCC 14579^T were used as controls.

Amplification of 16S rRNA, *cspA*, *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi* genes

The primer pairs for 16S rRNA and *cspA* gene amplification and amplification conditions were used as described previously (Soufiane & Côté, 2010). The primer pair of each housekeeping gene used in this study, *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi*, was designed based on a consensus sequence of each gene in 25 *B. thuringiensis* and seven *B. weihenstephanensis* strains used in our previous study (Soufiane *et al.*, 2013). The primer pair sequences and the conditions of amplifications are listed in Table 2.

DNA cloning and sequencing

Because of its small size, the amplified *cspA* gene was cloned and the selection of transformants was done as described before (Soufiane *et al.*, 2011). The isolation of recombinant plasmids was performed using a Qiagen Spin Miniprep Kit (Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA) following the manufacturer's instructions. The nucleotide sequences were determined by the dideoxynucleotide chain-termination method (Sanger *et al.*, 1977) using a capillary array automated DNA sequencer

(ABI3730XL DNA Analyzer, Applied Biosystems, Foster, CA, USA) at the sequencing platform of the McGill University and Génome Québec Innovation Centre, Montreal, QC, Canada. The PCR fragments for the 16S rRNA, *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi* genes were sequenced directly.

Phylogenetic analysis

The phylogenetic analysis was carried out using MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; version 5.05; Tamura *et al.*, 2011). The nucleotide sequences of each gene under study were aligned using Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). The nucleotide sequence alignments of *cspA*, *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi* genes were optimized manually based on the translated amino acid sequences of the reference strain *B. weihenstephanensis* KBAB4. A supermatrix of 73 bacterial strains with their respective concatenated nucleotide sequences was prepared. Phylogenies were estimated by maximum likelihood using MEGA. The maximum likelihood phylogenetic trees were tested using 1000 bootstrap replications, with the Tamura-Nei model for nucleotide substitutions (Tamura & Nei, 1993), displayed and printed with Tree Explorer, all part of the MEGA software package.

B. weihenstephanensis gene signature sequences

The *B. weihenstephanensis*-specific 16S rRNA and *cspA* (Lechner *et al.*, 1998) and *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi* (Soufiane *et al.*, 2013) gene signature sequences were searched in all *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* and *B. cytotoxicus* strains under study following a multiple alignment of each gene using Clustal W.

Nucleotide sequence accession number

Sequence data for the 16S rRNA, *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi* genes were deposited with GenBank under accession numbers JX548905 to JX549045. The sequence data for the *cspA* gene were shorter than 200 nucleotides in length and did not meet GenBank's

criteria for inclusion. They were deposited with EMBL-EBI under accession numbers HE985303 to HE985331. All accession numbers are presented in Supplementary data, Table S2.

Results

Bacterial cultures at 7 °C and 43 °C

Two *B. cereus* strains, BGSC 6A36 and BGSC 6A37 and seven *B. mycoides* strains, BGSC 6A20, BGSC 6A47, BGSC 6A68, DSM 299, DSM 309, DSM 384 and ATCC 6462 grew at 7 °C but not at 43 °C. As expected, all ten *B. weihenstephanensis* strains grew at 7 °C but not at 43 °C. The other ten *B. cereus*, five *B. thuringiensis*, five *B. mycoides* and the two *B. pseudomycoides* strains tested did not grow at 7 °C but grew at 43 °C (Table 1).

Amplification of 16S rRNA, *cspA*, *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi* genes

For each of the six genes under study, 16S rRNA, *cspA*, *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi*, a single pair of primers proved sufficient for the amplification. All 33 strains analyzed yielded a single amplicon of 1311 bp, 196 bp, 548 bp, 564 bp, 995 bp and 709 bp in length, respectively (Table 2). The concatenated sequences were 2532 nucleotides in length.

Phylogenetic analysis

A bootstrapped maximum likelihood phylogenetic tree was inferred from the alignment of the concatenated nucleotide sequences (Fig. 1). Three major phylogenetic groups were revealed, I, II and III. Group I contains all 12 *B. anthracis* strains, 18 *B. cereus* strains, including the *B. cereus* type strain ATCC 14579^T, three *B. mycoides* strains and the ten *B. thuringiensis* strains including the *B. thuringiensis* type strain ATCC 10792^T. Group II contains five *B. cereus* strains, seven *B. mycoides* strains, including the

B. mycoides type strain ATCC 6462^T, and all 11 *B. weihenstephanensis* strains. Group III contains six very closely related bacterial strains: four *B. mycoides* and the two *B. pseudomycoides*. The *B. cytotoxicus* strain formed a single branch.

Six bootstrapped maximum likelihood phylogenetic trees were inferred from the alignment of the nucleotide sequences of 16S rRNA, *cspA*, *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi* gene amplicons, respectively, to assess the congruence between each tree. They are presented in Supplementary data, Fig. S1 to S6. In each of the six trees, the same five *B. cereus* and the same seven *B. mycoides* strains were always grouped with the *B. weihenstephanensis* strains, in accordance with Group II inferred from the concatenated sequences (Fig. 1). A closer analysis of the alignments of the nucleotide sequences between all *B. cereus* strains from groups I and II, revealed a total of 44 nucleotide substitutions; 34 were synonymous, the encoded amino-acid remained unchanged, 10 were non-synonymous, which led to a change in seven encoded amino-acids. This is also true for the *B. mycoides* strains from groups I and II. In these, the nucleotide substitutions led to a change in the same seven encoded amino-acids. The significance of these silent and non-silent substitutions on the phylogeny of the bacterial strains was assessed by inferring a bootstrapped maximum likelihood phylogenetic tree from the alignment of the concatenated amino-acid sequences of the *cspA*, *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi* gene products. It is presented in Supplementary data, Fig. S7. Its topology and distribution of bacterial strains within groups is in accordance with Fig. 1, based on the concatenated nucleotide sequences. The same five *B. cereus* and seven *B. mycoides* strains are grouped with the *B. weihenstephanensis* strains on both trees. Congruence between both trees, inferred from nucleotide and amino-acid sequences, adds to the robustness of the assignments of strains to specific groups.

B. weihenstephanensis-specific signature sequences and psychrotolerance

The bacterial strains harboring the *B. weihenstephanensis* specific signature sequences on the 16S rRNA, *cspA* (Lechner *et al.*, 1998) *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi* genes (Soufiane *et al.*, 2013) are listed in Table 1. Three *B. cereus* strains, AH603, AH621 and BDRD-

ST196, and seven *B. mycooides* strains, BGSC 6A20, BGSC 6A47, BGSC 6A68, DSM 299, DSM 309, DSM 384 and the type strain ATCC 6462^T harbor all seven *B. weihenstephanensis* specific signature sequences. Two additional *B. cereus* strains, BGSC 6A36 and BGSC 6A37, harbor six of the seven signature sequences, the *purH* gene being the exception. These two *B. cereus* strains, BGSC 6A36 and BGSC 6A37, and the seven *B. mycooides* strains showed *B. weihenstephanensis*-like psychrotolerance as evidenced by their ability to grow at 7 °C but not at 43 °C. The other three *B. cereus* strains, AH603, AH621 and BDRD-ST196, were not available for testing. These five *B. cereus* and seven *B. mycooides* strains are located in Group II (Fig. 1), intertwined with the 11 *B. weihenstephanensis* strains. The other 12 *B. anthracis*, 18 *B. cereus*, ten *B. thuringiensis*, seven *B. mycooides* and the two *B. pseudomycooides* strains had signature sequences typical of mesophilic strains. All strains available for testing showed their capability to grow at 43 °C but not at 7 °C. These bacterial strains are located in Groups I and III (Fig. 1). The *B. cytotoxicus* strain harbors signature sequences typical of mesophilic strains in the 16S rRNA, *gmk* and *tpi* genes. Interestingly, new nucleotide substitutions were revealed in the *cspA*, *glpF* and *purH* genes. Additional thermotolerant strains will help to clarify whether or not they are specific to the species and other thermotolerant strains in the *B. cereus* group.

Discussion

The delineation of species in the *B. cereus* group rests on a small number of phenotypic characteristics that serve practical purposes: etiologic agent of anthrax, production of a parasporal inclusion body, rhizoid or mycoid colony morphology, thermotolerance and psychrotolerance for *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides* and *B. pseudomycooides*, *B. cytotoxicus* and *B. weihenstephanensis*, respectively. Several genetic-based studies have shown that *B. cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis* are so closely related as to be considered a single species (Daffonchio *et al.*, 1998, Helgason *et al.*, 2000, Bavykin *et al.*, 2004). The *B. cereus* and *B. thuringiensis* strains show a high level of intraspecific genetic heterogeneity, respectively (Daffonchio *et al.*, 1998). Additional studies on flagellin (Xu & Côté, 2006; Soufiane *et al.*, 2007) and housekeeping genes (Soufiane &

Côté, 2009; Soufiane *et al.*, 2013) have shown that *B. cereus* and *B. thuringiensis* strains were intertwined on phylogenetic trees suggesting they all belonged to a single species. By contrast, the *B. anthracis* strains are very homogenous and cluster together. It is a recently emerged monophyletic lineage from the *B. cereus* group (van Ert *et al.*, 2007). The *B. weihenstephanensis* species was created to include the psychotolerant strains in the *B. cereus* group with specific signature sequences on the 16S rRNA and *cspA* genes (Lechner *et al* 1998).

In a previous study on *B. thuringiensis*, we showed that not all *B. thuringiensis* serovars were mesophiles. We identified three psychrotolerant *B. thuringiensis* serovars that harbored the *B. weihenstephanensis*-specific 16S rRNA and *cspA* gene signature sequences (Lechner *et al.*, 1998) and additional *B. weihenstephanensis*-specific signature sequences on four house-keeping genes: *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi* (Soufiane *et al.*, 2013). This led to the current work on the other species in the *B. cereus* group. Some *B. thuringiensis* strains were added to reveal the phylogenetic relationship between all species.

Here, the *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* and some *B. mycoides* strains that harbored the mesophilic signature sequences clustered in Group I. The strains available for testing were all mesophile.

The *B. cereus* and *B. mycoides* strains carrying the *B. weihenstephanensis*-specific signature sequences on the 16S rRNA and the *cspA* genes (Lechner *et al* 1998) also harbored the *B. weihenstephanensis*-specific signature sequences on the *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi* genes identified before (Soufiane *et al.*, 2013). They all clustered together to form Group II. The strains available for testing were all psychrotolerant. As expected, these included all 11 *B. weihenstephanensis* strains, but also, unexpectedly, two *B. cereus* and seven *B. mycoides* strains. Over the last two decades, several psychrotolerant *B. cereus* strains have been isolated (van Netten *et al.*, 1990; Meer *et al.*, 1991; Dufrenne *et al.*, 1995; Larsen & Jørgensen, 1997; Stenfors & Granum, 2001). However, some of them did not necessarily have the *B. weihenstephanensis*-

specific 16S rRNA and *cspA* gene signature sequences (Stenfors & Granum, 2001). We did not have access to these strains but it would now be interesting to determine whether or not they harbor the *B. weihenstephanensis*-specific signature sequences on their *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi* genes. Other psychrotolerant *B. cereus* strains harboring the *B. weihenstephanensis*-specific 16S rRNA and *cspA* gene signature sequences were reclassified as *B. weihenstephanensis* (Lechner *et al.*, 1998). Owing to the capability of multilocus sequence analysis in the elucidation of genomic relatedness at the inter- and intra-specific levels (Gevers *et al.*, 2005), based on our study, further confirmed by comparative alignments of the concatenated amino-acid sequences, the psychrotolerant *B. cereus* strains revealed in Group II should be reclassified as *B. weihenstephanensis*.

Finally, in the more distantly related Group III of mesophilic *B. mycoides* and *B. pseudomycoides*, the strains were so genetically closely related as to suggest they form a single species, *B. pseudomycoides*. The thermotolerant *B. cytotoxicus* strain constitutes a single and distinctive branch, clearly separated from the other groups.

This separation into three Groups is, in general, in agreement with other MLST analyses of the *B. cereus* Group (Helgason *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2004; Priest *et al.*, 2004; Sorokin *et al.*, 2006), with exceptions. In these, three clades were revealed. Clades 1, 2 and 3, also referred to as C (*cereus*), T (*thuringiensis*) and W (*weihenstephanensis*), comprise *B. anthracis* and *B. cereus* strains; *B. thuringiensis* and *B. cereus* strains; and *B. cereus*, *B. mycoides* and *B. weihenstephanensis* strains, respectively. Our Group I corresponds to Clades 1 and 2, with the addition of some mesophilic *B. mycoides* strains. Our Group II corresponds to Clade 3. Our Group III has no corresponding Clade possibly because the number of *B. mycoides* and *B. pseudomycoides* strains analyzed in the other four MLST studies was too small.

Using different molecular methods, Bell and Friedman (1994) showed that the *B. mycoides* strains in their study could be separated into two groups. Lechner *et al.* (1998) showed that the *B. mycoides* strains in their study were all psychrotolerant. By contrast, the *B. mycoides* strains in our study were present in each of our three Groups:

mesophilic next to the *B. cereus* strains, psychrotolerant with the *B. weihenstephanensis* strains, and in a more distantly related mesophilic group with the *B. pseudomycooides* strains. This questions the value of rhizoid or mycoid colony morphology as a taxonomic marker for the identification of *B. mycooides* strains. Moreover, the ability to form rhizoid colonies may be lost (Logan & De Vos 2009), indicating how unreliable this criterion really is. The population structure in the *B. cereus* group is mostly clonal, with limited recombination (Helgason *et al.*, 2004). The dissimilarities between the orthologous copies of the housekeeping genes in our MLSA originate mostly from point mutations. It would be interesting to study the genes responsible for colony morphology in *B. mycooides* strains, mycoid or rhizoid, and determine whether they are of single or multiple clonal origins or perhaps, as suggested here by our data, gained through horizontal gene transfers. Based on our work, the psychrotolerant *B. mycooides* strains carrying the *B. weihenstephanensis*-specific signature sequences on the 16S rRNA, *cspA*, *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi* genes present in Group II should be reclassified as *B. weihenstephanensis*. Likewise, the *B. mycooides* and *B. pseudomycooides* strains present in Group III are so closely related and so distant from Groups I and II that they should be reclassified into a single species, *B. pseudomycooides*, on the basis of this MLSA-inferred phylogenetic analysis.

Psychrotolerant bacteria grow optimally between 25 °C and 35 °C. They can, however, grow at 7 °C, albeit at a much lower rate (Morita, 1975). The geographic distribution of psychrotolerant and mesophilic strains in the *B. cereus* group is climate-related (von Stetten *et al.*, 1999; Bartoszewicz *et al.*, 2009). Interestingly, the psychrotolerant *B. cereus* strains BGSC 6A36, BGSC 6A37, AH603 and AH621 were all isolated from Norway, the first two above the Arctic Circle (Helgason *et al.*, 1998), an environment to which they were possibly well adapted. Likewise, the *B. weihenstephanensis* strains were originally isolated from pasteurized milk stored at 7 °C for 10 to 16 days (Lechner *et al.*, 1998). Clearly, sporulating, aerobic, psychrotolerant strains were artificially selected for. Other psychrotolerant *B. cereus* and *B. weihenstephanensis* strains have been isolated from refrigerated milk (Meer *et al.*, 1991; Larsen & Jørgensen, 1997; Páčová *et al.*, 2003). For comparison purposes, it would have been interesting to

determine the population and the ratio between all species in the *B. cereus* group immediately following milking, immediately prior and after pasteurisation, and 10 to 16 days following storing at 7 °C. The source of the *B. weihenstephanensis* strains present in milk remains unknown. A recent study has shown that many psychrotrophic microorganisms originate from contaminated water used for cleaning and sanitizing the milking equipment (Yakubchak & Galaburda, 2012).

The genetic and phenotypic heterogeneities of strains and species in the *B. cereus* group coupled with the presence of mesophilic, psychrotolerant and thermotolerant strains, and the misidentification of strains at the species level as seen here indicate that additional work on their classification is still warranted.

References

- Auger S, Galleron N, Bidnenko E, Ehrlich SD, Lapidus A & Sorokin A (2008) The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* Group is representative of a cluster of thermophilic strains. *Appl Environ Microbiol* **74**: 1276–1280.
- Bartoszewicz M, Bideshi DK, Kraszewska A, Modzelewska E & Swiecicka I (2009) Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* display genetic and psychrotrophic properties characteristic of *Bacillus weihenstephanensis*. *J Appl Microbiol* **106**: 1967–1975.
- Bavykin SG, Lysov YP, Zakhariyev V, Kelly JJ, Jackman J, Stahl DA & Cherni A (2004) Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J Clin Microbiol* **42**: 3711–3730.
- Bell JA & Friedman SB (1994) Genetic structure and diversity within local population of *Bacillus mycoides*. *Evolution* **48**: 1698–1714.
- Daffonchio D, Borin S, Frova G, Manachini PL & Sorlini C (1998) PCR fingerprinting of whole genomes: the spacers between the 16S and 23S rRNA genes and of intergenic tRNA gene regions reveal a different intraspecific genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*. *Int J Syst Bact* **48**: 107–116.
- Drobniewski FA (1993) *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev* **6**: 324–338.
- Duc LH, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO & Cutting SM (2004) Characterization of *Bacillus* probiotics available for Human use. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2161–2171.
- Dufrenne J, Bijwaard M, te Giffel M, Beumer R & Notermans S (1995) Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *Int J Food Microbiol* **27**: 175–183.
- Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, Stackebrandt E, Van de Peer Y, Vandamme P, Thompson FL & Swings J (2005) Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol* **3**: 733–739.
- Glare TR & O'Callaghan M (2000) *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. John Wiley and Sons, Toronto, Canada.

- Guinebretière MH, Auger S, Galleron N, Contzen M, De Sarrau B, De Buyser ML, Lamberet G, Fagerlund A, Granum PE, Lereclus D, De Vos P, Nguyen-The C & Sorokin A (2013) *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 31–40.
- Helgason E, Caugant DA, Lecadet MM, Chen Y, Mahillon J, Lövgren A, Hegna I, Kvaløy K & Kolstø A-B (1998) Genetic diversity of *Bacillus cereus*/*B. thuringiensis* isolates from natural sources. *Curr Microbiol* **37**: 80–87.
- Helgason E, Økstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, Hegna I & Kolstø A-B (2000) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2627–263.
- Helgason E, Tourasse NJ, Meisal R, Caugant DA & Kolstø A-B (2004) Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol* **70**: 191–201.
- Ko KS, Kim JW, Kim JM, Kim W, Chung SI, Kim IJ & Kook YH (2004) Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* gene. *Infect Immun* **72**: 5253–5261.
- Larsen HD & Jørgensen K (1997) The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *Int J Food Microbiol* **34**: 179–186.
- Lechner S, Mayr R, Francis KP, Prüß BM, Kaplan T, Wießner-Gunkel E, Stewart GSAB & Scherer S (1998) *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 1373–1382.
- Logan NA & De Vos P (2009) Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174^{AL}. *Bergey's Manual of systematic bacteriology, Vol. 3* (De Vos P, Guarrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H & Whitman WB, eds), pp. 21–128. Springer, New York, NY.
- Meer RR, Baker J, Bodyfelt FW & Griffiths MW (1991) Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. *J Food Protection* **54**: 969–979.
- Mock M & Fouet A (2001) Anthrax. *Annu Rev Microbiol* **55**: 647–671.
- Morita RY (1975) Psychrophilic Bacteria. *Bacteriol Rev* **39**: 144–167.
- Nakamura LK (1998) *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 1031–1035.

- Páčová Z, Švec P, Stenfors LP, Vyletělová M & Sedláček I (2003) Isolation of the psychrotolerant species *Bacillus weihenstephanensis* from raw cow's milk. *Czech J Anim Sci* **48**: 93–96.
- Priest FG, Barker M, Baillie LWJ, Holmes EC & Maiden MCJ (2004) Population Structure and Evolution of the *Bacillus cereus* Group. *J Bacteriol* **186**: 7959–7970.
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463–5467.
- Schoeni JL & Wong AC (2005) *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J Food Prot* **68**: 636–48.
- Sorokin A, Candelon B, Guilloux K, Galleron N, Wackerow-Kouzova N, Ehrlich SD, Bourguet D & Sanchis V (2006) Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1569–78.
- Soufiane B, Xu D & Côté JC (2007) Flagellin (FliC) protein sequence diversity among *Bacillus thuringiensis* does not correlate with H serotype diversity. *Antonie van Leeuwenhoek* **92**: 449–461.
- Soufiane B & Côté J-C (2009) Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, *gyrB* and *aroE* gene sequence analyses. *Antonie van Leeuwenhoek* **95**: 33–45.
- Soufiane B & Côté J-C (2010) *Bacillus thuringiensis* serovars *bolivia*, *vazensis* and *navarrensensis* meet the description of *Bacillus weihenstephanensis*. *Current Microbiology* **60**: 343–349.
- Soufiane B, Sirois M & Côté J-C (2011) Mutually exclusive distribution of the *sap* and *eag* S-layer genes and the *lytB/lytA* cell wall hydrolase genes in *Bacillus thuringiensis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **100**: 349–364.
- Soufiane B, Baizet M & Côté JC (2013) Multilocus sequence analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars *navarrensensis*, *bolivia* and *vazensis* and *Bacillus weihenstephanensis* reveals a common phylogeny. *Antonie van Leeuwenhoek* **103**: 195–205.
- Stenfors LP & Granum PE (2001) Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiol Lett* **197**: 223–228.

- Tamura K & Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Bio Evol* **10**: 512–526.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Likelihood, Distance, and Parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731–2739.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* **22**: 4673–4680.
- Van Ert MN, Easterday WR, Huynh LY, Okinaka RT, Hugh-Jones ME, Ravel J, Zanecki SR, Pearson T, Simonson TS, U'Ren JM, Kachur SM, Leadem-Dougherty RR, Rhoton SD, Zinser G, Farlow J, Coker PR, Smith KL, Wang B, Kenefic LJ, Fraser-Liggett CM, Wagner DM & Keim P (2007) Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS ONE* **2**: e461.
- Van Netten P, Van De Moosdijk A, Van Hoensel P, Mossel DAA & Perales I (1990) Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *J Appl Microbiol* **69**: 73–79.
- Vilas-Bôas GT, Peruca AP & Arantes OM (2007) Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol* **53**: 673–687.
- von Stetten F, Mayr R & Scherer S (1999) Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. *Environ Microbiol* **1**: 503–515.
- Xu D & Côté JC (2006) Sequence diversity of the *Bacillus thuringiensis*, and *B. cereus sensu lato* flagellin (H-antigen) protein: Comparison with H serotype diversity. *Appl Environ Microbiol* **72**: 4653–4662.
- Yakubchak O & Galaburda M (2012) Contamination of bulk milk by psychrotrophic microorganisms during milking and milk processing. *Earth Bioresources and Quality of Life* **1**

Figure legends

Figure 1

Bootstrapped maximum likelihood phylogenetic tree inferred from the concatenated sequences of six genes for *Bacillus anthracis* (*Ba*), *Bacillus cereus* (*Bc*), *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), *Bacillus mycoides* (*Bm*), *Bacillus pseudomycooides* (*Bpm*), *Bacillus cytotoxicus* (*B. cytotoxicus*) and *B. weihenstephanensis* (*Bw*). Bootstrap values higher than 50% (of 1000 cycles) are indicated. Roman numerals, I, II and III, refer to the three major Groups. The horizontal bar represents 1% differences in nucleotide identities. Type strains are indicated by the superscript^T.

Figure legends of the Supplementary data

Figure S1

Bootstrapped maximum likelihood phylogenetic tree inferred from the 16S rRNA gene sequences for *Bacillus anthracis* (*Ba*), *Bacillus cereus* (*Bc*), *Bacillus mycoides* (*Bm*), *Bacillus pseudomycooides* (*Bpm*), *Bacillus cytotoxicus* (*B. cytotoxicus*) and *B. weihenstephanensis* (*Bw*). Bootstrap values higher than 50% (of 1000 cycles) are indicated. The horizontal bar represents 0.1% differences in nucleotide identities. Type strains are indicated by the superscript^T.

Figure S2

Bootstrapped maximum likelihood phylogenetic tree inferred from the *cspA* gene sequences for *Bacillus anthracis* (*Ba*), *Bacillus cereus* (*Bc*), *Bacillus mycoides* (*Bm*), *Bacillus pseudomycooides* (*Bpm*), *Bacillus cytotoxicus* (*B. cytotoxicus*) and *B. weihenstephanensis* (*Bw*). Bootstrap values higher than 50% (of 1000 cycles) are indicated. The horizontal bar represents 2% differences in nucleotide identities. Type strains are indicated by the superscript^T.

Figure S3

Bootstrapped maximum likelihood phylogenetic tree inferred from the *glpF* gene sequences for *Bacillus anthracis* (Ba), *Bacillus cereus* (Bc), *Bacillus mycoides* (Bm), *Bacillus pseudomycooides* (Bpm), *Bacillus cytotoxicus* (B. cytotoxicus) and *B. weihenstephanensis* (Bw). Bootstrap values higher than 50% (of 1000 cycles) are indicated. The horizontal bar represents 1% differences in nucleotide identities. Type strains are indicated by the superscript^T.

Figure S4

Bootstrapped maximum likelihood phylogenetic tree inferred from the *gmk* gene sequences for *Bacillus anthracis* (Ba), *Bacillus cereus* (Bc), *Bacillus mycoides* (Bm), *Bacillus pseudomycooides* (Bpm), *Bacillus cytotoxicus* (B. cytotoxicus) and *B. weihenstephanensis* (Bw). Bootstrap values higher than 50% (of 1000 cycles) are indicated. The horizontal bar represents 2% differences in nucleotide identities. Type strains are indicated by the superscript^T.

Figure S5

Bootstrapped maximum likelihood phylogenetic tree inferred from the *purH* gene sequences for *Bacillus anthracis* (Ba), *Bacillus cereus* (Bc), *Bacillus mycoides* (Bm), *Bacillus pseudomycooides* (Bpm), *Bacillus cytotoxicus* (B. cytotoxicus) and *B. weihenstephanensis* (Bw). Bootstrap values higher than 50% (of 1000 cycles) are indicated. The horizontal bar represents 2% differences in nucleotide identities. Type strains are indicated by the superscript^T.

Figure S6

Bootstrapped maximum likelihood phylogenetic tree inferred from the *tpi* gene sequences for *Bacillus anthracis* (Ba), *Bacillus cereus* (Bc), *Bacillus mycoides* (Bm), *Bacillus pseudomycooides* (Bpm), *Bacillus cytotoxicus* (B. cytotoxicus) and *B. weihenstephanensis* (Bw). Bootstrap values higher than 50% (of 1000 cycles) are indicated. The horizontal bar represents 0.5% differences in nucleotide identities. Type strains are indicated by the superscript^T.

Figure S7

Bootstrapped maximum likelihood phylogenetic tree inferred from the concatenated amino-acid sequences of the *cspA*, *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi* gene products for *Bacillus anthracis* (*Ba*), *Bacillus cereus* (*Bc*), *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), *Bacillus mycoides* (*Bm*), *Bacillus pseudomycooides* (*Bpm*), *Bacillus cytotoxicus* (*B. cytotoxicus*) and *B. weihenstephanensis* (*Bw*). Bootstrap values higher than 50% (of 1000 cycles) are indicated. Roman numerals, I, II and III, refer to the three major Groups. The horizontal bar represents 0.5% differences in amino-acid identities. Type strains are indicated by the superscript^T.

Table 1. Signature sequences in 16S rDNA, *cspA* and four additional housekeeping genes typical of mesophilic (Groups I and III) and psychrotolerant (Group II) strains in the species of the *Bacillus cereus* group

Species and Strains*		Growth temperature		Signature sequences							
		7 °C	43 °C	16S rDNA	<i>cspA</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>		<i>purH</i>	<i>tpi</i>	
Group I	<i>B. anthracis</i>	<i>Ba</i> Ames Ancestor ^T	ND	ND	¹⁰⁰⁸ CCTAGAGATAGG	⁴ GCAGTA	²⁵⁰ GGT	⁹⁰ GGAT	⁵³¹ TGAAA	¹²⁸⁴ CGGT	¹⁵⁷ GCG
		<i>Ba</i> Sterne	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Ba</i> Ames	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Ba</i> CDC 684	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Ba</i> Tsiankovskii-I	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Ba</i> Australia	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Ba</i> Western N. America	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Ba</i> Kruger	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Ba</i> Vollum	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Ba</i> A1055	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Ba</i> CNEVA-9066	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
	<i>Ba</i> A0248	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG	
	<i>B. cereus</i>	<i>Bc</i> AH820	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bc</i> ATCC 10987	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bc</i> ATCC 14579 ^T	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bc</i> Q1	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGC	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bc</i> E33L	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGC	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bc</i> B4264	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bc</i> G9842	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bc</i> 03BB102	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bc</i> AH187	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGC	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bc</i> BGSC 6A15	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bc</i> BGSC 6A16	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
<i>Bc</i> BGSC 6A17		-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG	
<i>Bc</i> BGSC 6A18	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGC	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG		

Table 1. Continued

Species and Strains*		Growth temperature		Signature sequences							
		7 °C	43 °C	16S rRNA	<i>cspA</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>purH</i>	<i>tpi</i>		
Group II	<i>B. mycooides</i>	<i>Bc</i> BGSC 6A27	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bc</i> BGSC 6A28	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bc</i> BGSC 6A30	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bc</i> BGSC 6A31	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bc</i> BGSC 6A35	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
	<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bm</i> BGSC 6A12	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bm</i> BGSC 6A13	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bm</i> BGSC 6A14	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bt</i> Berliner ATCC 10792 ^T	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCA
		<i>Bt finitimus</i> YBT-20	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bt</i> BMB171	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCA
		<i>Bt sotto</i> T04001	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCA
		<i>Bt poloniensis</i> IEBC-T54 001	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bt</i> Al Hakam	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCG
		<i>Bt chinensis</i> CT-43	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCA
		<i>Bt</i> 407	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCA
		<i>Bt</i> HD-771	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCA
		<i>Bt</i> HD-789	ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	GGAT	TGAAA	CGGT	GCA
		<i>B. weihenstephanensis</i>	<i>Bw</i> CCM 4965	+	-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC
<i>Bw</i> CCM 4966	+		-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG	
<i>Bw</i> WSBC 10204 ^T	+		-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG	
<i>Bw</i> WSBC 10001	+		-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG	
<i>Bw</i> WSBC 10067	+		-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG	
<i>Bw</i> WSBC 10295	+		-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG	
<i>Bw</i> WSBC 10296	+		-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG	
<i>Bw</i> WSBC 10363	+		-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG	
<i>Bw</i> WSBC 10364	+		-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG	
<i>Bw</i> WSBC 10365	+		-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG	
<i>Bw</i> KBAB4	ND	ND	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG		

Table 1. Continued

Species and Strains*		Growth temperature		Signature sequences							
		7 °C	43 °C	16S rRNA	<i>cspA</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>purH</i>	<i>tpi</i>		
Group III	<i>B. cereus</i>	<i>Bc</i> AH603	ND	ND	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG
		<i>Bc</i> AH621	ND	ND	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG
		<i>Bc</i> BDRD-ST196	ND	ND	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG
		<i>Bc</i> BGSC 6A36	+	-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGT	AAG
		<i>Bc</i> BGSC 6A37	+	-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGT	AAG
	<i>B. mycooides</i>	<i>Bm</i> BGSC 6A20	+	-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG
		<i>Bm</i> BGSC 6A47	+	-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG
		<i>Bm</i> BGSC 6A68	+	-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG
		<i>Bm</i> DSM 299	+	-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG
		<i>Bm</i> DSM 309	+	-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG
		<i>Bm</i> DSM 384	+	-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG
		<i>Bm</i> ATCC 6462 ^T	+	-	TCTAGAGATAGA	ACAGTT	ATG	AGAC	CGACC	AGGC	AAG
	<i>B. mycooides, B. pseudomycooides</i>	<i>Bm</i> BGSC 6A19	-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	AGAT	TGAAA	TGGA	GCG
<i>Bm</i> DSM 307		-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	AGAT	TGAAC	TGGA	GCG	
<i>Bm</i> rock1-4		ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	AGAT	TGAAC	TGGA	GCG	
<i>Bm</i> rock3-17		ND	ND	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	AGAT	TGAAC	TGGA	GCG	
<i>Bpm</i> DSM 12442 ^T		-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	AGAT	TGAAC	TGGA	GCG	
<i>Bpm</i> DSM 12443		-	+	CCTAGAGATAGG	GCAGTA	GGT	AGAT	TGAAC	TGGA	GCG	
	<i>B. cytotoxicus</i> NVH 391-98 ^T	ND	ND	CCTAGAGATAGG	ACAGTA	GGA	AGAT	TGAAC	TGGT	GCG	

* ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA; BGSC, *Bacillus* Genetic Stock Center, The Ohio State University, Columbus, OH, USA; CCM, Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University Brno, Czech Republic; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany; IEBC, International Entomopathogenic *Bacillus* Centre, Institut Pasteur, Paris, France; WSBC, Weihenstephan *Bacillus* Collection. Microbial Ecology Group, Technical University of Munich, Freising-Weihenstephan, Germany.

^T Type strain.

The symbols + and - indicate presence and absence of growth respectively at 7 °C and 43 °C.

ND = not determined.

Table 2. Loci analyzed, primer pair sequences and amplification conditions used

Locus	Encoded protein	Genomic position*	Gene length (bp)	Fragment length (bp)	Primer pairs†	Amplification conditions (25 cycles)
16S rRNA	-	9197	1507	1311	16SrRNA-F1 : ⁴ GAACGCTGGCGGCGTGCCTAA ²⁴ 16SrRNA-R1 : ¹³¹⁵ TTCATGTAGGCGAGTTGCAG ¹²⁹⁶	Denaturation : 94 °C/60 s Annealing : 49 °C/60 s Extension : 72 °C/90 s
<i>cspA</i>	Cold shock protein	1121065	204	196	<i>cspA</i> -F1 : ⁻⁸⁰ ATTTGATAATGTGTGGATTC ⁻⁶⁰ <i>cspA</i> -R1 : ¹¹⁶ AAACCGTCAGTTTCGATTGC ⁹⁷	Denaturation : 94 °C/15 s Annealing : 40 °C/15 s Extension : 72 °C/15 s
<i>glpF</i>	Glycerol uptake facilitator protein	1024765	822	548	<i>glpF</i> -F1 : ⁵⁹ GCGTTTGTGCTGGTGTAAAGT ⁷⁸ <i>glpF</i> -R1 : ⁶⁰⁷ CTGCAATCGGAAGGAAGA ⁵⁹⁰	Denaturation : 94 °C/60 s Annealing : 47 °C/60 s Extension : 72 °C/90 s
<i>gmK</i>	Guanylate kinase (putative)	3771942	618	564	<i>gmK</i> -F1 : ³ GAGAAGTAGAAGAGGATTGCTCATC ²⁷ <i>gmK</i> -R1 : ⁵⁶⁷ GCAATGTTACCAACCACAA ⁵⁴⁷	Denaturation : 94 °C/45 s Annealing : 46 °C/45 s Extension : 72 °C/90 s
<i>purH</i>	Phosphoribosylaminoimidazole carboxamide formyltransferase	327712	1536	995	<i>purH</i> -F1 : ³⁹⁸ CTGCTGCGAAAAATCACAAA ⁴¹⁷ <i>purH</i> -R1 : ¹³⁹³ CTGGCATTGGGAAGAAAGC ¹³⁷⁴	Denaturation : 94 °C/120 s Annealing : 40 °C/90 s Extension : 72 °C/150 s
<i>tpi</i>	Triosephosphate isomerase	4941986	756	709	<i>tpi</i> -F1 : ¹⁰ CCAATTATCGCAGGTAAGTGG ³⁰ <i>tpi</i> -R1 : ⁷¹⁹ GGCTCTAAGCTAGCACC GCC ⁷⁰⁰	Denaturation : 94 °C/60 s Annealing : 48 °C/60 s Extension : 72 °C/75 s

* Respective to the *Bacillus thuringiensis* strain BMB171 genome (GenBank accession number: CP001903).

† The superscript number indicates the nucleotide position respective to the beginning of the gene.

Table S1. Bacterial species and strains used in this study and their corresponding numbers in different culture collections

Species and Strains*		Other culture collections	
Group I	<i>B. anthracis</i>	<i>Ba</i> Ames Ancestor ^T	.
		<i>Ba</i> Sterne	.
		<i>Ba</i> Ames	.
		<i>Ba</i> CDC 684	.
		<i>Ba</i> Tsiankovskii-I	.
		<i>Ba</i> Australia	.
		<i>Ba</i> Western N. America	.
		<i>Ba</i> Kruger	.
		<i>Ba</i> Vollum	.
		<i>Ba</i> A1055	.
		<i>Ba</i> CNEVA-9066	.
	<i>Ba</i> A0248	.	
	<i>B. cereus</i>	<i>Bc</i> AH820	.
		<i>Bc</i> ATCC 10987	LMD72.1; NCCB 72001; NRS-248
		<i>Bc</i> ATCC 14579 ^T	BGSC 6A5; BCRC 10603; BCRC 11026; CCEB 625; CCM 2010; CCRC 10603; CCRC 11026; CCT 0198; CCT 0240; CCT 1300; CCTM La 3674; CCUG 7414; CECT 148; CECT 5050; CER001; CGMCC 1.3760; CIP 66.24; DSM 31; DSMZ 31; FIRDI 603; Ford 13; Gibson 971; HAMB1 1887; IAM 12605; IAM14174; ICMP 12370; ICMP 12436; IFO 15305; JCM 2152; KCTC 3624; LMD 75.8; LMG 6923; Logan B0002, NBRC 15305; NCAIM B.02078; NCCB 75008; NCDO 1771; NCFB 1771; NCIB 9373; NCIMB 9373; NCTC 2599, NRRL 3711; NRRL B-3711; OUT 8406; VKM B-504; VTT E-93143;
		<i>Bc</i> Q1	.
		<i>Bc</i> E33L	.
		<i>Bc</i> B4264	.
		<i>Bc</i> G9842	.
<i>Bc</i> 03BB102		.	
<i>Bc</i> AH187	.		
<i>Bc</i> BGSC 6A15	.		
<i>Bc</i> BGSC 6A16	.		

Table S1. Continued

Species and Strains*		Other culture collections
	<i>Bc</i> BGSC 6A17	ATCC 13472
	<i>Bc</i> BGSC 6A18	ATCC 15816; BCRC 15842; CCRC 15842; RIA 443; USSR RIA 443
	<i>Bc</i> BGSC 6A27	F4370/75
	<i>Bc</i> BGSC 6A28	F4431/3
	<i>Bc</i> BGSC 6A30	ATCC 7004; BCRC 11837; CCRC 11837; LMD 75.10; LMG 17608; LMG 6910; Logan B0550, N.R.Smith721; NCCB 75010; NCIB 8079; NCIMB 8079; NRS-721; WDCM 00151
	<i>Bc</i> BGSC 6A31	ATCC 13824; Ford 14; IFO 13690; LMD 75.9; LMG 17617; Logan B0546; N.R.Smith645; NBRC 13690; NCCB 75009; NCDO 723; NCIB 2600; NCIMB 2600; NCTC 2600, NRS-645
	<i>Bc</i> BGSC 6A35	.
<i>B. mycoides</i>	<i>Bm</i> BGSC 6A12	96/3308
	<i>Bm</i> BGSC 6A13	ATCC 6463; CIP 105442; CN 2195; LMG 12413; Logan B0521; N.R.Smith306; NCDO 1136; NCIMB 701136; NRS 306
	<i>Bm</i> BGSC 6A14	Gibson 71
<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bt</i> Berliner ATCC 10792 ^T	BCRC 14683; CCEB 457; CCEB 56; CCM 19; CCRC 14683; CCT 0539; CCUG 7429; CDBB 25; CECT 197; CIP 53.137; CN 3624; DSM 2046; DSMZ 2046; E.A. Steinhaus 0-3-30; Gordon 1124; HAMB1 252; HAMB1 478; IAM 12077; ICMP 12371; IMI 348918; JCM 20386; KCTC 1033; KCTC 1034; KCTC 3452; LBG B-4034; LBGB4034; LMD 70.8; LMG 7138; MKBT B-0049, N.R. Smith 996; N.R.Smith996; NBRC 101235; NCAIM B.01292; NCCB 70008; NCDO 1146; NCFB 1146; NCIB 9134; NCIB 9207; NCIM 2130; NCIM 2159; NCIMB 9134; NCIMB 9207; NRCC 996; NRRL HD-735; NRRL NRS-996; NRS-996; PCM 1853; R.E. Gordon 1124; Steinhaus 0-3-30; VKM B-1544; VKM B-439; VKM B-454; VTT E-86245
	<i>Bt finitimus</i> YBT-20	.
	<i>Bt</i> BMB171	.
	<i>Bt sotto</i> T04001	.
	<i>Bt poloniensis</i> IEBC-T54 001	.
	<i>Bt</i> Al Hakam	.
	<i>Bt chinensis</i> CT-43	.
	<i>Bt</i> 407	.
	<i>Bt</i> HD-771	.
<i>Bt</i> HD-789	.	

Table S1. Continued

Species and Strains*		Other culture collections	
Group II	<i>B. weihenstephanensis</i>	<i>Bw</i> CCM 4965	E. Vyletilová A43A
		<i>Bw</i> CCM 4966	E. Vyletilová A47A
		<i>Bw</i> WSBC 10204 ^T	BCRC 17605; CCM 4872; CCRC 17605; CECT 5894; CIP 105772; DSM 11821; KCTC 3975; LMG 18989; NBRC 101238; NRRL B-23307; VTT E-001721; WS 2480
		<i>Bw</i> WSBC 10001	.
		<i>Bw</i> WSBC 10067	.
		<i>Bw</i> WSBC 10295	.
		<i>Bw</i> WSBC 10296	.
		<i>Bw</i> WSBC 10363	.
		<i>Bw</i> WSBC 10364	.
		<i>Bw</i> WSBC 10365	.
		<i>Bw</i> KBAB4	.
Group II	<i>B. cereus</i>	<i>Bc</i> AH603	.
		<i>Bc</i> AH621	.
		<i>Bc</i> BDRD-ST196	.
		<i>Bc</i> BGSC 6A36	AH647
		<i>Bc</i> BGSC 6A37	AH684
Group II	<i>B. mycoides</i>	<i>Bm</i> BGSC 6A20	ATCC 11986; CIP 105444
		<i>Bm</i> BGSC 6A47	WSBC 10277
		<i>Bm</i> BGSC 6A68	STR4
		<i>Bm</i> DSM 299	CECT 4123; DSMZ 299; Klopotek 9; LMG 12256, Logan B0003
		<i>Bm</i> DSM 309	CECT 4126; DSMZ 309
		<i>Bm</i> DSM 384	CECT 4127; DSMZ 384
		<i>Bm</i> ATCC 6462 ^T	BCRC 10604; CCEB 634; CCRC 10604; CCT 0903; CCT 2500; CCUG 26678; CECT 4128; CIP 103472; DSM 2048; DSMZ 2048; FIRDI 604; HAMB1 1827; ICMP 12477; KCTC 3453; LMG 7128; NBRC 101228; NCAIM B.02065; NCIMB 13305; NCTC 12974; NRRL B-14799; NRRL B-14811; NRRL NRS-273; NRS-273; Smith 273; VTT E-84206; VTT E-97206

Table S1. Continued

Species and Strains*		Other culture collections	
Group III	<i>Bm</i> & <i>Bpm</i>	<i>Bm</i> BGSC 6A19	ATCC 31101; BCRC 10044; CCRC 10044; FERM-P 2837; YT 1002
		<i>Bm</i> DSM 307	CECT 4125; DSMZ 307; Klopotek 119
		<i>Bm</i> rock1-4	.
		<i>Bm</i> rock3-17	.
		<i>Bpm</i> DSM 12442 ^T	BCRC 17107; BCRC 17606; CCRC 17107; CCRC 17606; CECT 7065; CIP 105700; JCM 12231; KCTC 3862; LMG 18993; NBRC 101232; NCIMB 13844; NRRL B-617
		<i>Bpm</i> DSM 12443	NRRL NRS-321
	<i>B. cytotoxicus</i> NVH 391-98 ^T	CIP 110041; DSM 22905	

* **ATCC**, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA; **BCRC**, Bioresource Collection and Research Center, Food Industry Research and Development Institute, Hsinchu, Taiwan; **BGSC**, *Bacillus* Genetic Stock Center, The Ohio State University, Columbus, OH, USA; **CABI GRC (IMI)**: The Genetic Resource Collection, CABI Bioscience UK Centre (Egham) formerly IMI, Bakeham Lane, Egham, United Kingdom; **CCEB**, Culture Collection of Entomophagous Bacteria, Institute of Entomology, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, Czechoslovakia; **CCM**, Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University Brno, Czech Republic; **CCRC**, The Culture Collection and Research Center, Food Industry Research and Development Institute, Hsinchu, Taiwan; **CCT**, Coleção de Culturas Tropical, Rua Latino Coelho, Campinas, Brasil; **CCTM**, Centre de Collection de Types Microbiens, Institut Universitaire de Microbiologie, Lausanne, Switzerland; **CCUG**, Culture Collection, University of Göteborg, Department of Clinical Bacteriology, Institute of Clinical Bacteriology, Immunology, and Virology, Göteborg, Sweden; **CDBB**, Unidad de Servicios de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. Instituto Politecnico Nacional, Madero, Mexico; **CECT**, Colección Española de Cultivos Tipo, Universitat de Valencia, Edficio de Investigación, Valencia, Spain; **CGMCC**, China General Microbiological Culture Collection Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences Haidian, Beijing, China; **CIP**, Collection de l'Institut Pasteur, Institut Pasteur, Paris, France; **CN**, Wellcome Collection of Bacteria, Burroughs Wellcome Research Laboratories, Beckenham, Kent, United Kingdom; **DSM (DSMZ)**, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany; **FERM**, Patent Microorganism Depository, National Institute of Bioscience and Human-Technology (NIBHT) (formerly the Fermentation Research Institute (**FRI**), Agency of Industrial Science & Industry, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japan; **FIRDI**, Food Industry Research and Development Institute, HsinChu, Taiwan; **HAMBI**, Culture Collection of the Department of Microbiology, Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, Helsinki, Finland; **IAM**, Institute of Applied Microbiology, Culture Collection, The University of Tokyo, Yayoi, Bunko-Ku, Tokyo, Japan; **ICMP**, International Collection of Micro-organisms from Plants, Landcare Research, Auckland, New Zealand; **IEBC**, International Entomopathogenic *Bacillus* Centre, Institut Pasteur, Paris, France; **IFO**, Institute for Fermentation, Culture Collection of Microorganisms, Osaka, Japan; **JCM**, Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan; **KCTC**, Korean Collection for Type Cultures, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Yusong, Republic of Korea; **LBG**, Institute for Agricultural Bacteriology and Fermentation Biology, Confederated Technical High School, Zurich, Switzerland; **LMD**, Laboratorium voor Microbiologie der Technische Hogeschool, Delft University of Technology, Delft, The Netherlands; **LMG**, Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiële Genetica, Rijksuniversiteit, Gent, Belgium; **NBRC**, Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation (NITE), Kisarazu-shi, Japan; **NCAIM**, National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Department of Microbiology and Biotechnology, University of Horticulture and Food Industry, Budapest, Hungary; **NCCB**, Netherlands Culture Collection of Bacteria (formerly Phabagen and LMD), **NCCB/CBS**, Utrecht, The Netherlands; **NCDO**, National Collection of Dairy Organisms, Aberdeen, Scotland; **NCFB**, National Collection of Food Bacteria (previously named NCDO), Aberdeen, Scotland; **NCIB**, National Collection of Industrial Bacteria, Torry Research Station, Scotland, United Kingdom; **NCIM**, National Collection of Industrial Microorganisms, National Chemical Laboratory, Maharashtra, India; **NCIMB**, National Collection of Industrial and Marine Bacteria, National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Scotland; **NCTC**, National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory, London, England, United

Kingdom; **NRC (NRCC)**, National Research Council of Canada Culture Collection, Ottawa, Canada; **NRRL**, Northern Regional Research Center, Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, US Department of Agriculture, Illinois, USA; **NRS**, *Bacillus* collection of N.R. Smith, Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, US Department of Agriculture, Illinois, USA; **OUT**, Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University, Osaka, Japan; **PCM**, Polish Collection of Microorganisms (Central Centre of Microorganisms Collections), Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy of the Polish Academy of Sciences, ul. Czerska 12, Poland; **RIA (USSR RIA)**, Culture Collection of the Institute for New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia; **VKM**, Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Moscow Region, Russia; **VTT**, Technical Research Center of Finland (Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus), Biotechnology and Food Research, Culture Collection, Finland; **WS**, General collection of bacteria, Unit of Microbiology, Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL), Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, Germany; **WSBC**, Weihenstephan *Bacillus* Collection. Microbial Ecology Group, Technical University of Munich, Freising-Weihenstephan, Germany.

^T Type strain.

Table S2. GenBank accession numbers of 16S rRNA, *cspA*, *glpF*, *gmk*, *purH* and *tpi* in the species of the *Bacillus cereus* group

Species and Strains*	GenBank accession no						
	Entire Genome or contigs	16S rRNA	<i>cspA</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>purH</i>	<i>tpi</i>
<i>B. anthracis</i>							
Ames Ancestor [†]	NC_007530.2						
Sterne	NC_005945.1						
Ames	NC_003997.3						
CDC 684	NC_012581.1						
Tsiankovskii-I	ABDN02000003.1						
Australia	AAES01000024.1						
Western N. America	AAER01000035.1						
Kruger	AAEQ01000038.1						
Vollum	AAEP01000031.1						
A1055	AAEO01000019.1						
CNEVA-9066	AAEN01000013.1						
A0248	NC_012659.1						
<i>B. cereus</i>							
AH820	CP001283.1						
ATCC 10987	AE017194.1						
ATCC 14579 [†]	AE016877.1						
Q1	CP000227.1						
E33L	CP000001.1						
B4264	NC_011725.1						
G9842	NC_011772.1						
03BB102	NC_012472.1						
AH187	CP001177.1						
AH603	EEL69355.1						
AH621	EEK71945.1						
BDRD-ST196	EEL04827.1						
BGSC 6A15		JX548905	HE985303	JX548931	JX548959	JX548988	JX549017
BGSC 6A16		JX548906	HE985304	JX548932	JX548960	JX548989	JX549018

Table S2. Continued

Species and Strains*	GenBank accession no						
	Entire Genome or contigs	16S rRNA	<i>cspA</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>purH</i>	<i>tpi</i>
BGSC 6A17		JX548907	HE985305	JX548933	JX548961	JX548990	JX549019
BGSC 6A18		JX548908	HE985306	JX548934	JX548962	JX548991	JX549020
BGSC 6A27		JX548909	HE985307	JX548935	JX548963	JX548992	JX549021
BGSC 6A28		JX548910	HE985308	JX548936	JX548964	JX548993	JX549022
BGSC 6A30		JX548911	HE985309	JX548937	JX548965	JX548994	JX549023
BGSC 6A31		JX548912	HE985310	JX548938	JX548966	JX548995	JX549024
BGSC 6A35		JX548913	HE985311	JX548939	JX548967	JX548996	JX549025
BGSC 6A36		JX548914	HE985312	JX548940	JX548968	JX548997	JX549026
BGSC 6A37		JX548915	HE985313	JX548941	JX548969	JX548998	JX549027
<i>B. thuringiensis</i>							
Berliner ATCC 10792 ^T		ACNF01000156	ACNF01000035	EEM67409	EEM64861	EEM68048	EEM63400
<i>finitimus</i> YBT-20	CP002508.1						
BMB171	CP001903.1						
<i>sotto</i> T04001		EF210309	ACNB01000048	EEM43067	EEM40478	EEM43720	EEM39083
<i>poloniensis</i> IEBC-T54 001		EF210305	FJ177025	JQ250650	JQ250666	JQ250682	JQ250687
Al Hakam	CP000485.1						
<i>chinensis</i> CT-43	CP001907.1						
407	CP003889.1						
HD-771	CP003752.1						
HD-789	CP003763.1						
<i>B. mycoides</i>							
BGSC 6A12		JX548916	HE985314	JX548942	JX548970	JX548999	JX549028
BGSC 6A13		EF210296	FJ177023	JX548943	JX548971	JX549000	JX549029
BGSC 6A14		JX548917	HE985315	JX548944	JX548972	JX549001	JX549030
BGSC 6A19		EF210306	HE985316	JX548945	JX548973	JX549002	JX549031
BGSC 6A20		EF210313	FJ177028	JX548946	JX548974	JX549003	JX549032
BGSC 6A47		JX548918	HE985317	JX548947	JX548975	JX549004	JX549033
BGSC 6A68		JX548919	HE985318	JX548948	JX548976	JX549005	JX549034
DSM 299		JX548920	HE985319	JX548949	JX548977	JX549006	JX549035
DSM 307		JX548922	HE985321	JX548951	JX548979	JX549008	JX549037

Table S2. Continued

Species and Strains [*]	GenBank accession no						
	Entire Genome or contigs	16S rRNA	<i>cspA</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>purH</i>	<i>tpi</i>
DSM 309		JX548923	HE985322	JX548952	JX548980	JX549009	JX549038
DSM 384		JX548924	HE985323	JX548953	JX548981	JX549010	JX549039
ATCC 6462 ^T	NZ_CM000742.1						
rock1-4	ACMV01000174.1						
rock3-17	ACMW01000085.1						
<i>B. pseudomycooides</i>							
DSM 12442 ^T	ACMX01000068						
DSM 12443		JX548925	HE985324	JX548955	JX548983	JX549012	JX549041
<i>B. cytotoxicus</i>							
NVH 391-98 ^T	NC_009674.1						
<i>B. weihenstephanensis</i>							
CCM 4965		EF210282	FJ177018	JX548958	JX548984	JX549016	JX549045
CCM 4966		EF210298	FJ177024	JQ250658	JQ250671	JQ250686	JQ250688
WSBC 10204 ^T		AM747230	HE985331	JQ250645	JQ250668	JQ250678	JQ250699
WSBC 10001		EF210307	FJ177029	JQ250647	JQ250670	JQ250673	JQ250697
WSBC 10067		JX548926	HE985325	JQ250648	JQ250665	JQ250676	JQ250700
WSBC 10295		JX548927	HE985326	JQ250646	JQ250672	JQ250674	JQ250690
WSBC 10296		JX548928	HE985327	JX548956	JX548985	JX549013	JX549042
WSBC 10363		JX548929	HE985328	JX548957	JX548986	JX549014	JX549043
WSBC 10364		JX548930	HE985329	AY729752.1	JX548987	JX549015	JX549044
WSBC 10365		EF210283	HE985330	JQ250649	JQ250667	JQ250679	JQ250692
KBAB4	CP000903						

^{*} ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA; BGSC, *cillus* Genetic Stock Center, The Ohio State University, Columbus, OH, USA; CCM, Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University Brno, Czech Republic; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany; IEBC, International Entomopathogenic *Bacillus* Centre, Institut Pasteur, Paris, France; WSBC, Weihenstephan *Bacillus* Collection. Microbial Ecology Group, Technical University of Munich, Freising-Weihenstephan, Germany.

^T Type strain.

Figure 1

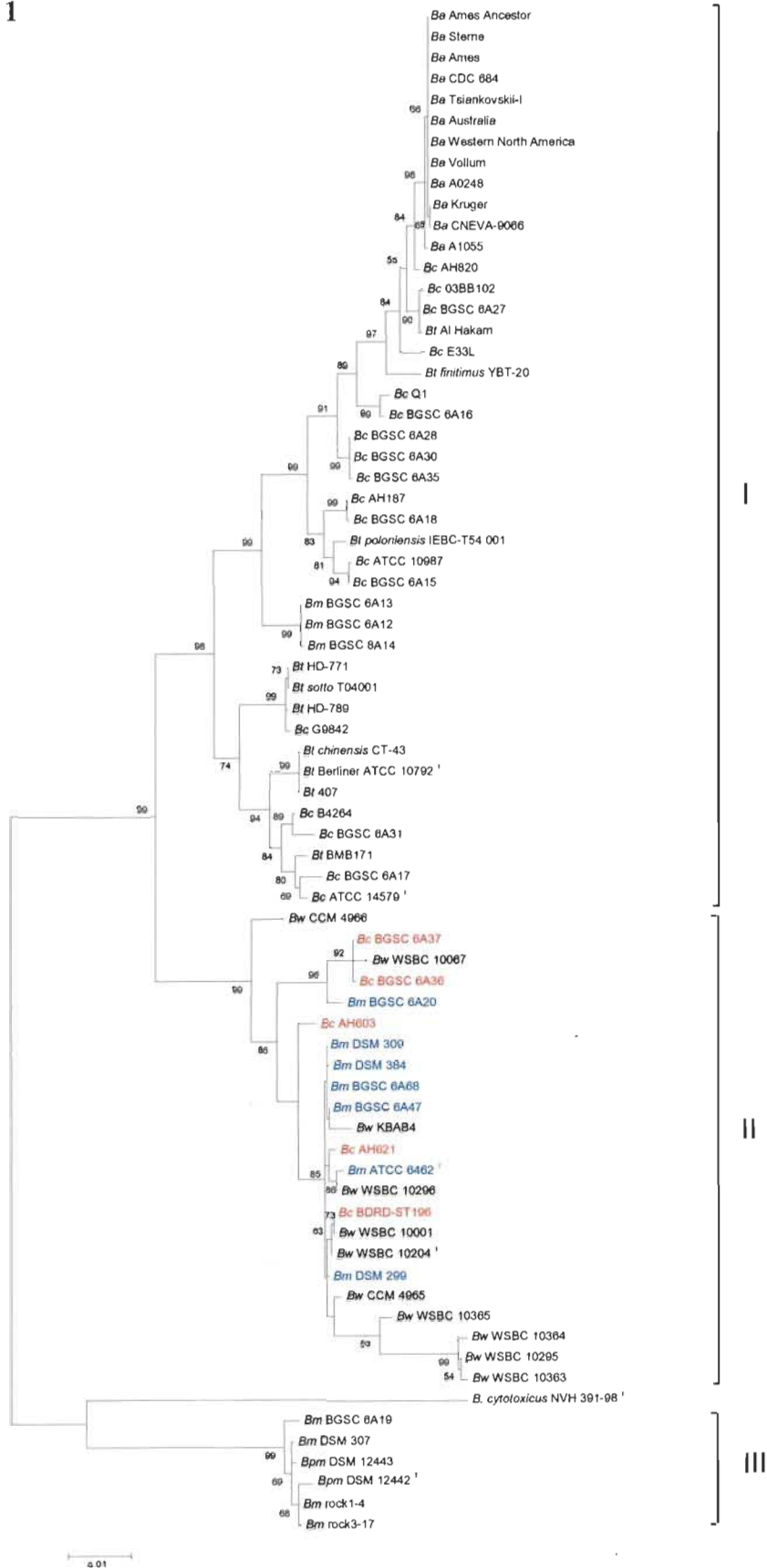


Figure S1

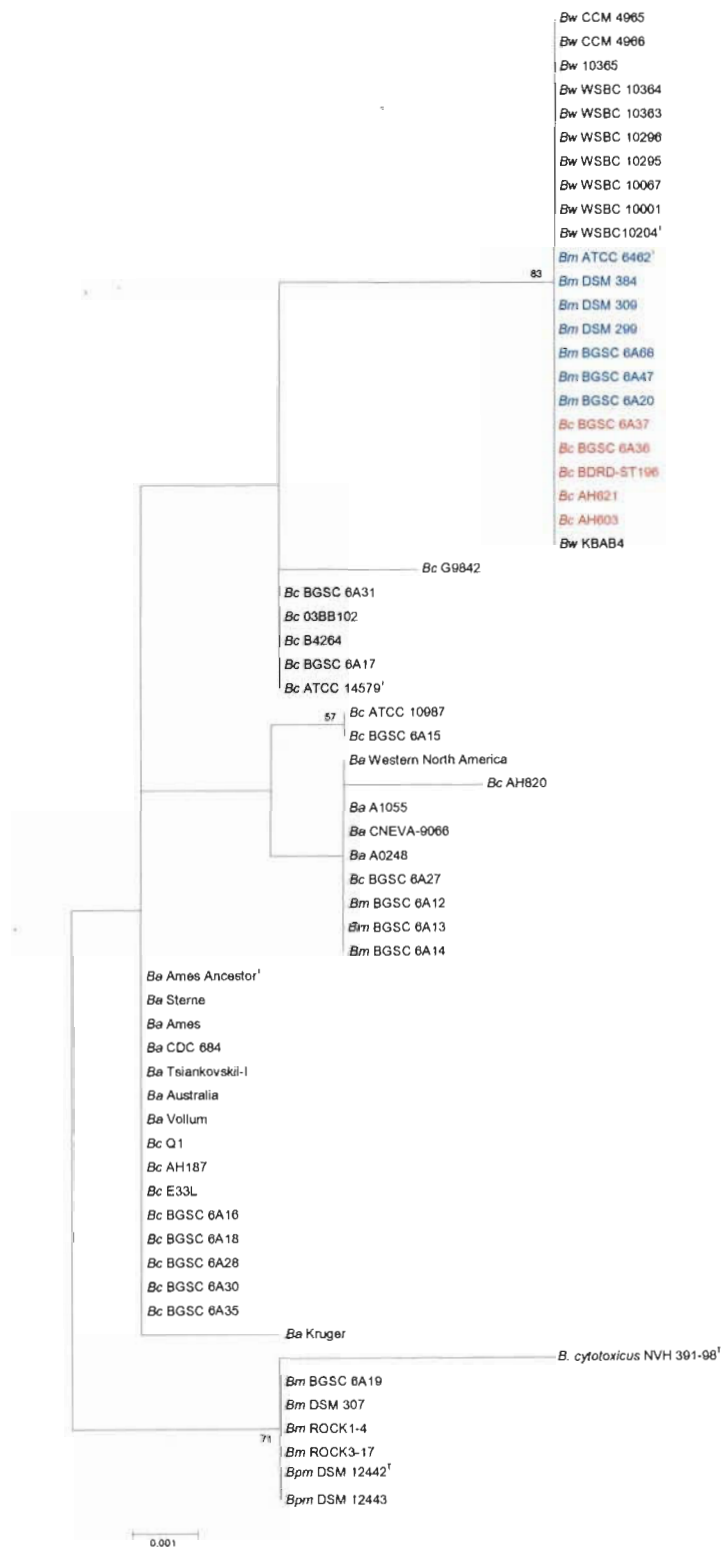


Figure S2

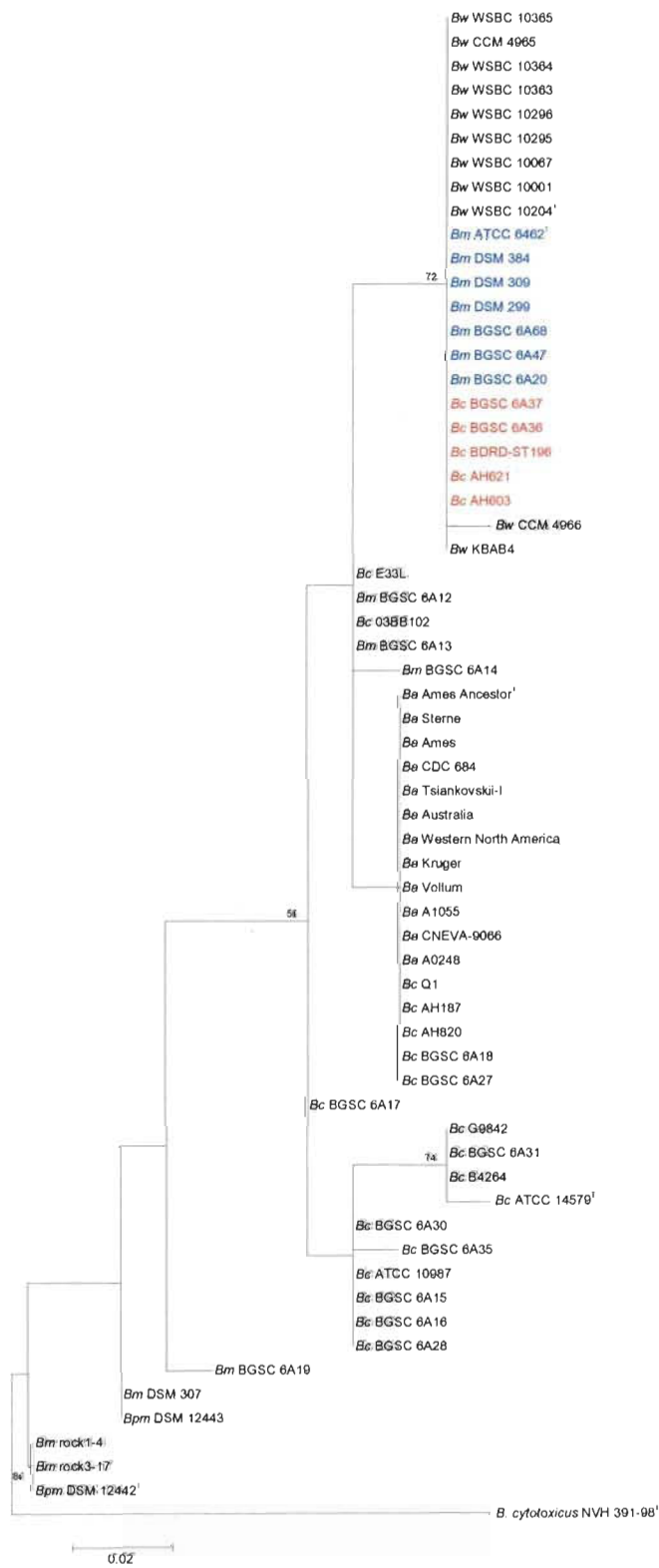


Figure S3

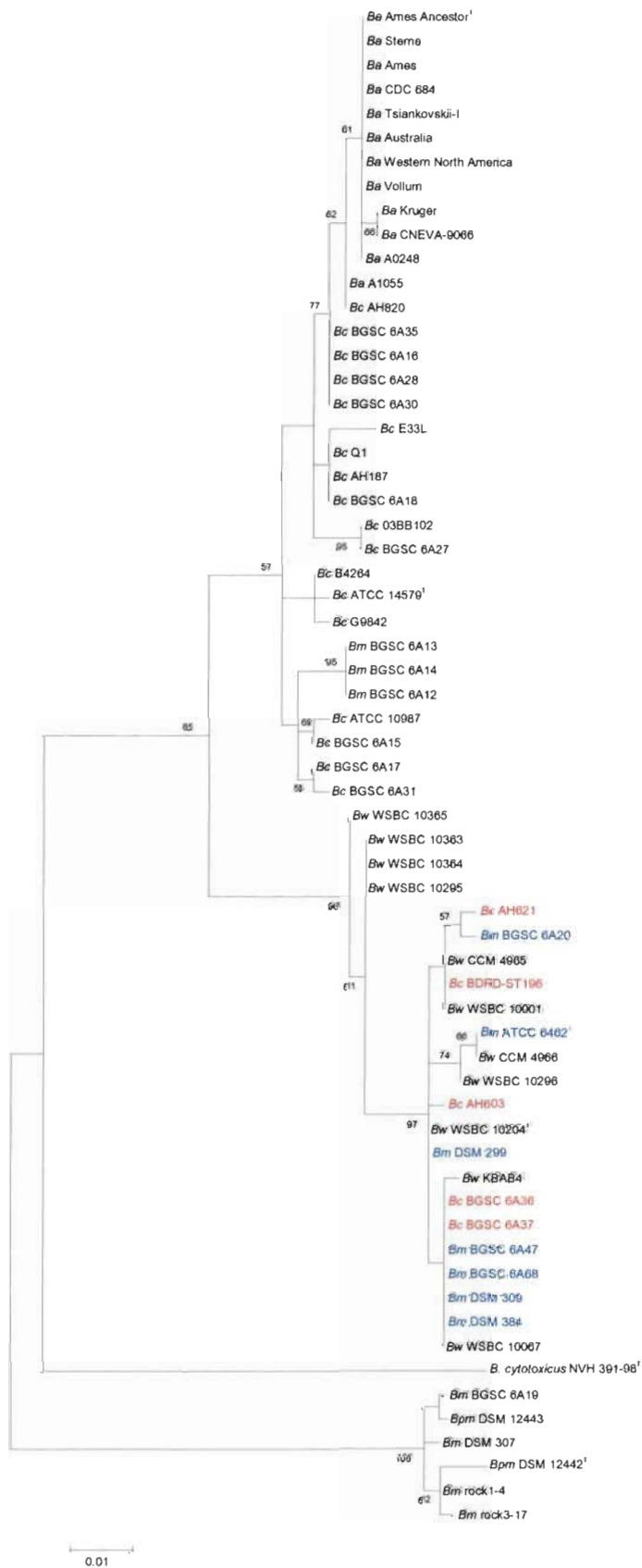


Figure S4

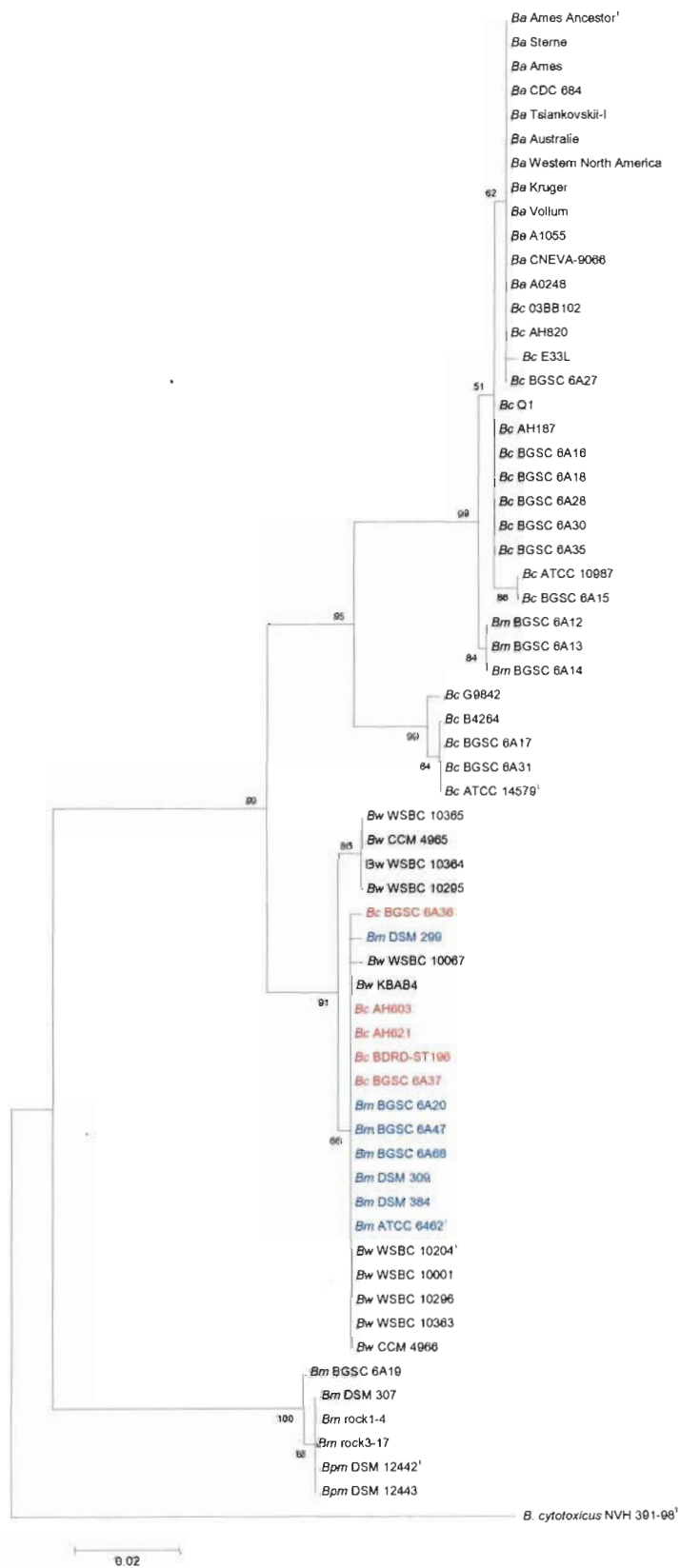


Figure S5

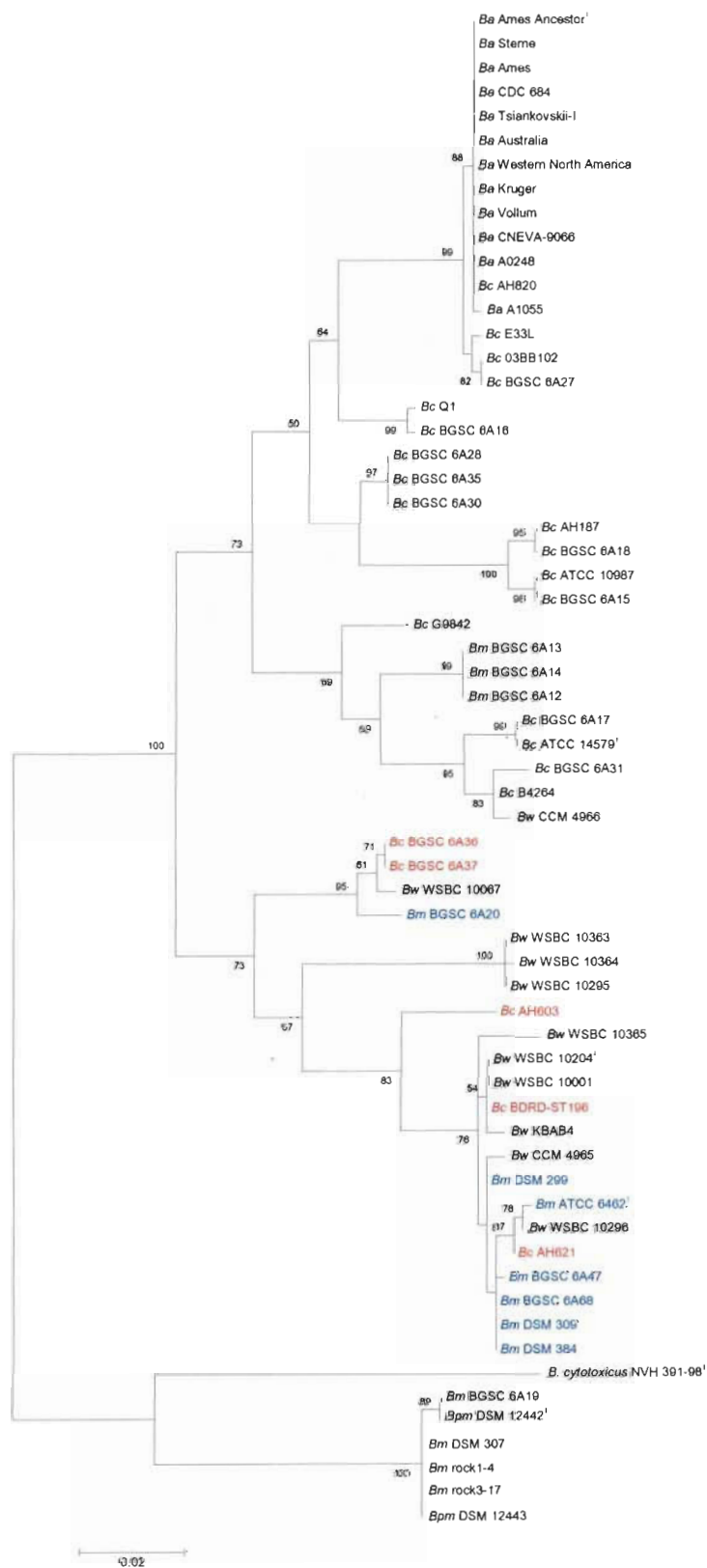


Figure S6

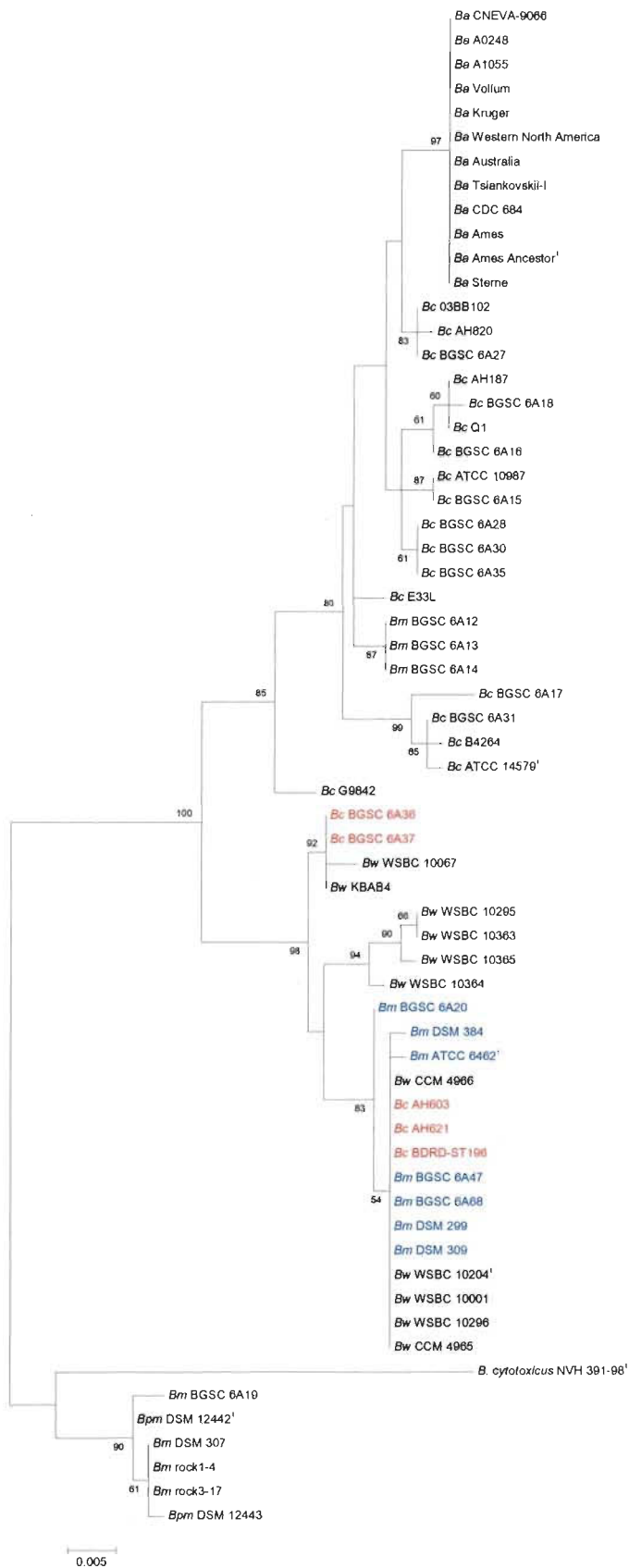
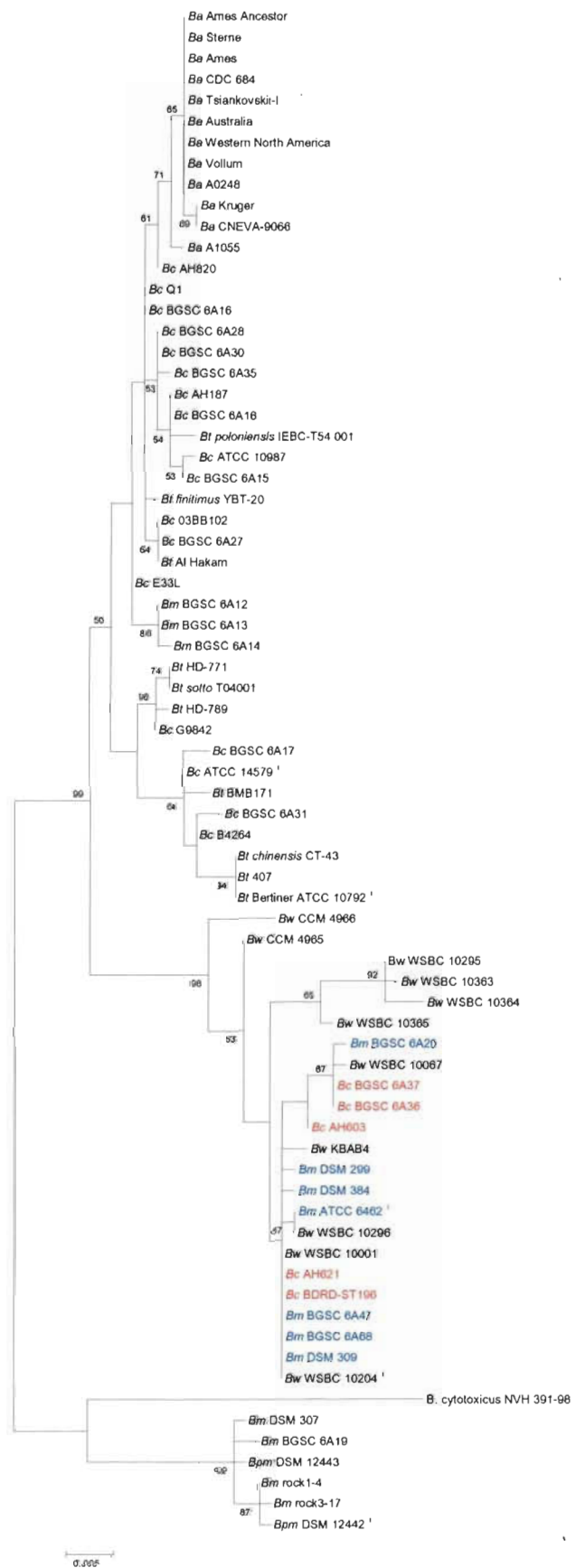


Figure S7



CHAPITRE V

DISCRIMINATION BETWEEN MESOPHILIC AND PSYCHROTOLERANT STRAINS IN THE *BACILLUS CEREUS* GROUP BASED ON THE PstI DIGESTION OF THE *PYCA* GENE

Le contenu de ce chapitre provient d'une publication de Brahim Soufiane et Jean-Charles Côté (2013). Discrimination between mesophilic and psychrotolerant strains in the *Bacillus cereus* group based on the PstI digestion of the *pycA* gene. *Current Microbiology* 67: 148-155.

Résumé

Une méthode simple et rapide a été développée pour détecter les souches de *B. weihenstephanensis* et les autres souches psychrotolérantes du groupe *B. cereus*. Nous avons noté plusieurs substitutions nucléotidiques dans les séquences du gène de ménage *pycA* entre les souches mésophiles et les souches psychrotolérante. Chez les souches de *B. weihenstephanensis*, la substitution nucléotidique à la position 795 du gène *pycA* a engendré un site de restriction pour l'enzyme PstI. Ce site est absent chez les souches mésophiles du groupe *B. cereus*. Le gène *pycA* est amplifié par PCR et les produits d'amplification ont été mis en présence de l'enzyme PstI. Sur un gel d'agarose, les souches mésophiles présentent une seule bande à 1718 bp correspondant au produit d'amplification non digéré. Les souches de *B. weihenstephanensis* et les souches psychrotolérantes du groupe *B. cereus* présentent deux bandes à 1175 bp et 543 bp qui correspondent aux produits de digestion de l'enzyme PstI. Cette méthode pourrait être utilisée pour identifier les souches psychrotolérantes et mésophiles qui proviennent de différents environnements.

**Discrimination between mesophilic and psychrotolerant strains in
the *Bacillus cereus* group based on the PstI digestion of the *pycA* gene**

Brahim Soufiane^{1,2} and Jean-Charles Côté¹

¹ Agriculture and Agri-Food Canada, Research and Development Centre, 430 Gouin Blvd, Saint-Jean-sur-Richelieu, QC, J3B 3E6, Canada

² Université du Québec à Trois-Rivières, Département de Chimie-Biologie, 3351 Boul. des Forges, P.O. Box 500, Trois-Rivières, QC, G9A 5H7, Canada

Correspondence to Jean-Charles Côté

E-mail: Jean-Charles.Cote@agr.gc.ca

Tel: 1-450-515-2137

Fax: 1-450-346-7740

Short running title: Mesophilic and psychrotolerant strains in the *B. cereus* group

Keywords *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. cytotoxicus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*

Abstract

A simple and rapid assay for the detection of *Bacillus weihenstephanensis* isolates and other psychrotolerant strains in the *Bacillus cereus* group was developed. It is based on the presence of a nucleotide substitution at position 795 on the housekeeping *pycA* gene in all *B. weihenstephanensis* strains. This mutation creates a PstI recognition site. It is absent in mesophilic strains in the *B. cereus* group. The *pycA* gene is amplified by PCR and the amplicons submitted to PstI digestions. In mesophilic strains, a single band of 1718 bp in length is visualized on an agarose gel. In *B. weihenstephanensis* strains and in all other psychrotolerant strains from the *B. cereus* group, the amplicons are cleaved and two bands of 1175 and 543 bp, respectively, are visualized. This method could be used for the screening of *B. cereus* collections and for the identification of psychrotolerant and mesophilic isolates from different environments.

Introduction

The *Bacillus cereus* group *sensu lato* comprises seven genetically very closely related species: *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus cytotoxicus* and *Bacillus weihenstephanensis*. They are Gram-positive, rod-shaped, aerobic, sporulating bacteria [4, 7, 16, 21]. The delineation of species in the *B. cereus* group rests on a small number of phenotypic characters that serve practical purposes: etiologic agent of anthrax, production of a parasporal inclusion body, rhyzoid or mycoid colony morphology, thermotolerance and psychrotolerance for *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* and *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* and *B. weihenstephanensis*, respectively. The optimal growth temperatures of these species range from 25 °C to 35 °C. *Bacillus weihenstephanensis*, however, is also psychrotolerant. It can grow at 7 °C, albeit at a much lower rate. It was further defined by the presence of specific 16S rRNA and *cspA* [6]. Recently, we revealed additional specific signature sequences and single nucleotide polymorphisms on the *glpF*, *gmk*, *purH*, *tpi* and *pycA* genes [16].

Over the last two decades, several psychrotolerant *B. cereus* [2, 6, 9, 17, 20], *B. thuringiensis* [1, 15] and *B. mycoides* [6] strains have been identified. Owing to selective pressure, psychrotolerant strains were often isolated from refrigerated foods, most notably stored dairy products [5, 6, 8, 9]. The identification of psychrotolerant strains rests on the growth of a bacterial isolate following 7 to 12 days of incubation at 7 °C. We report here a simple and rapid method for the identification of psychrotolerant strains in the *B. cereus* group.

Materials and Methods

Bacterial strains and DNA isolation

The 168 bacterial strains used in this study and their provenance are listed in Table 1. These include 22 *B. anthracis*, 21 *B. cereus*, 93 *B. thuringiensis*, 16 *B. mycoides*, two *B. pseudomycoides*, one *B. cytotoxicus* and 13 *B. weihenstephanensis* strains. When

available, the bacterial strains were cultured and their total DNAs isolated as described previously [14].

Bacterial cultures at 7 °C

The 126 bacterial strains available for culture were tested for their ability to grow at 7 °C in LB (Luria-Bertani) liquid medium (Table 1). They were first inoculated on LB plates and incubated at 30 °C, overnight. For each strain, a single colony was used to inoculate 2 ml of LB medium in 14 ml tubes and incubated at 7 °C on a rotary shaker (200 rpm) for 168 h. Negative and positive growths were assessed by absence or presence of turbidity. The mesophilic *B. cereus* ATCC 14579^T and the psychrotolerant *B. weihenstephanensis* WSBC 10204^T were used as negative and positive controls.

Amplification of *pycA* gene

The *pycA* gene was amplified with the primer pair *pycA*-F1/-R1: *pycA*-F1 (5'-CACCTGGATATGGTTTCTTGTC-3') and *pycA*-R1 (5'-CCTTCYACCCAGTTTAAGCTATC-3') for the 126 bacterial strains available for cultures. Primers were designed based on a consensus sequence of the *pycA* orthologous sequences in *B. cereus* ATCC 14579^T, *B. anthracis* Ames Ancestor, *B. thuringiensis* serovar *bolivia*, *B. thuringiensis* Al Hakam, *B. mycoides* Rock3-17 and *B. weihenstephanensis* KBAB4. Position of both primers on the *pycA* gene, the extent of the amplified region and the size of the amplicons are shown in Fig. 1. The amplification was performed for 25 cycles at denaturing temperature of 95 °C for 25 s, annealing at 46 °C for 25 s, and extension at 72 °C for 50 s. The PCR amplicons were visualized on a 0.7% agarose gel and stored at -20 °C. The other 42 bacterial strains under study were not available for cultures. Their corresponding *pycA* gene sequences were retrieved directly from GenBank (Table 1).

PstI digestion

The PCR products were digested with the restriction endonuclease PstI. This enzyme recognizes the nucleotide sequence CTGCAG and cuts between the adenine and guanine. A volume of 10 µl of PCR products was mixed with 34 µl of sterilized deionized water and 5 µl of enzyme buffer 10X. A volume of 1 µl of PstI (New England BioLabs LTD, ON, Canada) was added to the reaction. The mixture was incubated at 37 °C for 1h. The product of the reaction was visualized following electrophoresis on a 0.7% agarose gel.

In silico digestion

A total of 42 bacterial strains was not available for cultures. These include all 22 *B. anthracis*, 9 *B. cereus*, seven *B. thuringiensis*, two *B. mycoides*, one *B. cytotoxicus* and one *B. weihenstephanensis* strains. The *pycA* gene sequences corresponding to the region amplified with the primer pair *pycA*-F1/-R1 were *in silico* digested with PstI and displayed on a virtual agarose gel using REBsites (New England Biolabs; <http://rebase.neb.com/rebase/rebtools.html>).

DNA cloning and sequencing

The PCR fragments were sequenced directly. The nucleotide sequences were determined by the dideoxynucleotide chain-termination method [12] using a capillary array automated DNA sequencer (ABI3730XL DNA Analyzer, Applied Biosystems, Foster, CA, USA) at the sequencing platform of the McGill University and Génome Québec Innovation Centre, Montreal, QC, Canada.

Nucleotide sequence accession number

Sequence data for the *pycA* gene were deposited with GenBank under accession numbers KC196974 to KC197004 and KC235352 to KC235356 (Table 1).

Results

A single pair of primers proved sufficient to amplify a single DNA fragment of 1718 bp in length from each of the 126 bacterial strains available for cultures. A subset of the amplicons visualised following electrophoresis is presented in Fig. 2A. Following *in vitro* digestion with PstI, 102 bacterial strains, ten *B. cereus*, 83 *B. thuringiensis*, seven *B. mycoides* and two *B. pseudomycoides*, showed a single band of 1718 bp indicative that no PstI cleavage had occurred (Fig. 1A). A subset of these is presented in Fig. 2B. The other 24 bacterial strains, two *B. cereus*, three *B. thuringiensis*, seven *B. mycoides* and 12 *B. weihenstephanensis* strains, showed two bands of 1175 and 543 bp, respectively. These two fragments correlate with the presence of a single PstI restriction site at the expected location (Fig. 1B). A subset of these is presented in Fig. 2C. A total of 42 bacterial strains was not available for cultures. Their *pycA* gene theoretical amplicons were *in silico* digested with PstI. A total of 38 bacterial strains, six *B. cereus*, all 22 *B. anthracis*, seven *B. thuringiensis*, two *B. mycoides* and one *B. cytotoxicus*, showed a single undigested band of 1718 bp. Four bacterial strains, three *B. cereus* and one *B. weihenstephanensis*, showed two bands of 1175 and 543 bp, indicative of PstI digestion. A subset of these is presented in Fig. 2D. The results of PstI digestion for all 168 bacterial strains are presented in Table 1.

The 126 bacterial strains available for cultures were tested for their psychrotolerance. A 100% correlation was established between psychrotolerance and the presence of the PstI restriction site on the amplified fragment of the *pycA* gene. All 24 psychrotolerant bacterial strains produced an amplicon that could be *in vitro* digested with PstI. Conversely, all 102 mesophilic strains produced an amplicon that could not be cleaved with PstI (Table 1).

The 38 bacterial strains not available for cultures and which showed *in silico* a single undigested band of 1718 bp are supposed mesophiles on the basis of comparisons with similar *in vitro* PstI undigested profiles of the mesophilic strains available for cultures. This is further reinforced by the presence of all 22 *B. anthracis* strains, a known mesophilic species. Likewise, the four bacterial strains not available for cultures and

which showed two bands of 1175 and 543 bp are supposed psychrotolerant. This is further reinforced by the presence of one *B. weihenstephanensis* strain, KBAB4, a member of the known psychrotolerant species.

Discussion

The *pycA* gene codes for pyruvate carboxylase. It plays a key role in carbon metabolism [13, 18]. In the *B. cereus* group, the gene is 3447 bp in length. In a previous study, the nucleotide sequence alignment of the *pycA* gene from strains of the *B. cereus* group revealed several nucleotide substitutions between mesophilic strains and the psychrotolerant *B. weihenstephanensis* strains [16]. One such substitution was of interest here. In the mesophilic strains, the nucleotide T was present at position 795 (Fig. 1A). In the psychrotolerant *B. weihenstephanensis* strains, the nucleotide A was present at position 795. This nucleotide substitution T → A creates a PstI recognition site CTGCAG at nucleotide positions 791 to 796 in psychrotolerant strains (Fig. 1B).

We have shown here, through a study of 168 bacterial strains from all seven species in the *B. cereus* group, that an amplicon of the *pycA* gene present in psychrotolerant strains could be digested *in vivo* or *in silico* with PstI, whereas the same amplicon from mesophilic strains remained undigested. Up to now, identification of psychrotolerant strains in the *B. cereus* group relied on the cultivation of bacteria at 7 °C for 7 to 12 days. The method described here, based on the PstI digestion of the *pycA* gene amplicon, is simple, accessible to most microbiology laboratories, and fast. Hundreds of bacterial strains can be screened within 10 h. Should its use become widespread, it could lead to the identification of additional psychrotolerant strains in the *B. cereus* group in current collections kept worldwide. It could also be used for the study of psychrotolerant strains from the *B. cereus* group in the environment, to follow their geographic distributions or seasonal variations; and from various samples, including stored dairy products and other raw or cooked refrigerated foods, and to determine the impact of pasteurisation and storage at cold temperature in the positive selection of psychrotolerant strains. It could also be used for the directed screening of psychrotolerant strains from

the *B. cereus* group for biotechnology and industrial applications [3, 10, 11]. Conversely, the method could also be used for the identification of mesophilic strains in the *B. cereus* group, known contaminants in hot dairy equipments [19].

References

1. Bartoszewicz M, Bideshi DK, Kraszewska A, Modzelewska E, Swiecicka I (2009) Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* display genetic and psychrotrophic properties characteristic of *Bacillus weihenstephanensis*. *J Appl Microbiol* 106:1967–1975
2. Dufrenne J, Bijwaard M, te Giffel M, Beumer R, Notermans S (1995) Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *Int J Food Microbiol* 27:175–183
3. Gounot AM (1991) Bacterial Life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. *J Appl Bacteriol* 71:386–397
4. Guinebretière MH, Auger S, Galleron N, Contzen M, De Sarrau B, De Buyser ML, Lamberet G, Fagerlund A, Granum PE, Lereclus D, De Vos P, Nguyen-The C, Sorokin A (2012) *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *Int J Syst Evol Microbiol* doi: 10.1099/ijso0306270
5. Larsen HD, Jørgensen K (1997) The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *Int J Food Microbiol* 34:179–186
6. Lechner S, Mayr R, Francis KP, Prüß BM, Kaplan T, Wießner-Gunkel E, Stewart GSAB, Scherer S (1998) *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol* 48:373–382
7. Logan NA, De Vos P (2009) Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174^{AL}. In: De Vos P, Guarrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB (eds) *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, 2nd edn. Springer, New York, pp 21–128
8. Meer RR, Baker J, Bodyfelt FW, Griffiths MW (1991) Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. *J Food Protection* 54:969–979
9. Páčová Z, Švec P, Stenfors LP, Vyletěllová M, Sedláček I (2003) Isolation of the psychrotolerant species *Bacillus weihenstephanensis* from raw cow's milk. *Czech J Anim Sci* 48:93–96
10. Paniker G, Aislabie J, Saul D, Bej AK (2002) Cold tolerance of *Pseudomonas* sp. 30-3 from oil-contaminated soil, Antarctica. *Polar Biol* 25:5–11

11. Paniker G, Aislabie J, Bej AK (2006) Analysis of aggregative behavior of *Pseudomonas* sp. 30-3 isolated from Antarctic Soil. *Soil Biol Biochem* 38:152–3157
12. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463–5467
13. Schär J, Regina Stol R, Schauer K, Loeffler DIM, Eylert E, Joseph B, Eisenreich W, Fuchs TM, Goebel W (2010) Pyruvate carboxylase plays a crucial role in carbon metabolism of extra- and intracellularly replicating *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 192: 1774–1784
14. Soufiane B, Côté J-C (2009) Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, *gyrB* and *aroE* gene sequence analyses. *Antonie van Leeuwenhoek* 95:33–45
15. Soufiane B, Côté J-C (2010) *Bacillus thuringiensis* serovars *bolivia*, *vazensis* and *navarrensensis* meet the description of *Bacillus weihenstephanensis*. *Current Microbiol* 60:343–349
16. Soufiane B, Baizet M, Côté J-C (2012) Multilocus sequence analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars *navarrensensis*, *bolivia* and *vazensis* and *Bacillus weihenstephanensis* reveals a common phylogeny. *Antonie van Leeuwenhoek* doi: 10.1007/s1048201298005
17. Stenfors LP, Granum PE (2001) Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiol Lett* 197:223–228
18. Tang KH, Tang YJ, Blankenship RE (2011) Carbon metabolic pathways in phototrophic bacteria and their broader evolutionary implications *Front. Microbio.* doi: 10.3389/fmicb.2011.00165
19. Svensson B, Eneroth A, Brendehaug J, Molin G, Christiansson A (2000) Involvement of a pasteurizer in the contamination of milk by *Bacillus cereus* in a commercial dairy plant. *J Dairy Res* 67:455–460
20. Van Netten P, Van De Moosdijk A, Van Hoensel P, Mossel DAA, Perales I (1990) Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *J Appl Microbiol* 69:73–79
21. Vilas-Bôas GT, Peruca AP, Arantes OM (2007) Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol* 53:73–687

Figure legends

Figure 1

Map of the *pycA* gene. The numbers are respective to the first nucleotide of the *pycA* gene. Short horizontal arrows indicate the orientations and positions of the primer pair used for amplification. **A:** The nucleotide T at position 795 in mesophilic strains is shown. The amplicon is 1718 bp in length. It contains no PstI site. **B:** The nucleotide A at position 795 in psychrotolerant strains is shown. The amplicon, when digested with PstI, will yield two fragments of 543 and 1175 bp, respectively.

Figure 2

Agarose gel electrophoresis of *pycA* gene amplicons from selected *B. cereus* (*Bc*), *B. anthracis* (*Ba*), *B. thuringiensis* (*Bt*), *B. mycoides* (*Bm*), *B. pseudomycooides* (*Bpm*), *B. cytotoxicus* (*Bcy*) and *B. weihenstephanensis* (*Bw*) strains. **A:** Products obtained following amplification. Lanes: 1, 100 bp DNA ladder; 2, *Bc* BGSC 6A15; 3, *Bc* BGSC 6A36; 4, *Bt kurstaki* IEBC-T03A001; 5, *Bt navarrensis* IEBC-T50 001; 6, *Bt bolivia* IEBC-T63 001; 7, *Bt vazensis* IEBC-T67 001; 8, *Bm* ATCC 6462; 9, *Bm* BGSC 6A12; 10, *Bpm* DSM 12443 and 11, *Bw* WSBC 10204. **B:** Uncleaved amplicons following PstI digestion. Lanes: 1, 100 bp DNA ladder; 2, *Bw* WSBC 10204 (cleaved control); 3, *Bc* BGSC 6A15; 4, *Bc* BGSC 6A30; 5, *Bt kurstaki* IEBC-T03A001; 6, *Bt finitimus* BGSC 4B2; 7, *Bt canadensis* IEBC-T05A001; 8, *Bm* BGSC 6A12; 9, *Bm* DSM 307; 10, *Bm* BGSC 6A19 and 11, *Bpm* DSM 12443. **C:** Cleaved amplicons following PstI digestion. Lanes: 1, 100 bp DNA ladder; 2, *Bt kurstaki* IEBC-T03A001 (uncleaved control); 3, *Bc* BGSC 6A36; 4, *Bc* BGSC 6A37; 5, *Bm* ATCC 6462; 6, *Bm* BGSC 6A20; 7, *Bm* BGSC 6A47; 8, *Bm* DSM 307; 9, *Bw* WSBC 10001; 10, *Bw* WSBC 10045 and 11, *Bw* CCM 4965. **D:** Virtual agarose gel analysis of cleaved and uncleaved amplicons following *in silico* PstI digestion. Lanes : 1, *Bw* KBAB4; 2, *Bcy* NVH 391-98; 3, *Ba* Ames Ancestor; 4, *Ba* A0488; 5, *Bc* ATCC 14579; 6, *Bc* ATCC 10987; 7, *Bc* AH603; 8, *Bc* AH621; 9, *Bc* BDRD-ST196; 10, *Bm* rock1-4; 11, *Bm* rock3-17.

Table 1 Bacterial strains and species used in this study

Species	H-antigen	Source or Strain ^b	Growth at 7 °C	No bands after PstI digestion	<i>pycA</i> gene GenBank accession number	
					Other work	This work
<i>B. anthracis</i>		Ames Ancestor	ND	1	NC 007530.2 ^c	
<i>B. anthracis</i>		Sterne	ND	1	NC 005945.1 ^c	
<i>B. anthracis</i>		Ames	ND	1	NC 003997.3 ^c	
<i>B. anthracis</i>		CDC 684	ND	1	NC 012581.1 ^c	
<i>B. anthracis</i>		Tsiankovskii-1	ND	1	ABDN02000003.1	
<i>B. anthracis</i>		Australia	ND	1	AAES01000024.1	
<i>B. anthracis</i>		W. N. America	ND	1	AAER01000035.1	
<i>B. anthracis</i>		Kruger	ND	1	AAEQ01000038.1	
<i>B. anthracis</i>		Voilum	ND	1	AAEP01000031.1	
<i>B. anthracis</i>		CNEVA-9066	ND	1	AAEN01000013.1	
<i>B. anthracis</i>		BF1	ND	1	AMDT01000004.1	
<i>B. anthracis</i>		Carbosap	ND	1	ANAO01000001.1	
<i>B. anthracis</i>		Heroin Ba4599	ND	1	AGQP01000021.1	
<i>B. anthracis</i>		UR-1	ND	1	ALNY01000032.1	
<i>B. anthracis</i>		A1055	ND	1	AAEO01000019.1	
<i>B. anthracis</i>		A0174	ND	1	ABLT01000024.1	
<i>B. anthracis</i>		A0193	ND	1	ABKF01000024.1	
<i>B. anthracis</i>		A0248	ND	1	NC 012659.1 ^c	
<i>B. anthracis</i>		A0389	ND	1	ABLB01000004.1	
<i>B. anthracis</i>		A0442	ND	1	ABKG01000004.1	
<i>B. anthracis</i>		A0465	ND	1	ABLH01000022.1	
<i>B. anthracis</i>		A0488	ND	1	ABJC01000022.1	
<i>B. cereus</i>		ATCC 14579 ^T	-	1	AE016877.1 ^c	
<i>B. cereus</i>		ATCC 10987	ND	1	AE017194.1 ^c	
<i>B. cereus</i>		E33L	ND	1	CP000001.1 ^c	
<i>B. cereus</i>		AH820	ND	1	CP001283.1 ^c	
<i>B. cereus</i>		03BB102	ND	1	CP001407.1 ^c	
<i>B. cereus</i>		Q1	ND	1	CP000227.1 ^c	
<i>B. cereus</i>		AH187	ND	1	CP001177.1 ^c	
<i>B. cereus</i>		AH603	ND	2	EEL69355.1	
<i>B. cereus</i>		AH621	ND	2	EEK71945.1	
<i>B. cereus</i>		BDRD-ST196	ND	2	EEL04827.1	
<i>B. cereus</i>		BGSC 6A15	-	1		KC196974
<i>B. cereus</i>		BGSC 6A16	-	1		KC196975
<i>B. cereus</i>		BGSC 6A17	-	1		KC196976
<i>B. cereus</i>		BGSC 6A18	-	1		KC196977
<i>B. cereus</i>		BGSC 6A27	-	1		KC196978
<i>B. cereus</i>		BGSC 6A28	-	1		KC196979
<i>B. cereus</i>		BGSC 6A30	-	1		KC196980
<i>B. cereus</i>		BGSC 6A31	-	1		KC196981
<i>B. cereus</i>		BGSC 6A35	-	1		KC196982
<i>B. cereus</i>		BGSC 6A36	+	2		KC196983
<i>B. cereus</i>		BGSC 6A37	+	2		KC196984
<i>B. thuringiensis</i>		Al Hakam	-	1	CP000485 ^c	
<i>B. thuringiensis</i>		CTC	-	1		KC196903
<i>B. thuringiensis</i>		GPI	-	1		KC196904
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>berliner</i>		ATCC 10792 ^T	ND	1	ACNF01000090.1	

Table 1 continued

Species	H-antigen	Source or Strain ^b	Growth at 7 °C	No bands after PstI digestion	<i>pycA</i> gene GenBank accession number	
					Other work	This work
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i>	1	T01001	-	1	ACNA01000089.1	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>finitimus</i>	2	YBT-020	ND	1	CP002508 ^c	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>finitimus</i>	2	BGSC 4B2	-	1		KC235352
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>alesti</i>	3a,3c	IEBC-T03 001	-	1		KC196905
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	3a,3b,3c	IEBC-T03A001	-	1		KC196906
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>sumiyoshiensis</i>	3a,3d	IEBC-T03B001	-	1		KC196907
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>fukuokaensis</i>	3a,3d,3e	IEBC-T03C001	-	1		KC196908
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>sotto</i>	4a,4b	T04001	-	1	ACNB01000128.1	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>sotto</i> bv. <i>dendrolimus</i>	4a,4b	IEBC-T04A001	-	1		KC196909
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kenyae</i>	4a,4c	IEBC-T04B001	-	1		KC196910
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i>	5a,5b	IEBC-T05 001	-	1		KC196911
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>canadensis</i>	5a,5c	IEBC-T05A001	-	1		KC196912
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>entomocidus</i>	6	IEBC-T06 001	-	1		KC196913
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>entomocidus</i> bv. <i>subtoxicus</i>	6a, 6b	IEBC-T06A001	-	1		KC196914
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	7	IEBC-T07 001	-	1		KC196915
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>morrisoni</i>	8a,8b	IEBC-T08 001	-	1		KC196916
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>morrisoni</i> pv. <i>tenebrionis</i>	8a,8b	IEBC-T08 017	-	1		KC196917
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>morrisoni</i> pv. <i>sandiego</i>	8a,8b		-	1		KC196918
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>ostrinae</i>	8a,8c	IEBC-T08A001	-	1		KC196919
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>nigeriensis</i>	8b,8d	IEBC-T08B001	-	1		KC196920
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tolworthi</i>	9	IEBC-T09 001	-	1		KC196921
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>darmstadiensis</i>	10a,10b	IEBC-T10 001	-	1		KC196922
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>londrina</i>	10a,10c	IEBC-T10A001	-	1		KC196923
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>toumanoffi</i>	11a,11b	IEBC-T11 001	-	1		KC196924
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kyushuensis</i>	11a,11c	IEBC-T11A001	-	1		KC196925
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>thompsoni</i>	12	IEBC-T12 001	-	1		KC196926
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>pakistani</i>	13	T13001	-	1	ACNC01000141.1	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	14	IEBC-T14 001	-	1		KC196927
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>dakota</i>	15	IEBC-T15 001	-	1		KC196928
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>indiana</i>	16	IEBC-T16 001	-	1		KC196929
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tohokuensis</i>	17	IEBC-T17 001	-	1		KC196930
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kunamotoensis</i>	18a,18b	IEBC-T18 001	-	1		KC196931
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>yosoo</i>	18a,18c	IEBC-T18A001	-	1		KC196932
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tochigiensis</i>	19	BGSC 4Y1	ND	1	ACMY01000091.1	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>yunnanensis</i>	20a,20b	IEBC-T20 001	-	1		KC196933
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>pondicheriensis</i>	20a,20c	BGSC 4BA1	ND	1	ACNH01000068.1	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>pondicheriensis</i>	20a,20c	IEBC-T20A001	-	1		KC235353
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>colmeri</i>	21	IEBC-T21 001	-	1		KC196934
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>shandongensis</i>	22	IEBC-T22 001	-	1		KC196935
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>japonensis</i>	23	IEBC-T23 001	-	1		KC196936
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>neoleonensis</i>	24a,24b	IEBC-T24 001	-	1		KC196937
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>novosibirsk</i>	24a,24c	IEBC-T24A001	-	1		KC196938
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>coreanensis</i>	25	IEBC-T25 001	-	1		KC196939
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>silo</i>	26	IEBC-T26 001	-	1		KC196940
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>mexicanensis</i>	27	IEBC-T27 001	-	1	JQ728650	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>monterrey</i>	28a,28b	BGSC 4AJ1	ND	1	ACNE01000099.1	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>monterrey</i>	28a,28b	IEBC-T28 001	-	1		KC235354
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>jegathesan</i>	28a,28c	IEBC-T28A001	-	1		KC196941
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>amagiensis</i>	29	IEBC-T29 001	-	1		KC196942
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>medellin</i>	30	IEBC-T30 001	-	1		KC196943

Table 1 continued

Species	H-antigen	Source or Strain ^b	Growth at 7 °C	No bands after PstI digestion	<i>pycA</i> gene GenBank accession number	
					Other work	This work
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>toguchini</i>	31	IEBC-T31 001	-	1		KC196944
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>cameroun</i>	32	IEBC-T32 001	-	1		KC196945
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>leesis</i>	33	IEBC-T33 001	-	1		KC196946
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>konkukian</i>	34	IEBC-T34 001	-	1		KC235355
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>seoulensis</i>	35	IEBC-T35 001	-	1		KC196947
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>malaysiensis</i>	36	IEBC-T36 001	-	1		KC196948
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>andahciensis</i>	37	IEBC-T37 001	-	1		KC196949
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>oswaldocruzi</i>	38	IEBC-T38 001	-	1		KC196950
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>brasiliensis</i>	39	IEBC-T39 001	-	1		KC196951
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>huazhongensis</i>	40	BGSC 4BD1	ND	1	ACN101000083.1	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>sooncheon</i>	41	IEBC-T41 001	-	1	JQ728644	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>jinghongensis</i>	42	IEBC-T42 001	-	1		KC196952
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>guiyangensis</i>	43	IEBC-T43 001	-	1		KC196953
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>higo</i>	44	IEBC-T44 001	-	1		KC196954
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>roskildensis</i>	45	IEBC-T45 001	-	1		KC196955
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>chanpasis</i>	46	IEBC-T46 001	-	1		KC196956
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>wratislaviensis</i>	47	IEBC-T47 001	-	1		KC196957
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>balearica</i>	48	IEBC-T48 001	-	1		KC196958
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>muju</i>	49	IEBC-T49 001	-	1		KC196959
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>navarrensensis</i>	50	IEBC-T50 001	+	2	JQ728647	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>xianguangensis</i>	51	IEBC-T51 001	-	1		KC196960
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kim</i>	52	IEBC-T52 001	-	1	JQ728643	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>asturiensis</i>	53	IEBC-T53 001	-	1		KC196961
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>poloniensis</i>	54	IEBC-T54 001	-	1	JQ728640	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>palmanyolensis</i>	55	IEBC-T55 001	-	1		KC196962
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>rongseni</i>	56	IEBC-T56 001	-	1		KC196963
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>pirenaica</i>	57	IEBC-T57 001	-	1		KC196964
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>argentinensis</i>	58	IEBC-T58 001	-	1		KC196965
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>iberica</i>	59	IEBC-T59 001	-	1		KC196966
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>pinghuosensis</i>	60	IEBC-T60 001	-	1		KC196967
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>sylvestriensis</i>	61	IEBC-T61 001	-	1		KC196968
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>zhaodongensis</i>	62	IEBC-T62 001	-	1		KC196969
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>bolivia</i>	63	IEBC-T63 001	+	2	JQ728638	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>azorensis</i>	64	IEBC-T64 001	-	1		KC196970
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>pulsiensis</i>	65	BGSC 4CC1	ND	1	ACNJ01000081.1	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>graciosensis</i>	66	IEBC-T66 001	-	1		KC196971
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>vazensis</i>	67	IEBC-T67 001	+	2	JQ728642	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>thailandensis</i>	68	IEBC-T68 001	-	1		KC196972
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>wuhanensis</i>	UN ^a	BGSC 4T1	-	1		KC196973
<i>B. mycoides</i>		ATCC 6462 ^T	+	2		KC196985
<i>B. mycoides</i>		BGSC 6A12	-	1		KC196986
<i>B. mycoides</i>		BGSC 6A13	-	1		KC196987
<i>B. mycoides</i>		BGSC 6A14	-	1		KC196988
<i>B. mycoides</i>		BGSC 6A19	-	1		KC196989
<i>B. mycoides</i>		BGSC 6A20	+	2		KC196990
<i>B. mycoides</i>		BGSC 6A47	+	2		KC196991
<i>B. mycoides</i>		BGSC 6A49	-	1		KC196992
<i>B. mycoides</i>		BGSC 6A68	+	2		KC196993
<i>B. mycoides</i>		DSM 299	+	2		KC196994
<i>B. mycoides</i>		DSM 303	-	1		KC196995

Table 1 continued

Species	H-antigen	Source or Strain ^b	Growth at 7 °C	No bands after PstI digestion	<i>pycA</i> gene GenBank accession number	
					Other work	This work
<i>B. mycoides</i>		DSM 307	-	1		KC196996
<i>B. mycoides</i>		DSM 309	+	2		KC196997
<i>B. mycoides</i>		DSM 384	+	2		KC196998
<i>B. mycoides</i>		rock1-4	ND	1	ACMV01000174.1	
<i>B. mycoides</i>		rock3-17	ND	1	ACMW01000085.1	
<i>B. pseudomycooides</i>		DSM 12442 ^T	-	1	ACMX01000068	
<i>B. pseudomycooides</i>		DSM 12443	-	1		KC235356
<i>B. weihenstephanensis</i>		WSBC 10204 ^T	+	2	JQ728641	
<i>B. weihenstephanensis</i>		WSBC 10001	+	2	JQ728639	
<i>B. weihenstephanensis</i>		WSBC 10045	+	2		KC196999
<i>B. weihenstephanensis</i>		WSBC 10067	+	2	JQ728649	
<i>B. weihenstephanensis</i>		WSBC 10090	+	2		KC197000
<i>B. weihenstephanensis</i>		WSBC 10295	+	2	JQ728646	
<i>B. weihenstephanensis</i>		WSBC 10296	+	2		KC197001
<i>B. weihenstephanensis</i>		WSBC 10363	+	2		KC197002
<i>B. weihenstephanensis</i>		WSBC 10364	+	2		KC197003
<i>B. weihenstephanensis</i>		WSBC 10365	+	2	JQ728645	
<i>B. weihenstephanensis</i>		CCM 4965	+	2		KC197004
<i>B. weihenstephanensis</i>		CCM 4966	+	2	JQ728648	
<i>B. weihenstephanensis</i>		KBAB4	ND	2	CP000903 ^c	
<i>B. cytotoxicus</i>		NVH 391-98	ND	1	NC_009674.1 ^c	

^a UN: Unserotypable

^b IEBC, International Entomopathogenic *Bacillus* Center, Institut Pasteur, Paris, France; BGSC, *Bacillus* Genetic Stock Center, The Ohio State University, Columbus, OH, USA; ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA; WSBC, *B. weihenstephanensis* genomic DNA was kindly provided by the Microbial Ecology Group, Technical University of Munich, Freising, Germany; CCM, Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University Brno, Brno, Czech Republic

^c Entire genome.

+ or - indicates presence or absence of growth respectively

ND: Not determined

Figure 1

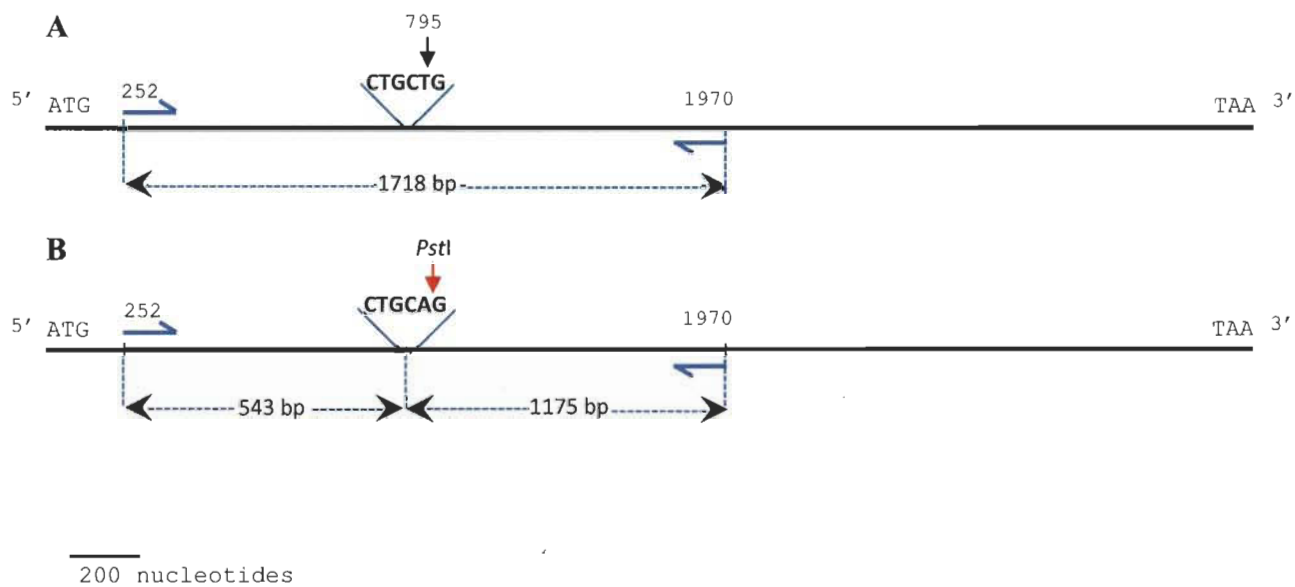
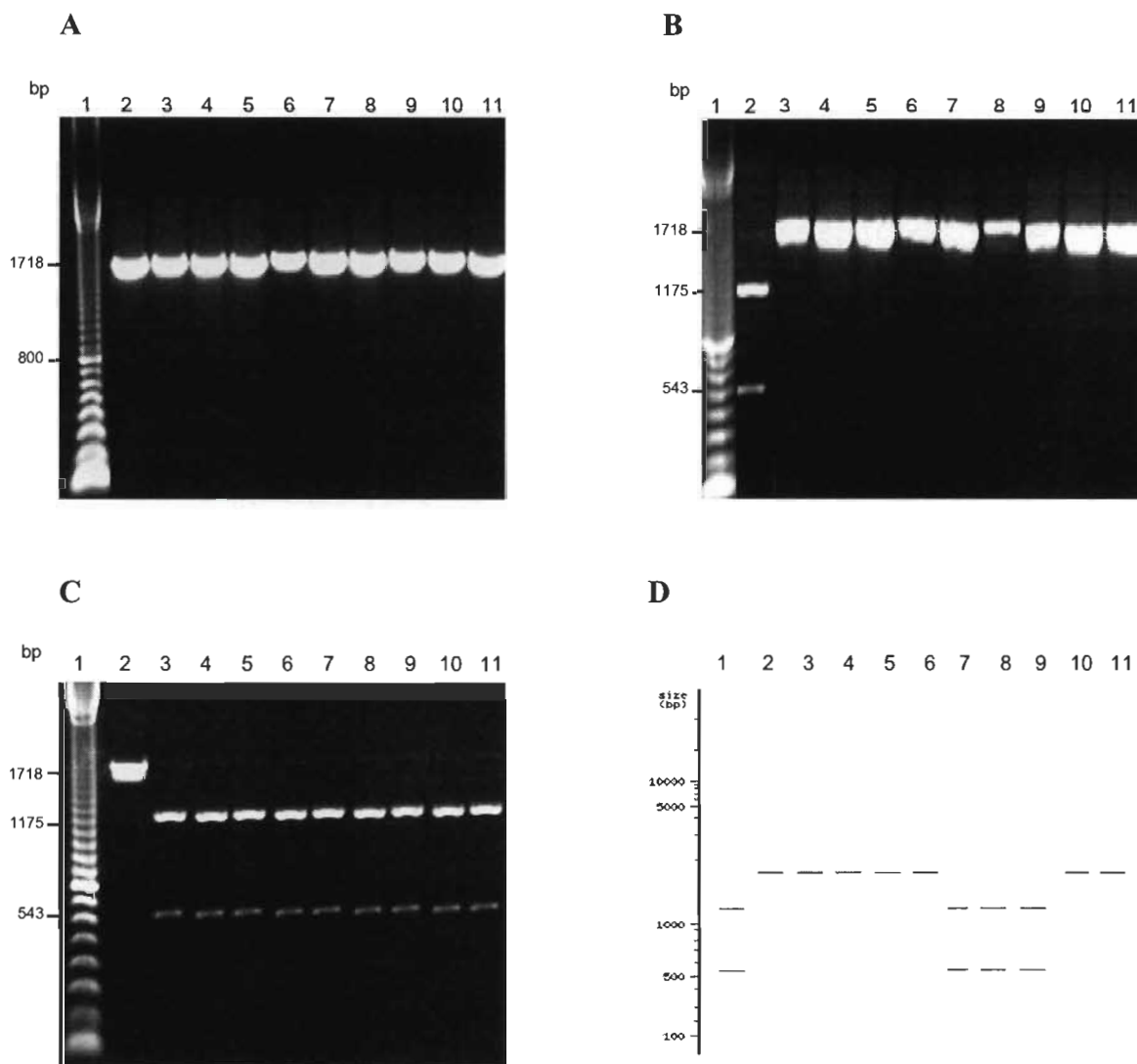


Figure 2



CHAPITRE VI

MUTUALLY EXCLUSIVE DISTRIBUTION OF THE *SAP* AND *EAG* S-LAYER GENES AND THE *LYTB/LYTA* CELL WALL HYDROLASE GENES IN *BACILLUS THURINGIENSIS*

Le contenu de ce chapitre provient d'une publication de Brahim Soufiane, Marc Sirois et Jean-Charles Côté (2011). Mutually exclusive distribution of the *sap* and *eag* S-layer genes and the *lytB/lytA* cell wall hydrolase genes in *Bacillus thuringiensis*. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology 100: 349-364.

Résumé

Récemment, deux études ont rapporté que les inclusions parasporales chez les souches *Bacillus thuringiensis* CTC et GP1 sont composées de protéines de la couche S, Sap et EA1 respectivement. Les protéines Sap et EA1 sont codées respectivement par les gènes *sap* et *eag*. Nous avons étudié la distribution de ces gènes chez toutes les souches de *B. thuringiensis*. Les autres souches du groupe de *B. cereus* ont été ajoutées pour comparaison seulement. Nous avons montré que les gènes *sap* et *eag* sont présents en tandem chez seulement 35 % des souches de *B. thuringiensis* analysées dans cette étude. Les souches de *B. thuringiensis* dépourvues de *sap* et *eag*, possèdent un autre tandem *lytB/lytA* qui code pour des hydrolases. La distribution des gènes *sap*, *eag* et *lytB/lytA* n'est pas spécifique à l'espèce *B. thuringiensis*, *B. cereus* et *B. weihenstephanensis*. Toutes les souches de *B. anthracis* et *B. mycoides* de cette étude possèdent les gènes *sap* et *eag*. Les souches de *B. pseudomycoïdes* sont dépourvues de *sap*, *eag* et *lytB/lytA*. Dans le groupe *B. cereus*, les souches qui possèdent les gènes *sap* et *eag*, n'ont pas les gènes *lytB/lytA* et l'inverse est vrai. Nous avons montré que deux gènes, *csaA* et *csaB*, impliqués dans le métabolisme de la paroi sont toujours présents en amont des gènes *sap*, *eag* et *lytB/lytA*. Des arbres phylogénétiques ont été créés suite aux analyses des séquences des produits des gènes *sap*, *eag* et *lytB/lytA*.

Mutually exclusive distribution of the *sap* and *eag* S-layer genes and the *lytB/lytA* cell wall hydrolase genes in *Bacillus thuringiensis*

Brahim Soufiane^{1,2}, Marc Sirois² and Jean-Charles Côté¹

¹ Agriculture and Agri-Food Canada, Research and Development Centre, 430 Gouin Blvd, Saint-Jean-sur-Richelieu, QC, Canada, J3B 3E6

² Université du Québec à Trois-Rivières, Département de Chimie-Biologie, 3351 Boul. des Forges, P.O. Box 500, Trois-Rivières, QC, Canada, G9A 5H7

Correspondence: Jean-Charles Côté, Agriculture and Agri-Food Canada, Research and Development Centre, 430 Gouin Blvd, Saint-Jean-sur-Richelieu, Quebec, Canada, J3B 3E6

E-mail: Jean-Charles.Cote@agr.gc.ca

Phone: 1 450 515 2137

Fax: 1 450 346 7740

Short title: S-layer genes in *Bacillus thuringiensis*

Abstract

Recently, two *Bacillus thuringiensis* strains were reported to synthesize parasporal inclusion bodies made not of the expected crystal (Cry) proteins but rather of the surface layer proteins (SLP) Sap (encoded by *sap*) and EA1 (encoded by *eag*), respectively. Whether the presence of the *sap* and *eag* genes is restricted to these two *B. thuringiensis* strains or ubiquitous in *B. thuringiensis* is unknown. We report here the distribution of the *sap* and *eag* genes in *B. thuringiensis*. Strains in the *Bacillus cereus* group were added for comparison purposes. We show that *sap* and *eag* are either present in tandem in 35% of the *B. thuringiensis* strains analysed and absent in 65% of the strains. When absent, a different tandem, the *lytB/lytA* cell wall hydrolase genes, is present. The distribution of the *sap* and *eag* S-layer and the *lytB/lytA* cell wall hydrolase genes is not species-specific in *B. thuringiensis*, *B. cereus* and *Bacillus weihenstephanensis*. *Bacillus anthracis* and *Bacillus mycoides* harbor *sap* and *eag* but not *lytB/lytA*. The *sap*, *eag* and *lytB/lytA* genes were absent in *Bacillus pseudomycooides*. Clearly, the distribution of the *sap* and *eag* S-layer and the *lytB/lytA* cell wall hydrolase genes in *B. thuringiensis* and in the *Bacillus cereus* group is mutually exclusive. We also showed that two genes involved in cell wall metabolism, *csaA* and *csaB*, are present not only upstream of the *sap* and *eag* S-layer genes, but also upstream of the *lytB/lytA* tandem in strains where *sap* and *eag* are absent. Bootstrapped neighbor-joining trees were inferred from the translated amino acid sequences of *sap*, *eag* and the tandem *lytB/lytA*, respectively.

Keywords *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, S-layer, *sap*, *eag*, *lytB/lytA*

Introduction

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive, rod-shaped, aerobic, endospore-forming bacterium. Upon sporulation, it is further characterized by the synthesis of a parasporal inclusion body, usually referred to as a crystal. This crystal is made of proteins, the Cry proteins (Höfte and Whiteley 1989; Schnepf *et al.* 1998; Garcia-Robles *et al.* 2001). Different *B. thuringiensis* strains have been formulated as bio-insecticides. They are used for the control of economically-important insect pests in agriculture and forestry and medically-important insect pests (reviewed in Glare and O'Callaghan 2000). These successes have led to the establishment of several screening programs for novel *B. thuringiensis* strains, either more toxic or expressing novel pesticidal activities. This diversity of *B. thuringiensis* strains has been classified into 69 H-serotypes (Lecadet *et al.* 1999).

In addition to *B. thuringiensis*, the “*Bacillus cereus* group” includes five other very closely related species: *B. cereus* sensu stricto, *Bacillus anthracis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus mycoides* and *Bacillus pseudomycoides* (reviewed in Turnbull *et al.* 2002; Jensen *et al.* 2003; Vilas-Bôas *et al.* 2007; Logan and De Vos 2009). They can, however, generally be distinguished by a small subset of phenotypic characters. *B. cereus* is a ubiquitous soil bacterium. Whereas some strains can be used as probiotics, others can be found in a variety of foods, causing diarrheal and emetic food poisoning syndromes in humans and contamination problems in the dairy product industry (Drobniowski 1993; Schoeni and Wong 2005). *B. anthracis* is the etiologic agent of anthrax, an acute disease which affects primarily herbivorous mammals. It can spread to other mammals, including man (Missiakas and Schneewind 2005). *B. weihenstephanensis* is psychrotolerant; it grows at 7°C but not at 43°C. It is further characterized by the presence of specific signature sequences in the 16S rRNA (small subunit ribosomal RNA) and *cspA* (cold-shock protein) genes (Lechner *et al.* 1998). *B. mycoides* is characterized by the formation of rhizoid colonies and the absence of motility (Logan and De Vos 2009). *B. pseudomycoides* is phenotypically similar to *B. mycoides* and is distinguished by DNA relatedness and fatty acid composition (Nakamura 1998).

The surface layer (S-layer) is a two-dimensional lattice structure that covers the cell surface of many archaea and eubacteria (Sleytr *et al.* 2001). It is involved in cell adhesion and can act as protective coats, molecular sieves and traps, and virulence factors (Sleytr and Beveridge 1999). It is usually made of a single species of glycoprotein (Sleytr and Sára 1997), the S-layer protein (SLP). Two SLP have been characterized in *B. anthracis*: the surface array protein, Sap (Étienne-Toumelin *et al.* 1995), and the extracellular antigen 1, EA1 (Mesnage *et al.* 1997). They are encoded by the developmentally regulated *sap* and *eag* genes, respectively. The S-layer is made of Sap proteins during the exponential growth phase and of EA1 proteins during the stationary phase (Mignot *et al.* 2002).

Recently, two *B. thuringiensis* strains, GP1 (Peña *et al.* 2006) and CTC (Sun *et al.* 2001; Zhu and Yu 2008) were reported to harbor parasporal inclusion bodies not made of the typical Cry proteins but rather of S-layer proteins EA1 and Sap, respectively. Whether the presence of the *sap* and *eag* genes is restricted to these two *B. thuringiensis* strains or whether they are ubiquitous in *B. thuringiensis* is unknown. Lately, Guo *et al.* (2008) have shown by Western blot analyses that 25% of 59 *B. thuringiensis* strains tested reacted to antisera specific for the structural part of SLP. They concluded that 25% of *B. thuringiensis* strains could possess parasporal inclusion bodies made of SLP. Our aim here was to study the distribution of the S-layer *sap* and *eag* genes in the vast diversity of *B. thuringiensis* H-serotypes. Strains from the *B. cereus* group were added for comparison purposes. Several unexpected findings were revealed and are discussed.

Materials and Methods

Bacterial strains, distribution of *sap*, *eag* and *lytB/lytA* genes and culture conditions

The 113 bacterial strains used in the present study and their provenances are listed in Table 1. These include 80 *B. thuringiensis* strains from 57 H serotypes and 33 strains in the *B. cereus* group added for comparison purposes: 5 *B. anthracis*, 10 *B. cereus*, 3 *B. mycoides*, 2 *B. pseudomycoides* and 13 *B. weihenstephanensis*. The genomes had

been fully sequenced for 18 of these strains. Their sequences were available from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) as indicated in Table 1. The *sap*, *eag* and *lytB/lytA* gene nucleotide sequences were retrieved directly when present. In addition, the sequences of the *sap* and *eag* genes for five *B. thuringiensis* strains (CTC, BGSC 4Y1, BGSC 4BA1, BGSC 4CC1 and BGSC 4AJ1) and the sequence of the *eag* gene for *B. thuringiensis* GPI were also available from GenBank. These sequences were retrieved directly. The other 90 bacterial strains were cultured here and their total DNAs were isolated as described previously (Soufiane and Côté 2009).

PCR primer design and amplification of *sap*, *eag* and *lytB/lytA* genes

sap S-layer gene

The *sap* gene was amplified using four different primer pairs; sap-F1/-R1, sap-F2/-R2, sap-F3/-R3 and sap-F4/-R4. The primer pair sap-F1/-R1 (sap-F1: 5'-¹ATGGCAAAGACTAACTCTTAC²¹-3' and sap-R1: 5'-²⁴⁵⁷GCGAGCTACTGTTACTGGTTT²⁴³⁷-3') was designed based on a consensus sequence of the *sap* gene in *B. thuringiensis* strain Al Hakam, *B. cereus* strain Q1 and four strains of *B. weihenstephanensis*: WSBC 10045, WSBC 10090, WSBC 10296 and CCM 4966. The superscript numbers correspond to the nucleotide position on the *sap* gene. The 5' end of sap-F1 corresponds to the ATG initiation codon. The primer pair sap-F2/-R2 (sap-F2: 5'-⁶⁰¹GCTAAGACTGACAAGCAGTT⁶²⁰-3' and sap-R2: 5'-²²⁵²ACTGTTGCTTTTGGCTGTAGT²²³³-3') was designed based on a consensus sequence of the *sap* gene in five *B. anthracis* strains: Ames Ancestor, Ames, Sterne, A0248 and CDC 684. The primer pair sap-F3/-R3 (sap-F3: 5'-³⁵⁴AGGCGACGGCACATTCGATCC³⁷⁴-3' and sap-R3: 5'-²³²²ATTCCTAAGTTAACTGCTT²³⁰³-3') was designed based on the sequence of the *sap* gene in *B. cereus* strain Q1. The primer pair sap-F4/-R4 (sap-F4: 5'-⁶¹⁹CAGTTCGGTACAGAAGTAGC⁶³⁸-3' and sap-R4: 5'-²³¹⁴TAGCAGTTTCTTCACTTACA²²⁹⁵-3') was designed based on the sequence of the *sap* gene in *B. thuringiensis* strain CTC. For the primer pair sap-F1/-R1, DNA was denatured at 95°C for 150 s and amplified for 25 cycles at denaturing temperature of

95°C for 45 s, annealing at 43°C for 45 s, and extension at 72°C for 150 s. For the primer pair sap-F2/-R2, DNA was denatured at 95°C for 180 s and amplified for 25 cycles at denaturing temperature of 95°C for 30 s, annealing at 47°C for 30 s, and extension at 72°C for 150 s. For the primer pair sap-F3/-R3, DNA was denatured at 95°C for 150 s and amplified for 25 cycles at denaturing temperature of 95°C for 45 s, annealing at 43°C for 45 s, and extension at 72°C for 150 s. For the primer pair eag-F4/-R4, DNA was denatured at 95°C for 150 s and amplified for 25 cycles at denaturing temperature of 95°C for 45 s, annealing at 39°C for 45 s, and extension at 72°C for 150 s. The PCR amplified products were visualized on a 0.7% agarose gel and stored at -20°C.

eag S-layer gene

The *eag* gene was amplified using four different primer pairs; eag-F1/-R1, eag-F2/-R2, eag-F3/-R3 and eag-F4/R4. The primer pair eag-F1/-R1 (eag-F1: 5'-¹ATGGCAAAGACTAACTCTTAC²¹-3' and eag-R1: 5'-²⁸⁶³TCGCAAACGCRATCGTGCCA²⁸⁴³-3') was designed based on a consensus sequence of the *eag* gene in *B. thuringiensis* strain Al Hakam and *B. anthracis* strain Ames Ancestor. The 5' end of eag-F1 corresponds to the ATG initiation codon. The *eag* gene is 2589 nucleotides in length in *B. thuringiensis* strain Al Hakam and *B. anthracis* strain Ames Ancestor. The 3' end of eag-R1, nucleotide A at position 2843, is located 254 nucleotides downstream of the TAA stop codon. The primer pair eag-F2/-R2 (eag-F2: 5'-³⁹TACAATGACAGCAGCAATGG⁵⁸-3' and eag-R2: 5'-²⁵⁶⁷ACGTTACGTGTACAGCTTG²⁵⁴⁸-3') was designed based on a consensus sequence of the *eag* gene in *B. thuringiensis* serovars *muju*, *roskildiensis*, *chanpaisis* and *monterrey*, *B. thuringiensis* strains Al Hakam and CTC, *B. weihenstephanensis* CCM 4965, *B. cereus* strains 03BB102, E33L and AH820, and *B. anthracis* strains Ames Ancestor, Ames, Sterne, A0248 and CDC 684. The primer pair eag-F3/-R3 (eag-F3: 5'-⁵⁹³CTAAATTTATCGCAGTAGCAG⁶¹³-3' and eag-R3: 5'-²⁹³⁸ACGACTATCCAGAAATCGTCATC²⁹¹⁶-3') used here correspond to Primer-25 and Primer-12, respectively, as described elsewhere (Guo *et al.* 2008). The primer pair

eag-F4/-R4 (eag-F4: 5'-⁴⁰ACAATGACAGCAGCAATGG⁵⁸-3' and eag-R4: 5'-²⁵⁵³TGTTACACCTTTGAAGAC²⁵³⁵-3') was designed based on a consensus sequence of the *eag* gene in *B. cereus* strain Q1 and *B. weihenstephanensis* CCM 4966. For the primer pair eag-F1/-R1, DNA was denatured at 95°C for 150 s and amplified for 25 cycles at denaturing temperature of 95°C for 45 s, annealing at 43,5°C for 60 s, and extension at 72°C for 150 s. For the primer pair eag-F2/-R2, DNA was denatured at 95°C for 150 s and amplified for 25 cycles at denaturing temperature of 95°C for 45 s, annealing at 47°C for 45 s, and extension at 72°C for 150 s. For the primer pair eag-F3/-R3, DNA was denatured at 95°C for 300 s and amplified for 25 cycles at denaturing temperature of 95°C for 60 s, annealing at 50°C for 60 s, and extension at 72°C for 60 s as described by elsewhere (Guo *et al.* 2008). For the primer pair eag-F4/-R4, DNA was denatured at 95°C for 150 s and amplified for 25 cycles at denaturing temperature of 95°C for 45 s, annealing at 47°C for 45 s, and extension at 72°C for 165 s. The PCR amplified products were visualized on a 0.7% agarose gel and stored at -20°C.

lytB/lytA genes

The *lytB/lytA* genes were amplified using a single primer pair, *lytB/lytA*-F1/-R1. The primer pair *lytB/lytA*-F1/-R1 (*lytB/lytA*-F1: 5'-²⁵ACAGCAGTGGCATTAAACGGGATCA⁴⁸-3' and *lytB/lytA*-R1: 5'-¹⁸³¹CGTATTCTAAGTTTTCTTTTGC¹⁸⁵²-3') was designed based on a consensus sequence of the *lytB/lytA* gene in *B. thuringiensis* serovar konkukian strain 97-27 and *B. weihenstephanensis* strain KBAB4. DNA was denatured at 95°C for 120 s and amplified for 25 cycles at denaturing temperature of 95°C for 45 s, annealing at 42°C for 45 s, and extension at 72°C for 120 s. The PCR amplified products were visualized on a 0.7% agarose gel and stored at -20°C.

DNA cloning and sequencing

Escherichia coli strain TOP10 (invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada) was used for cloning the *eag* PCR fragments ligated to the pCR 2.1-TOPO vector according to the

manufacturer's instructions. Briefly, recombinant transformants were selected on LB agar plates supplemented with ampicillin (50 µg/ml) and X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside; 40 µg/ml). Recombinant plasmids were isolated from white colonies using the alkaline-lysis method (Birboim and Doly 1979), to confirm the presence of an insert. The nucleotide sequences were determined by the dideoxynucleotide chain-termination method (Sanger *et al.* 1977) using a capillary array automated DNA sequencer (ABI3730xl DNA Analyzer, Applied Biosystems, Foster, CA, USA). The sequences were determined for both strands. The PCR fragments for *sap* and *lytB/lytA* genes were sequenced directly.

Phylogenetic analysis

The phylogenetic analysis was carried out using MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; version 3.1) (Kumar *et al.* 2004). The *sap*, *eag* and *lytB/lytA* nucleotide sequences from the 80 *B. thuringiensis* strains, five *B. anthracis*, ten *B. cereus*, three *B. mycoides*, two *B. pseudomycoides* and 13 *B. weihenstephanensis* strains were aligned using Clustal W (Thompson *et al.* 1994). The nucleotide sequence alignments were optimized manually based on translated amino acid sequences of reference strains: *B. thuringiensis* strains Al Hakam, CTC, *konkukian*, *B. anthracis* Ames Ancestor, *B. cereus* Q1 and *B. weihenstephanensis* KBAB4. All nucleotide sequences were translated into amino acid sequences. An amino acid sequences-inferred Neighbor-Joining tree was constructed (Saitou and Nei 1987), bootstrapped using 1000 random samples of sites from the alignment, displayed and printed with Tree Explorer, all part of the MEGA software package.

Nucleotide sequence accession number

Sequence data from this study were deposited with GenBank under accession no. HM626277 to HM626364, HM632034 and GU978971 to GU978995 (Table 1).

Results

Organisation and distribution of the *sap* and *eag* S-layer and *lytB/lytA* cell wall hydrolase genes in fully sequenced genomes

At the onset of this work, the genomes of three *B. thuringiensis* strains had been fully sequenced and were readily available from GenBank (Table 1). In addition, the entire genomes from five *B. anthracis*, nine *B. cereus* and one *B. weihenstephanensis* strains were also available from GenBank. They were included here for comparison purposes (Table 1). The organisation and distribution of the *sap* and *eag* S-layer genes were studied in these 18 bacterial strains. The names of the genes were either absent or when present, the nomenclature was not standardized across strains; however, the names of the encoded proteins were given. A total of seven different organisations was revealed (Fig. 1, Panel A). The names of the genes presented here are either those given by the authors of the sequencing projects or those given by us for the sake of clarity based on DNA sequence homologies. In all seven organisations, two genes, *csaA* and *csaB*, are located upstream of either the *sap-eag*, *slpA-eag* or *lytB-lytA* tandems. *csaA* and *csaB* code for a polysaccharide biosynthesis protein and pyruvyl-transferase, respectively. In *B. anthracis*, both proteins are involved in cell wall metabolism. Pyruvyl-transferase (CsaB) is necessary for anchoring Sap and EA1 to the cell surface (Mesnage *et al.* 2000, Sára 2001). An open reading frame (orf) encoding an hypothetical protein (HP) is located downstream of each tandem. In the three *B. thuringiensis* strains analyzed, three different organisations are revealed. In *B. thuringiensis* Al Hakam, two S-layer genes, *slpA* and *eag*, are present. In *B. thuringiensis* var. *konkukian* 97-27, both S-layer genes, *sap* and *eag*, are absent; different genes are present: the tandem *lytB/lytA* and a so-called *s-layer* gene. The tandem *lytB/lytA* codes for the peptidoglycan endo- β -N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase fusion (Shockman and Höltje 1994). They are cell wall hydrolases and play a role in restructuring the cell wall (Shockman and Höltje 1994). The so-called *s-layer* gene encodes a putative S-layer protein (Han *et al.* 2006). In *B. thuringiensis* var. *kurstaki* BMB171, both S-layer genes, *sap* and *eag*, are absent; the tandem *lytB/lytA* is present. In all five *B. anthracis* strains analyzed, the organisation of the S-layer genes is homogenous. Both S-layer genes, *sap*

and *eag*, are present; the tandem *lytB/lytA* is absent. Nine *B. cereus* strains were analyzed. In *B. cereus* E33L, Q1, AH187, AH820 and 03BB102, both S-layer genes, *sap* and *eag*, are present; the tandem *lytB/lytA* is absent. Conversely, in *B. cereus* ATCC 14579, B4264 and G9842, *sap* and *eag* are absent; the tandem *lytB/lytA* is present. In the ninth *B. cereus* analyzed, ATCC 10987, *sap* and *lytB/lytA* are absent; a truncated version of 246 bp of *eag* is present. In *B. weihenstephanensis* KBAB4, *sap* and *eag* are absent; the tandem *lytB/lytA* is present. In summary, based on 18 fully sequenced genomes (Table 1), when present, both S-layer genes *sap* and *eag* were present in tandem, exclusive of *lytB/lytA*. Conversely, when the tandem *lytB/lytA* was present, the tandem *sap* and *eag* was absent.

Fig. 1, Panel B shows a bootstrapped neighbor-joining tree inferred from the alignment of the translated amino acid sequences of the *sap*, *eag*, *slpA*, *s-layer* and *lytB/lytA* from a subset of the strains shown in Fig. 1, Panel A. Three clusters can be revealed. The cluster Sap contains the *sap* gene products from *B. anthracis* Ames Ancestor and *B. cereus* E33L and the *slpA* gene product from *B. thuringiensis* Al Hakam. Here, Sap from *B. anthracis* Ames Ancestor and *B. cereus* E33L share 99% amino acid sequence identities. Sap (*slpA* gene product) from *B. thuringiensis* Al Hakam is more diverged. The cluster EA1 contains the *eag* gene products from *B. thuringiensis* Al Hakam, *B. anthracis* Ames Ancestor and *B. cereus* E33L. All three amino acid sequences share at least 88% identities. The cluster LytB/LytA contains the *lytB/lytA* gene products from *B. thuringiensis* var. *konkukian* 97-27, *B. weihenstephanensis* KBAB4, and *B. cereus* ATCC 14579. All three amino acid sequences share at least 78% identities.

Although the Sap cluster shares less than 23% amino acid identities with the EA1 cluster, amino acids 1 to 55 and 1 to 206 from Sap and EA1 share 92% and 66% amino acid identities, respectively. This N-terminal region, termed the S-layer homology (SLH) domain, was shown to be involved in the binding of the S-layer protein to the cell envelope (reviewed in Sleytr *et al.* 1999; Sára and Sleytr 2000). The LytB/LytA cluster shares less than 13% and 18% amino acid identities with the Sap and EA1 cluster, respectively. Amino acids 1 to 202 and 1 to 147 from LytB/LytA show limited

homologies to Sap and EA1 with which they share 28% and 26% identities, respectively. The *B. thuringiensis* var. *konkukian* 97-27 so called *s-layer* gene product is unclustered. Clearly, the naming of these genes in GenBank can be at times confusing.

Amplification of *sap*, *eag* and *lytB/lytA* genes

Following the analyses of the organisation and distribution of the *sap* and *eag* S-layer genes in fully sequenced strains and the unexpected discovery of the *lytB/lytA* tandem in strains where the S-layer genes *sap* and *eag* were absent (Fig. 1, panel A), the presence of the *sap* and *eag* S-layer genes and the *lytB/lytA* tandem was searched in 90 additional strains (Table 1) by PCR using different pairs of gene-specific primers.

A first pair of primers, *sap*-F1/-R1, proved sufficient to amplify the *sap* gene from ten bacterial strains. As expected, the amplification products were 2457 bp in length (data not shown. A subset of the data is available online as electronic supplementary material). Three additional pairs of primers, *sap*-F2/-R2, *sap*-F3/-R3 and *sap*-F4/-R4, were designed and proved sufficient to amplify the *sap* gene for seven, six and two additional strains, respectively. In total, the *sap* gene was amplified from 25 bacterial strains: 13 *B. thuringiensis*, one *B. cereus*, three *B. mycoides* and eight *B. weihenstephanensis*. All four pairs of primers failed to amplify the *sap* gene from 62 bacterial strains: 58 *B. thuringiensis* and four *B. weihenstephanensis* (Table 1).

A first pair of primers, *eag*-F1/-R1, proved sufficient to amplify the *eag* gene from nine bacterial strains. As expected the amplification products were 2863 bp in length (data not shown). Three additional pairs of primers, *eag*-F2/-R2, *eag*-F3/-R3 and *eag*-F4/-R4, were designed and proved sufficient to amplify the *eag* gene for 12, three and one additional strains, respectively. In total, the *eag* gene was amplified from 25 bacterial strains: 13 *B. thuringiensis*, one *B. cereus*, three *B. mycoides* and eight *B. weihenstephanensis*. All four pairs of primers failed to amplify the *eag* gene from 62 bacterial strains: 58 *B. thuringiensis* and four *B. weihenstephanensis*.

A single pair of primers, *lytB/lytA-F1/-R1*, proved sufficient to amplify the *lytB/lytA* genes from 62 bacterial strains. As expected the amplification products were 1813 bp in length (data not shown). No amplification products were obtained for the other bacterial strains.

Phylogenetic analyses

Three bootstrapped neighbor-joining trees were generated from the alignment of the Sap, EA1 and LytB/LytA amino acid sequences. They are presented in Figures 2, 3 and 4, respectively.

Sap

Fig. 2 shows the phylogenetic relationships between the deduced Sap amino acid sequences for 19 *B. thuringiensis* and 22 additional strains in the *B. cereus* group now known to harbor the *sap* gene. Two major Groups, I and II, can be revealed at the 37% amino acid sequence identity and 50% similarity levels. Group I comprises 21 strains from four species: nine *B. thuringiensis*, four *B. cereus*, three *B. mycoides* and five *B. weihenstephanensis*. They share at least 67% amino acid sequence identity and 77% similarity. Group II comprises 20 strains from four species: ten *B. thuringiensis*, two *B. cereus*, three *B. weihenstephanensis* and all five *B. anthracis*. They share at least 74% amino acid sequence identity and 82% similarity. For each of three *B. thuringiensis* serovars, *tochigiensis*, *pondicheriensis* and *monterrey*, two different strains from different sources were included. The amino acid sequence for one of the strain was retrieved from Genbank, the other amino acid sequence was generated in this study (Table 1). In each of these three serovars, both Sap sequences were highly homologous. Here, the five *B. anthracis* strains are found in very close proximity of each other. The sub-grouping of the other strains is not species-specific.

EAI

Fig. 3 shows the phylogenetic relationships between the EAI amino acid sequences for 20 *B. thuringiensis* and 21 additional strains in the *B. cereus* group now known to harbor the *eag* gene. Two major Groups, I and II, can be revealed at the 65% amino acid sequence identity and 76% similarity levels. Group I comprises 35 strains from five species: 19 *B. thuringiensis*, five *B. cereus*, two *B. mycooides* (BGSC 6A14 and BGSC 6A68), four *B. weihenstephanensis* strains (CCM 4965, WSBC 10001, WSBC 10204 and WSBC 10067) and five *B. anthracis*. They share at least 88% amino acid sequence identity and 94% similarity. Group II comprises seven strains from four species: one *B. thuringiensis*, one *B. cereus*, one *B. mycooides*, and four *B. weihenstephanensis*. They share at least 90% amino acid sequence identity and 94% similarity. As previously observed with the Sap amino acid sequences, the *B. thuringiensis* serovars *tochigiensis*, *pondicheriensis* and *monterrey* EAI amino acid sequences retrieved from GenBank or generated in this study are highly homologous among strains from same serovar. Here also, the five *B. anthracis* strains are found closely grouped together. The sub-grouping of the other strains is not species-specific.

LytB/LytA

Fig. 4 shows the phylogenetic relationships between the LytB/LytA amino acid sequences for 60 *B. thuringiensis* and eight additional strains in the *B. cereus* group now known to harbor the *lytB/lytA* tandem. A single major Group I and a single branch are revealed. The LytB/LytA amino acid sequences are highly homologous among strains within Group I; they share at least 96% identity and 98% similarity. *B. thuringiensis* var. *konkukian* 97-27 is more distant; it shares less than 79% identity and 88% similarity with Group I. For *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*, two different strains from different sources were included. Here also, both LytB/LytA sequences were highly homologous.

Distribution of the *sap* and *eag* S-layer and *lytB/lytA* cell wall hydrolase genes in *B. thuringiensis*

Of the 80 *B. thuringiensis* strains studied here (Table 1), 19 harbor both *sap* and *eag* S-layer genes. It is worth noting that a deletion of 3161 bp, which covers the *sap* gene and flanking regions, occurred between the *csaB* and *eag* genes in *B. thuringiensis* var. *roskildiensis*. Interestingly, Mesnage *et al.* (1997) have shown that EA1 is found in abundance in strains where the *sap* gene has been disrupted. Whether this is the case in *B. thuringiensis* var. *roskildiensis* is unknown. These 20 *B. thuringiensis* strains do not carry the *lytB/lytA* tandem. The other 60 *B. thuringiensis* strains harbor the *lytB/lytA* tandem, but not the *sap* and *eag* S-layer genes. Of the ten *B. cereus* strains studied, six harbor the *sap* and *eag* S-layer genes and three harbor the *lytB/lytA* tandem. The tenth *B. cereus* strain, ATCC 10987, harbors no *sap* gene and its *eag* gene is truncated. All five *B. anthracis* and all three *B. mycoides* strains harbor the *sap* and *eag* S-layer genes. They do not carry the *lytB/lytA* tandem. Of the 12 *B. weihenstephanensis* strains, eight harbor the *sap* and *eag* S-layer genes. The other four *B. weihenstephanensis* strains harbor *lytB/lytA*. Two *B. pseudomycooides* strains were analyzed. We were unable to amplify the *sap* and *eag* S-layer genes and the *lytB/lytA* tandem. Recently, a *B. pseudomycooides* full genome sequence was deposited to the European Bioinformatic Institute (EMBL-EBI) (Read *et al.* 2010). This genome does not contain DNA sequences homologous to the *sap* and *eag* S-layer genes or to the *lytB/lytA* tandem. Interestingly, it also does not contain the *csaA* and *csaB* genes.

Discussion

Our aim at the onset of this work was to determine first the extent of the distribution of the S-layer genes in *B. thuringiensis*. Strains from the *B. cereus* group were added for comparison purposes. As stated earlier, the naming of S-layer genes in *B. thuringiensis* and the *B. cereus* group in GenBank was confused, indicating that a standardised nomenclature would be helpful. We recommend that the S-layer genes in the *B. cereus* group be named based on their homology with the fully characterized *sap* and *eag* genes in *B. anthracis* so that orthologous sequences be comparable directly. When necessary,

secondary and tertiary ranks could be introduced to reflect lower homologies. We have shown here that the *sap* and *eag* genes are present, in tandem, in 20 of the 80 *B. thuringiensis* strains analyzed. These strains covered 68 serovars. This is in accordance with Mignot *et al* (2001) who studied the distribution of S-layers in *B. cereus* strains isolated from soils and patients by biochemical assay and genetic analyses. They found that 37% of the *B. cereus* strains harboured an S-layer. Guo *et al.* (2008) showed by Western blot analyses that 25% of *B. thuringiensis* strains tested reacted to antisera specific for the structural part of SLP. They concluded that 25% of *B. thuringiensis* strains could possess parasporal inclusion bodies made of SLP. However, it would be misleading to conclude that Sap and EA1 producing-*B. thuringiensis* strains possess parasporal inclusion bodies made of Sap or EA1 instead of Cry proteins. In this regard, it is noteworthy that *B. thuringiensis* var. *finitimus* harbors both S-layer genes, *sap* and *eag* (Table 1) and its parasporal inclusion body is made of at least two Cry proteins, Cry26Aa1 and Cry28Aa1 (Wojciechowska *et al.* 1999). We are planning to analyze the composition of the inclusion bodies in the 20 *sap*⁺, *eag*⁺ *B. thuringiensis* strains identified here (Table 1). It is likely that many of these 20 strains will harbor a parasporal inclusion body made of Cry proteins. It remains possible, however, that some may harbor a parasporal inclusion body made of either Sap or EA1 proteins as exemplified with *B. thuringiensis* strains GP1 (Peña *et al.* 2006) and CTC (Sun *et al.* 2001; Zhu and Yu 2008), respectively.

We have also shown that the *sap* and *eag* genes were present in all five *B. anthracis*, six of the ten *B. cereus*, all three *B. mycoides* and eight of the 13 *B. weihenstephanensis* strains analyzed. By definition, however, presence of a parasporal inclusion body is limited to *B. thuringiensis*. These *sap*⁺ and *eag*⁺ *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, and *B. weihenstephanensis* strains do not produce parasporal inclusion bodies. It is reasonable, however, to hypothesize that Sap and EA1, when synthesized, could be detected by Western blots. Clearly, detection of SLP by Western blots would not be indicative of production of parasporal inclusion bodies made of SLP.

Our study has revealed several additional unexpected findings. When present, the *sap* and *eag* S-layer genes are found in tandem; when absent, however, the *lytB/lytA* cell wall hydrolase genes are found in tandem. The S-layer genes *sap* and *eag* are present in all *B. anthracis* and *B. mycoides* strains analyzed. The distribution of the S-layer and cell wall hydrolase gene, however, is not species-specific in *B. thuringiensis*, *B. cereus* and *B. weihenstephanensis*. We also showed (Fig 1, Panel A), that *csaA* and *csaB* are present not only upstream of the *sap* and *eag* S-layer genes, but also upstream of the *lytB/lytA* tandem in strains where *sap* and *eag* are absent. Mesnage *et al.* (2000) have suggested that CsaB is necessary for anchoring the SLH domain to the cell surface. The role of CsaA and CsaB in *B. thuringiensis* strains and in the *B. cereus* group in which Sap and EA1 are absent, and LytB/LytA present, is unknown. The mutually exclusive distribution of the S-layer genes *sap* and *eag* in 25% of the *B. thuringiensis* strains and the cell wall hydrolase genes *lytB/lytA* in 75% of the strains is puzzling. Given the numerous roles of the SLP and considering they are among the most abundant proteins synthesized (Sleytr and Beveridge 1999), it would be interesting to study the environmental distribution and ecological interactions, on the one hand of the *sap* and *eag*-, and on the other hand of the *lytB/lytA*-harboring *B. thuringiensis* strains.

References

- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513–1523
- Drobniewski FA (1993) *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev* 6:324–338
- Etienne-Toumelin I, Sirard JC, Duflot E, Mock M, Fouet A (1995) Characterization of the *Bacillus anthracis* S-layer: cloning and sequencing of the structural gene *J Bacteriol* 177:614–620
- Garcia-Robles I, Sanchez J, Gruppe A, Martinez-Ramirez AC, Rausell C, Real MD, Bravo A (2001) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 strain in hymenopteran forest pests *Insect. Biochem Mol Biol* 31:849–856.
- Glare TR, O’Callaghan M (2000) *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. John Wiley and Sons, Toronto, Canada
- Guo G, Zhang L, Zhou Z, Ma Q, Liu J, Zhu C, Zhu L, Yu Z, Sun M (2008) A new group of parasporal inclusions encoded by the S-layer gene of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett* 282:1–7
- Han CS, Xie G, Challacombe JF, Altherr MR, Bhotika SS, Bruce D, Campbell CS, Campbell ML, Chen J, Chertkov O, Cleland C, Dimitrijevic M, Doggett NA, Fawcett JJ, Glavina T, Goodwin LA, Hill KK, Hitchcock P, Jackson PJ, Keim P, Kewalramani AR, Longmire J, Lucas S, Malfatti S, McMurry K, Meincke LJ, Misra M, Moseman BL, Mundt M, Munk AC, Okinaka RT, Parson-Quintana B, Reilly LP, Richardson P, Robinson DL, Rubin E, Saunders E, Tapia R, Tesmer JG, Thayer N, Thompson LS, Tice H, Ticknor LO, Wills PL, Brettin TS, Gilna P (2006) Pathogenomic Sequence Analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Isolates Closely Related to *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 188:3382–3390
- Höfte H, Whiteley HR (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 53:242–255
- Jensen GB, Hansen BM, Eilenberg J, Mahillon J (2003) The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ Microbiol* 5:631–640
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5:150–163

- Lecadet M-M, Frachon E, Cosmao Dumanoir V, Ripouteau H, Hamon S, Laurent P, Thiery I (1999) Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol* 86:660–672
- Lechner S, Mayr R, Francis KP, Prüß BM, Kaplan T, Wießner-Gunkel E, Stewart GSAB, Scherer S (1998) *Bacillus weihenstephanensis* sp nov is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol* 48:1373–1382
- Logan NA, De Vos P (2009) Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174,^{AL} p. 21–128 In P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K-H. Schleifer, and W. B. Whitman (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed., vol. 3. Springer, New York, NY.
- Mesnager S, Tosi-Couture E, Mock M, Gounon P, Fouet A (1997) Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component: evidence that it is the major cell-associated antigen. *Mol Microbiol* 23:1147–1155
- Mesnager S, Fontaine T, Mignot T, Delepierre M, Mock M, Fouet A (2000) Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *EMBO J* 19:4473–4484
- Mignot T, Denis B, Couture-Tosi E, Kolstø AB, Mock M, Fouet A (2001) Distribution of S-layers on the surface of *Bacillus cereus* strains: phylogenetic origin and ecological pressure. *Environ Microbiol* 3:493–501
- Mignot T, Mesnager S, Couture-Tosi E, Mock M, Fouet A (2002) Developmental switch of S-layer protein synthesis in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* 43:1615–1627
- Missiakas DM, Schneewind O (2005) *Bacillus anthracis* and the pathogenesis of Anthrax. In *Biological Weapons Defense. Infectious Disease, Part II*, 79-97
- Nakamura LK (1998) *Bacillus pseudomycolides* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 48:1031–1035
- Peña G, Miranda-Rios J, de la Riva G, Pardo-López L, Soberón M, Bravo A (2006) A *Bacillus thuringiensis* S-layer protein involved in toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Appl Environ Microbiol* 72:353–360
- Read TD, Akmal A, Bioshop-Lilly K, Chen PE, Cook C, Kiley MP, Lentz S, Mateczun A, Nagarajan N, Nolan N, Osborne BI, Pop M, Sozhamannan S, Stewart AC, Sulakvelidze A, Thomason B, Willner K, Zwick ME (2010) (Accession Number CM000745, unpublished).

- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *P Natl Acad Sci USA* 74:5463–5467
- Sára M, Sleytr UB (2000) S-layer proteins. *J Bact* 182:859–868
- Sára M (2001) Conserved anchoring mechanisms between crystalline cell surface S-layer protein and secondary cell wall polymers in Gram-positive bacteria. *Trends Microbiol* 9:47–49
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean HD (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:775–806
- Schoeni JL, Wong AC (2005) *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J Food Prot* 68:636–48
- Shockman GD, Höltje J-V (1994) Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases, p. 131-166. *In* J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial cell wall*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Sleytr UB, Sára M (1997) Bacterial and archaeal S-layer proteins: structure-function relationships and their biotechnological applications. *TIBTECH* 15:20-26
- Sleytr UB, Beveridge TJ (1999) Bacterial S-layers. *Trends Microbiol* 7:253–260
- Sleytr UB, Messner P, Pum D, Sára M (1999) Crystalline bacterial cell surface layers (S-layers): from supramolecular cell structure to biomimetics and nanotechnology. *Angew Chem Int Ed* 38:1034–1054
- Sleytr UB, Sára M, Pum D, Schuster B (2001) Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layer. *Prog Surface Sci* 68:231–278
- Soufiane B, Côté JC (2009) Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, *gyrB* and *aroE* gene sequence analyses. *Antonie Leeuwenhoek* 95:33–45
- Sun M, Zhu C, Yu Z (2001) Cloning of parasporal body protein gene resembling to S-layer protein genes from *Bacillus thuringiensis* CTC strain *Acta Microbiol Sin* 41:141–147

- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Turnbull PCB, Jackson PJ, Hill KK, Keim P, Kolstø A-B, Beecher DJ (2002) Longstanding taxonomic enigmas within the “*Bacillus cereus* group” are on the verge of being resolved by far-reaching molecular development: forecasts on the possible outcome by an *ad hoc* team. in *Applications and systematics of Bacillus and relatives* (Eds. R. Berkeley, M. Hendrickx, N. Logan and P. De Vos). Blackwell Publishing, Oxford, U.K.
- Vilas-Bôas GT, Peruca AP, Arantes OM (2007) Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol* 53:673–687
- Wojciechowska JA, Lewitin E, Revina LP, Zalunin IA, Chestukhina GG (1999) Two novel delta-endotoxin gene families *cry26* and *cry28* from *Bacillus thuringiensis* ssp. *finitimus*. *FEBS Letters* 453:46–48
- Zhu C, Yu Z (2008) The surface layer protein of *Bacillus thuringiensis* CTC forms unique intracellular parasporal inclusion body. *J Basic Microbiol* 48:302–307

Figure legends**Figure 1, Panel A.**

Distribution and organisation of *sap* and *eag* S-layer genes and *lytB/lytA* cell wall hydrolase genes in fully sequenced genomes of bacteria in the *Bacillus cereus* group.

Figure 1, Panel B.

Bootstrapped neighbor-joining tree of a subset of the bacterial strains shown in Panel A. Bootstrap values are indicated. Clusters are named. The horizontal bar represents 20% amino acid differences. Abbreviations: *Bt*: *B. thuringiensis*; *Bc*: *B. cereus*; *Ba*: *B. anthracis*; *Bm*: *B. mycooides*; *Bw*: *B. weihenstephanensis*.

Figure 2.

Bootstrapped neighbor-joining tree of *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* group species and strains inferred from the alignment of the Sap amino acid sequences. Groups are indicated in roman numerals. The horizontal bar represents 10% amino acid differences. Abbreviations are as in Figure 1.

Figure 3.

Bootstrapped neighbor-joining tree of *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* group species and strains inferred from the alignment of the EA1 amino acid sequences. Groups are indicated in roman numerals. The horizontal bar represents 5% amino acid differences. Abbreviations are as in Figure 1.

Figure 4.

Bootstrapped neighbor-joining tree of *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* group species and strains inferred from the alignment of the LytB/LytA amino acid sequences. The horizontal bar represents 5% amino acid differences. Abbreviations are as in Figure 1.

Table 1 *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* group species and strains used in this study

Species	H-antigen	Strain or Source	GenBank accession no.			
			entire genome ^a or contig ^b	<i>sap</i> gene	<i>eag</i> gene	<i>lytB/lytA</i> gene
<i>Bt</i>		GP1		HM626288	AY956311 ^c	-
<i>Bt</i>		CTC		AJ012290 ^c	AY460125 ^c	-
<i>Bt</i>		Al Hakam	CP000485 ^a	+ ^d	+	-
<i>Bt</i> var. <i>thuringiensis</i>	1	IP-T01 001		-	-	HM626352
<i>Bt</i> var. <i>finitimus</i>	2	BGSC 4B2		HM626289	GU978980	-
<i>Bt</i> var. <i>alesti</i>	3a,3c	IP-T03 001		-	-	HM626305
<i>Bt</i> var. <i>kurstaki</i>	3a,3b,3c	HDI		-	-	HM626355
<i>Bt</i> var. <i>kurstaki</i>	3a,3b,3c	BMB171	CP001903 ^a	-	-	+
<i>Bt</i> var. <i>suniyoshiensis</i>	3a,3d	IP-T03B001		-	-	HM626345
<i>Bt</i> var. <i>fukuokaensis</i>	3a,3d,3e	IP-T03C001		-	-	HM626315
<i>Bt</i> var. <i>sotto</i>	4a,4b	IP-T04 001		-	-	HM626344
<i>Bt</i> var. <i>sotto</i> bv. <i>dendrolimus</i>	4a,4b	IP-T04A001		-	-	HM626314
<i>Bt</i> var. <i>kenyae</i>	4a,4c	IP-T04B001		-	-	HM626322
<i>Bt</i> var. <i>galleriae</i>	5a,5b	IP-T05 001		-	-	HM626316
<i>Bt</i> var. <i>canadensis</i>	5a,5c	IP-T05A001		-	-	HM626310
<i>Bt</i> var. <i>entomocidus</i>	6	IP-T06 001		-	-	HM626348
<i>Bt</i> var. <i>entomocidus</i> bv. <i>subtoxicus</i>	6a, 6b	IP-T06A001		-	-	HM626333
<i>Bt</i> var. <i>aizawai</i>	7	IP-T07 001		-	-	HM626304
<i>Bt</i> var. <i>morrisoni</i>	8a,8b	IP-T08 001		-	-	HM626328
<i>Bt</i> var. <i>morrisoni</i> pv. <i>tenebrionis</i>	8a,8b	IP-T08 001		-	-	HM626334
<i>Bt</i> var. <i>morrisoni</i> pv. <i>sandiego</i>	8a,8b			-	-	HM626331
<i>Bt</i> var. <i>ostrinae</i>	8a,8c	IP-T08A001		-	-	HM626329
<i>Bt</i> var. <i>nigeriensis</i>	8b,8d	IP-T08B001		-	-	HM626356
<i>Bt</i> var. <i>tolworthi</i>	9	IP-T09 001		-	-	HM626336
<i>Bt</i> var. <i>darmstadiensis</i>	10a,10b	IP-T10 001		-	-	HM626313
<i>Bt</i> var. <i>londrina</i>	10a,10c	IP-T10A001		-	-	HM626325
<i>Bt</i> var. <i>toumanoffi</i>	11a,11b	IP-T11 001		-	-	HM626353
<i>Bt</i> var. <i>thompsoni</i>	12	IP-T12 001		-	-	HM626340
<i>Bt</i> var. <i>pakistani</i>	13	IP-T13 001		-	-	HM626339
<i>Bt</i> var. <i>israelensis</i>	14	IP-T14 001		-	-	HM626319
<i>Bt</i> var. <i>dakota</i>	15	IP-T15 001		-	-	HM626312
<i>Bt</i> var. <i>indiana</i>	16	IP-T16 001		-	-	HM626349
<i>Bt</i> var. <i>tohokuensis</i>	17	IP-T17 001		-	-	HM626335
<i>Bt</i> var. <i>kumamotoensis</i>	18a,18b	IP-T18 001		-	-	HM626323
<i>Bt</i> var. <i>yosoo</i>	18a,18c	IP-T18A001		-	-	HM626364
<i>Bt</i> var. <i>tochigiensis</i>	19	IP-T19 001		HM626290	GU978982	-
<i>Bt</i> var. <i>tochigiensis</i>	19	BGSC 4Y1	NZ_ACMY01000030 ^b	+	+	-
<i>Bt</i> var. <i>yunnanensis</i>	20a,20b	IP-T20 001		-	-	HM626337
<i>Bt</i> var. <i>pondicheriensis</i>	20a,20c	IP-T20A001		HM626299	GU978976	-
<i>Bt</i> var. <i>pondicheriensis</i>	20a,20c	BGSC 4BA1	NZ_ACNH0100002 ^b	+	+	-
<i>Bt</i> var. <i>colmeri</i>	21	IP-T21 001		-	-	HM626311
<i>Bt</i> var. <i>japonensis</i>	23	IP-T23 001		-	-	HM626320
<i>Bt</i> var. <i>novosibirsk</i>	24a,24c	IP-T24A001		-	-	HM626346
<i>Bt</i> var. <i>coreanensis</i>	25	IP-T25 001		-	-	HM626350
<i>Bt</i> var. <i>silo</i>	26	IP-T26 001		-	-	HM626332
<i>Bt</i> var. <i>mexicanensis</i>	27	IP-T27 001		-	-	HM626327

Table 1 continued

<i>Bt</i> var. <i>monterrey</i>	28a,28b	IP-T28 001		HM626300	GU978992	-
<i>Bt</i> var. <i>monterrey</i>	28a,28b	BGSC 4AJ1	NZ_ACNE01000019 ^b	+	+	-
<i>Bt</i> var. <i>jegathesan</i>	28a,28c	IP-T28A001		-	-	HM626321
<i>Bt</i> var. <i>medellin</i>	30	IP-T30 001		-	-	HM626326
<i>Bt</i> var. <i>toguchini</i>	31	IP-T31 001		-	-	HM626363
<i>Bt</i> var. <i>leesis</i>	33	IP-T33 001		-	-	HM626324
<i>Bt</i> var. <i>konkukian</i>	34	97-27	AE017355 ^a	-	-	+
<i>Bt</i> var. <i>andaluciensis</i>	37	IP-T37 001		-	-	HM626357
<i>Bt</i> var. <i>oswaldocruzi</i>	38	IP-T38 001		-	-	HM626360
<i>Bt</i> var. <i>brasiliensis</i>	39	IP-T39 001		HM626301	GU978985	-
<i>Bt</i> var. <i>huazhongensis</i>	40	IP-T40 001		-	-	HM626318
<i>Bt</i> var. <i>sooncheon</i>	41	IP-T41 001		-	-	HM626361
<i>Bt</i> var. <i>jinghongiensis</i>	42	IP-T42 001		-	-	HM626362
<i>Bt</i> var. <i>guiyangiensis</i>	43	IP-T43 001		HM626286	GU978986	-
<i>Bt</i> var. <i>higo</i>	44	IP-T44 001		-	-	HM626317
<i>Bt</i> var. <i>roskildiensis</i>	45	IP-T45 001		-	GU978973	-
<i>Bt</i> var. <i>chanpasis</i>	46	IP-T46 001		HM626287	GU978974	-
<i>Bt</i> var. <i>miju</i>	49	IP-T49 001		HM626298	GU978971	-
<i>Bt</i> var. <i>navarrens</i>	50	IP-T50 001		-	-	HM626358
<i>Bt</i> var. <i>kim</i>	52	IP-T52 001		-	-	HM626359
<i>Bt</i> var. <i>asturiensis</i>	53	IP-T53 001		-	-	HM626342
<i>Bt</i> var. <i>poloniensis</i>	54	IP-T54 001		HM626284	GU978975	-
<i>Bt</i> var. <i>palmanyolensis</i>	55	IP-T55 001		-	-	HM626330
<i>Bt</i> var. <i>rongseni</i>	56	IP-T56 001		-	-	HM626347
<i>Bt</i> var. <i>pirenaica</i>	57	IP-T57 001		-	-	HM632034
<i>Bt</i> var. <i>argentinensis</i>	58	IP-T58 001		-	-	HM626306
<i>Bt</i> var. <i>iberica</i>	59	IP-T59 001		-	-	HM626351
<i>Bt</i> var. <i>pingluensis</i>	60	IP-T60 001		HM626296	GU978984	-
<i>Bt</i> var. <i>sylvestriensis</i>	61	IP-T61 001		HM626297	GU978981	-
<i>Bt</i> var. <i>zhaodongensis</i>	62	IP-T62 001		-	-	HM626338
<i>Bt</i> var. <i>azorensis</i>	64	IP-T64 001		-	-	HM626343
<i>Bt</i> var. <i>pulsiensis</i>	65	BGSC 4CC1	ACNJ01000021 ^b	+	+	-
<i>Bt</i> var. <i>vazensis</i>	67	IP-T67 001		HM626285	GU978988	-
<i>Bt</i> subsp. <i>wuhanensis</i>	UN ^a	BGSC 4T		-	-	HM626341
<i>Ba</i>		Ames Ancestor	AE017334 ^a	+	+	-
<i>Ba</i>		Ames	AE016879 ^a	+	+	-
<i>Ba</i>		Sterne	AE017225 ^a	+	+	-
<i>Ba</i>		A0248	CP001598 ^a	+	+	-
<i>Ba</i>		CDC 684	CP001215 ^a	+	+	-
<i>Bc</i>		ATCC 14579	AE016877 ^a	-	-	+
<i>Bc</i>		ATCC 10987	AE017194 ^a	-	± ^c	-
<i>Bc</i>		E33L	CP000001 ^a	+	+	-
<i>Bc</i>		BGSC 6A18		HM626283	GU978977	-
<i>Bc</i>		AH187	CP001177 ^a	+	+	-
<i>Bc</i>		AH820	CP001283 ^a	+	+	-
<i>Bc</i>		03BB102	CP001407 ^a	+	+	-
<i>Bc</i>		B4264	CP001176 ^a	-	-	+
<i>Bc</i>		G9842	CP001186 ^a	-	-	+
<i>Bc</i>		Q1	CP000227 ^a	+	+	-
<i>Bm</i>		BGSC 6A14		HM626291	HM626302	-
<i>Bm</i>		BGSC 6A20		HM626282	GU978995	-
<i>Bm</i>		BGSC 6A68		HM626292	HM626303	-

Table 1 continued

<i>Bpm</i>		DSM12442 ^T		-	-	-
<i>Bpm</i>		DSM12443		-	-	-
<i>Bw</i>		WSBC 10001		HM626294	GU978983	-
<i>Bw</i>		WSBC 10045		HM626277	GU978990	-
<i>Bw</i>		WSBC 10067		HM626280	GU978978	-
<i>Bw</i>		WSBC 10090		HM626279	GU978991	-
<i>Bw</i>		WSBC 10204		HM626293	GU978993	-
<i>Bw</i>		WSBC 10295		-	-	HM626307
<i>Bw</i>		WSBC 10296		HM626278	GU978994	-
<i>Bw</i>		WSBC 10363		-	-	HM626354
<i>Bw</i>		WSBC 10364		-	-	HM626308
<i>Bw</i>		WSBC 10365		-	-	HM626309
<i>Bw</i>		CCM 4965		HM626295	GU978972	-
<i>Bw</i>		CCM 4966		HM626281	GU978987	-
<i>Bw</i>		KBAB4	CP000903 ^a	-	-	+

UN Unserotypable, *IP* International Entomopathogenic *Bacillus* Center, Institut Pasteur, Paris, France; *BGSC*, *Bacillus* Genetic Stock Center, The Ohio State University, Columbus, OH, USA; *ATCC*, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA; *WSBC*, *B. weihenstephanensis* genomic DNA was kindly provided by the Microbial Ecology Group, Technical University of Munich, Freising, Germany; *CCM*, Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University Brno, Brno, Czech Republic. *DSMZ*, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany; ^a Entire genome

^b Contig: contiguous sequences

^c DNA sequences retrieved directly from GenBank

^d Presence (+) or absence (-) of *sap* and *eag* S-layer genes and *lytB/lytA* tandem

^e A truncated version (±) of the gene is present

Bt: *B. thuringiensis*; *Ba*: *B. anthracis*; *Bc*: *B. cereus*; *Bm*: *B. mycoides*; *Bpm*: *B. pseudomycooides*; *Bw*: *B. weihenstephanensis*

Figure 1

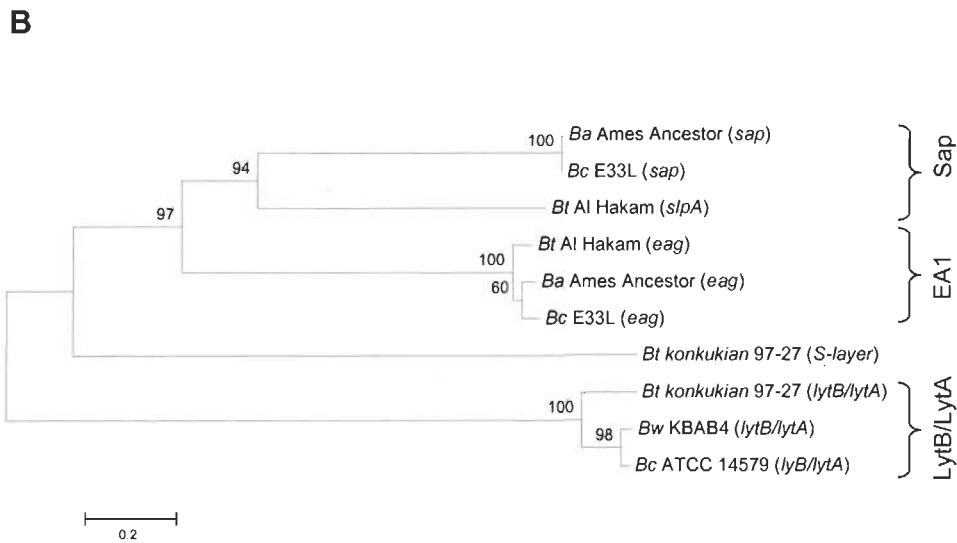
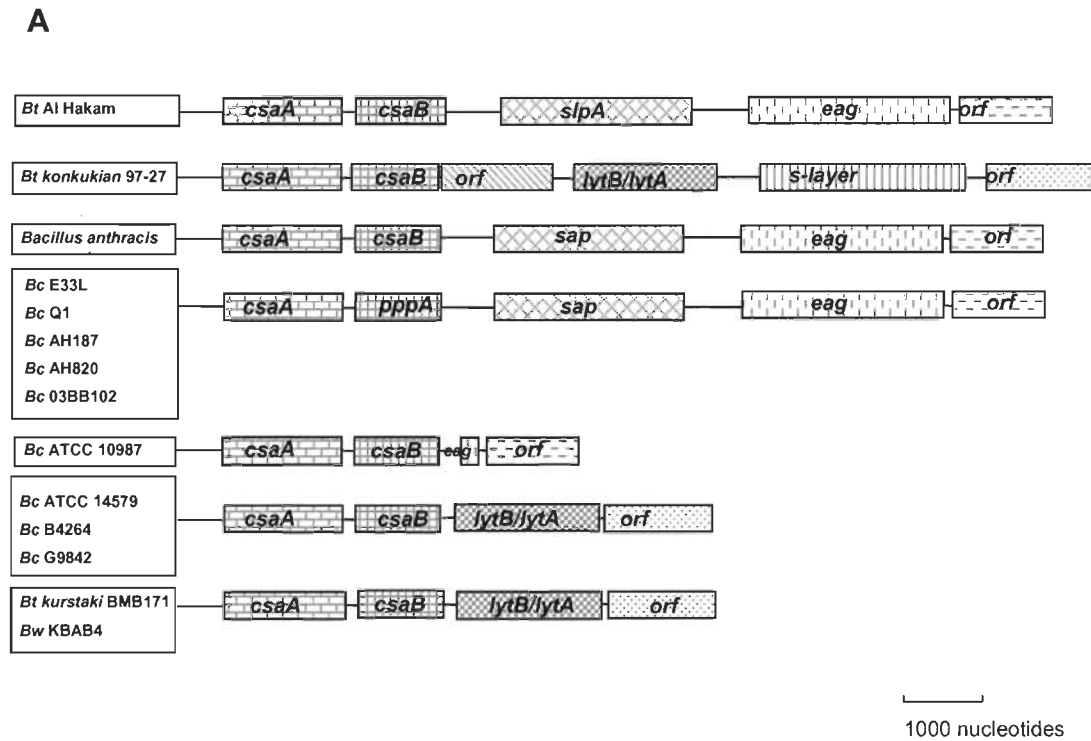
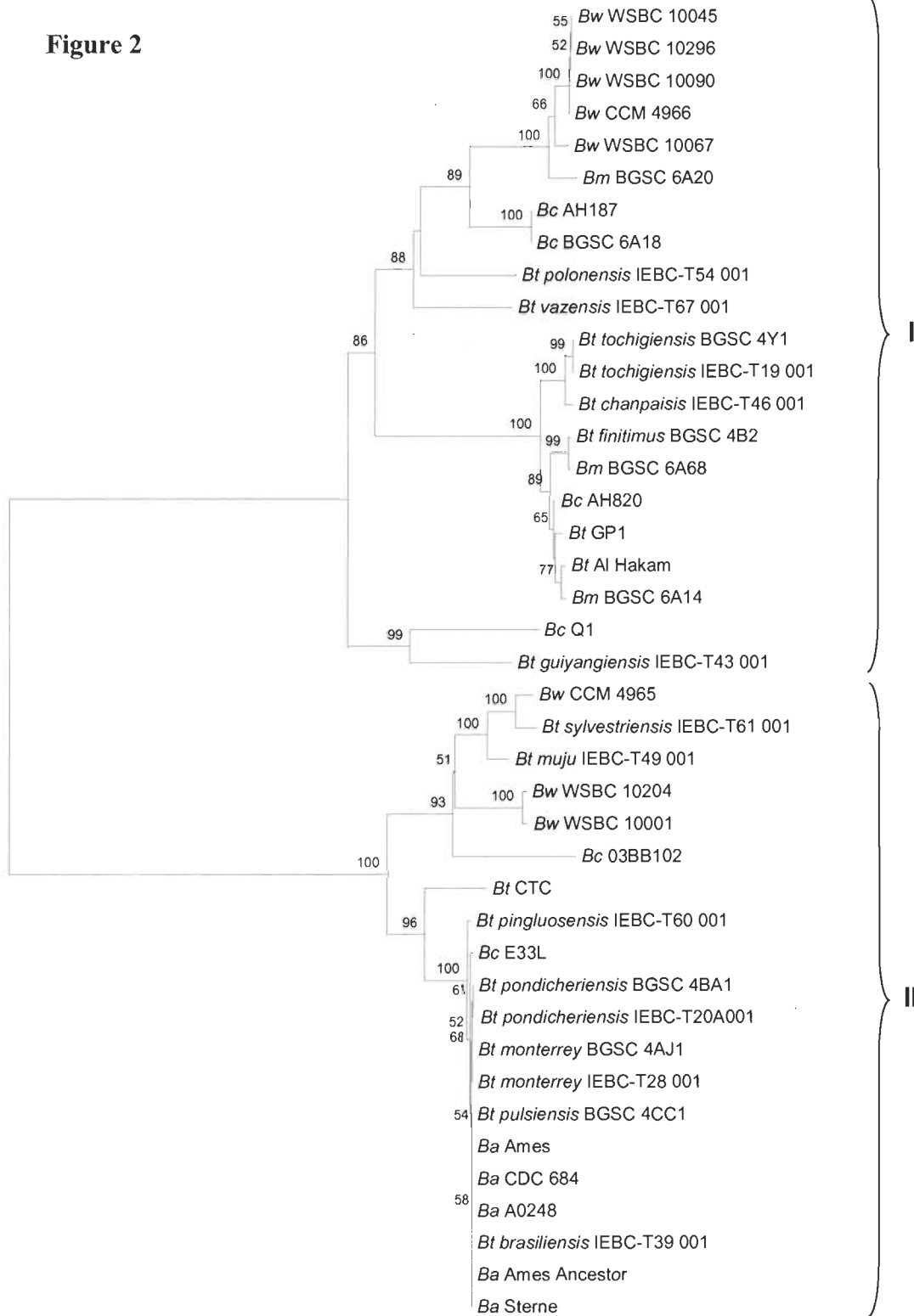


Figure 2



0.1

Figure 3

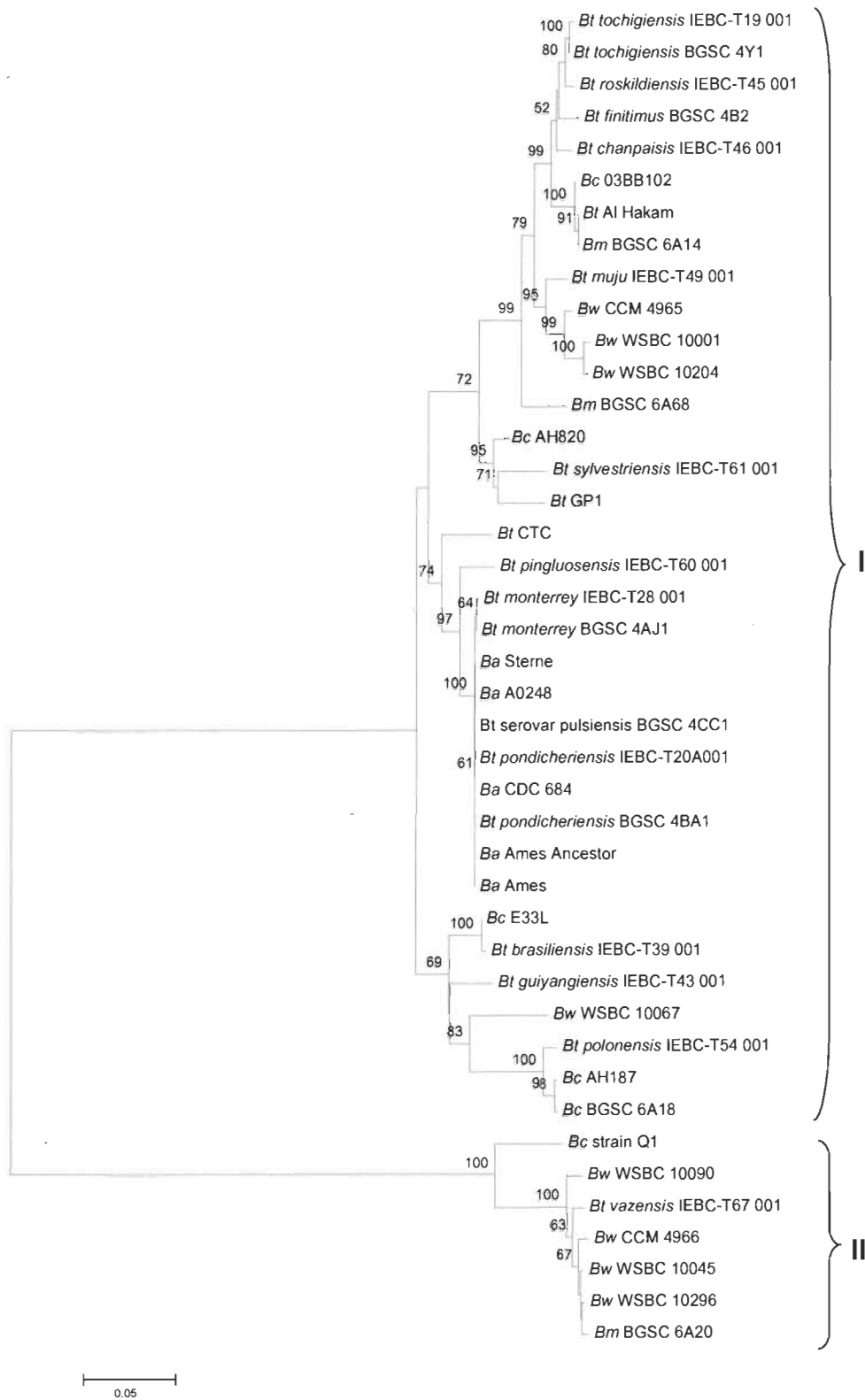
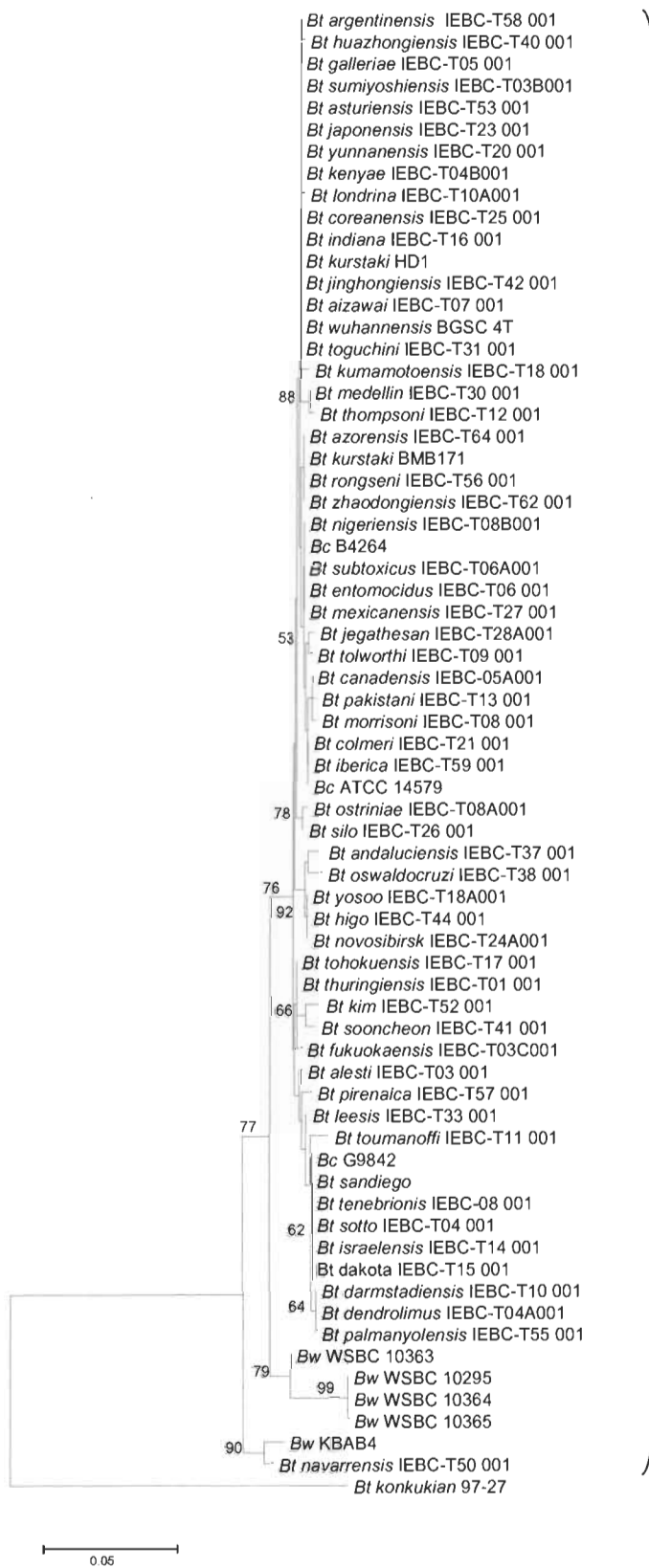


Figure 4



CHAPITRE VII

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

Le groupe *B. cereus* regroupe sept espèces génétiquement très proches; *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* et *B. weihenstephanensis*. La classification de ces espèces est basée sur des critères phénotypiques et physiologiques comme la virulence, la présence de l'inclusion parasporale, la forme des colonies, la thermotolérance et la psychrotolérance (Guinebretière et Sanchis, 2003; Helgason *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2004; Priest *et al.*, 2004).

L'espèce *B. thuringiensis*, laquelle est mésophile, est caractérisée par la formation d'une inclusion parasporale au moment de la sporulation. L'espèce *B. weihenstephanensis*, laquelle est psychrotolérante, est caractérisée par la présence de séquences signatures spécifiques dans les gènes ARNr 16S et *cspA* (Lechner *et al.*, 1998). Lors de deux études distinctes, les analyses phylogénétiques des gènes ARNr 16S, *gyrB*, *aroE* et *panC* ont placé *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* avec l'espèce *B. weihenstephanensis* tout en les distinguant des autres souches de *B. thuringiensis* (Guinebretière *et al.*, 2008; Soufiane et Côté, 2009).

D'autre part, les inclusions parasporales chez *B. thuringiensis* sont généralement composées de protéines Cry. Cependant, deux études distinctes révèlent que les protéines de la couche S, Sap et EA1, forment des inclusions parasporales chez les souches *B. thuringiensis* CTC et GP1 respectivement.

L'objectif principal de la présente thèse est scindé en deux volets majeurs. Le premier volet consistait à étudier les caractéristiques typiques de *B. weihenstephanensis* chez *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* ainsi que chez les autres espèces du groupe *B. cereus*. Ce volet a permis de développer un outil moléculaire

rapide et fiable pour distinguer les souches psychrotolérantes des souches mésophiles au sein du groupe *B. cereus*. Le deuxième volet consiste à étudier la distribution des gènes de la couche S, *sap* (codant pour Sap) et *eag* (codant pour EA1) chez les souches de *B. thuringiensis* et d'autres souches du groupe *B. cereus*. L'implication des protéines Sap et EA1 dans la formation des inclusions parasporales ainsi que leur relation avec la psychrotolérance vont être abordées dans ce volet.

2.1 Caractéristiques de *B. weihenstephanensis* chez *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis*

Les analyses microscopiques ont confirmé la présence d'inclusions parasporales chez *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis*. Ces trois souches de *B. thuringiensis* ont été cultivées à 7 °C et à 43 °C. Ensuite, les gènes ARNr 16S et *cspA* ont été amplifiés, clonés et séquencés. Les résultats obtenus montrent que *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* sont capables à croître à 7 °C mais non à 43 °C. De plus, elles partagent les mêmes séquences signatures que *B. weihenstephanensis* au niveau des gènes ARNr 16S et *cspA*. Donc, *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* sont des souches psychrotolérantes et possèdent les caractéristiques typiques de *B. weihenstephanensis* (Lechner *et al.*, 1998). En faisant abstraction de l'inclusion parasporale, ces trois souches de *B. thuringiensis* devraient être classées comme *B. weihenstephanensis*.

Dans la nature, la distribution géographique des souches mésophiles et des souches psychrotolérantes est fortement liée aux conditions climatiques et aux fortes variations de température (Bartoszewicz *et al.*, 2009; von Stetten *et al.*, 1999). La capacité des microorganismes à croître à basse température n'est pas exclusive aux procaryotes. Une grande variété de microorganismes incluant les archées, les levures, les champignons et les algues sont capables de coloniser les environnements froids. Ces microorganismes peuvent se retrouver à l'état libre dans le sol et dans l'eau ou associés aux plantes et aux animaux comme les poissons et les crustacés (Groudieva *et al.*, 2003). Les informations disponibles sur la provenance des souches psychrotolérantes identifiées dans ce projet

montrent qu'elles ont été isolées dans des régions où les conditions climatiques sont difficiles. En effet, la souche *B. thuringiensis* sérovar *navarrensis* a été isolée dans la province de Navarre, au nord de l'Espagne (Iriarte *et al.*, 2000). La souche de *B. thuringiensis* sérovar *bolivia* a été isolée dans une vallée à 3400 m d'altitude en Bolivie (Ferrandis *et al.*, 1999). La souche de *B. thuringiensis* sérovar *vazensis* a été isolée d'un vignoble à 20 m d'altitude dans les Açores au Portugal (communication personnelle de Santiago-Alvarez). Dans une autre étude, Bartoszewicz *et al.*, (2009) ont montré que plusieurs isolats de *B. thuringiensis* qui provenaient du sol et du lait, possèdent les propriétés psychrotrophiques et génétiques typiques de *B. weihenstephanensis*. Ces souches psychrotolérantes ont été isolées dans le nord-est de la Pologne où la température annuelle moyenne n'excède pas 7 °C à 8 °C (Bartoszewicz *et al.*, 2009).

L'identification de *B. thuringiensis* est basée essentiellement sur la présence de l'inclusion parasporale. Or, on sait que les gènes *cry* chez *B. thuringiensis* sont généralement localisés au niveau des plasmides et par conséquent, ils peuvent être perdus ou acquis. Une souche de *B. thuringiensis* qui a perdu ses plasmides perd sa capacité de produire une inclusion parasporale. Par conséquent, elle sera identifiée comme *B. cereus*. De la même façon, une souche de *B. cereus* qui a gagné un plasmide contenant le gène *cry*, pourrait produire une inclusion parasporale et par conséquent, elle sera identifiée comme *B. thuringiensis* (González *et al.*, 1981, 1982). De telles transformations n'ont pas été étudiées chez *B. weihenstephanensis*, mais il est fort possible que cette transformation se soit produite chez des souches ancestrales de *B. weihenstephanensis*, donnant naissance à *B. thuringiensis* sérovares *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis*.

La classification des souches de *B. thuringiensis* est basée sur la sérotypie, laquelle est la réaction immunologique à l'antigène flagellaire H. Cependant, plusieurs souches de *B. cereus* possèdent des antigènes qui réagissent avec les anticorps spécifiques pour des H-sérotypes de *B. thuringiensis* (de Barjac et Bonnefoi, 1973; Ohba et Aizawa, 1986). Deux hypothèses ont été émises pour expliquer cette situation. La première

hypothèse suppose que des souches de *B. cereus* pourraient provenir de souches de *B. thuringiensis* qui auraient perdu leur plasmide qui contient le gène du cristal. La deuxième hypothèse suppose qu'il est possible que les souches de *B. cereus* et *B. thuringiensis* puissent avoir les mêmes antigènes (Shisa *et al.*, 2002). La ressemblance des caractères phénotypiques et physiologiques entre *B. cereus* et *B. thuringiensis* appuie la dernière hypothèse (Ash *et al.*, 1991). Dans une autre étude sur le gène de flagelle (*hag*) qui est impliqué dans la sérotypie, les souches de *B. weihenstephanensis* possédaient le gène *hag* (Xu et Côté, 2006). Par conséquent, elles sont sérotypables. Ceci pourrait expliquer les sérotypes de *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis*.

Il est possible de trouver d'autres souches de *B. thuringiensis* qui possèdent les caractéristiques de *B. weihenstephanensis*. Dans notre étude, nous avons identifié trois sérovars de *B. thuringiensis* *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis*, qui possèdent les mêmes caractéristiques que *B. weihenstephanensis*.

2.2 Analyses par MLSA de *B. weihenstephanensis* et *B. thuringiensis*

Les souches de *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* ont été identifiées initialement comme *B. thuringiensis* parce qu'elles possèdent des inclusions parasporales qui constituent le critère principal d'appartenance à l'espèce *B. thuringiensis*. L'espèce *B. weihenstephanensis* est caractérisée par la capacité à croître à 7 °C et non à 43 °C et la présence de deux séquences signatures au niveau des gènes ARNr 16S et *cspA*. En se basant uniquement sur les caractéristiques de *B. weihenstephanensis*, *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* devront être considérées comme *B. weihenstephanensis*. Donc, les critères d'identification des deux espèces n'ont pas été clairement définis.

Pour étudier la relation génétique entre les espèces du groupe *Bacillus cereus*, plusieurs méthodes phénotypiques et génotypiques ont été utilisées. Parmi lesquelles, nous pouvons citer les profils biochimiques, la composition cellulaire en acide gras, la

sensibilité aux bactériophages, l'utilisation de sonde moléculaire basée sur la région variable du gène ARNr 16S et plusieurs techniques moléculaires comme l'électrophorèse des allozymes (MLEE) et le typage par séquençage multilocus (MLST). Cette dernière a classifié les espèces du groupe *B. cereus* en trois groupes. Le groupe I contient les souches de *B. anthracis*, certaines souches de *B. cereus* et *B. thuringiensis*. Le groupe II contient les autres souches de *B. cereus* et *B. thuringiensis*. Le groupe III contient les souches de *B. weihenstephanensis* et *B. mycoides*. Il devient clair que les souches des espèces *B. thuringiensis* et *B. weihenstephanensis* sont suffisamment distinctes génétiquement pour se retrouver dans des groupes différents (Priest *et al.*, 2004). Le comité pour la réévaluation de la définition d'espèce en bactériologie a proposé qu'un minimum de cinq gènes de ménage doivent être séquencés pour réaliser des analyses phylogénétiques (Stackebrandt *et al.*, 2002). La méthode d'analyse par séquençage multilocus (MLSA) constitue la nouvelle norme dans la systématique moléculaire microbienne. Grâce à son pouvoir de résolution important, cette méthode est très utilisée dans les études taxinomiques. Elle est basée essentiellement sur l'analyse des séquences concaténées de gènes de ménage.

Pour élucider la relation entre *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* avec *B. weihenstephanensis*, nous avons procédé à l'analyse par MLSA des séquences nucléotidiques de sept gènes de ménage, *glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *purH*, *pycA* et *tpi* chez 36 souches du groupe *B. cereus*. Cela comprend 25 souches de *B. thuringiensis* y compris *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis*, sept souches de *B. weihenstephanensis* et une souche pour chacune des espèces de *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides* et *B. pseudomycoides*. Les analyses des séquences de chaque gène de ménage ainsi que les séquences concaténées de l'ensemble des gènes indiquent la présence de trois groupes bien distincts. Le groupe I comprend les souches mésophiles de *B. thuringiensis*, *B. cereus* et *B. anthracis*. Le groupe II est composé des souches de *B. weihenstephanensis* et de *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis*. Le groupe III est formé de souches de *B. pseudomycoides* et *B. mycoides*. Il devient clair que l'homologie entre *B. weihenstephanensis* et les trois souches de *B. thuringiensis*, n'est pas limitée aux gènes ARNr 16S et *cspA*, mais elle touche également les gènes

glpF, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *purH*, *pycA* et *tpi*. De plus, nous avons identifié sur les sept gènes de ménage des nouvelles séquences signatures et des substitutions nucléotidiques (SNPs) spécifiques à *B. weihenstephanensis*. Les trois souches de *B. thuringiensis* possèdent les séquences signatures et “SNPs” des souches psychrotolérantes de *B. weihenstephanensis* alors que les autres souches de *B. thuringiensis* possèdent les séquences signatures et “SNPs” des mésophiles.

La diversité génétique du groupe de *B. cereus* varie en fonction de la source de l'échantillon (Helgason *et al.*, 2000). Cette diversité est très élevée chez les isolats naturels qui proviennent du sol (Helgason *et al.*, 1998). Des études précédentes avaient montré que la structure de la population du groupe de *B. cereus* pourrait être clonale ou le résultat d'importantes recombinaisons entre les souches (Ankarloo *et al.*, 2000; Helgason *et al.*, 2000). Dans la structure d'une population clonale, les souches sont génétiquement très proches et sont toujours groupées ensemble. Les diversités observées dans cette population proviennent uniquement de mutations. La structure clonale est observée principalement chez *B. anthracis*, qui est l'espèce la plus homogène connue (Harrell *et al.*, 1995; Keim *et al.*, 2000; Read *et al.*, 2002). Ce genre de structure est également détecté chez les souches émétiques ainsi que chez les souches de *B. thuringiensis* sérovar *israelensis* (Ankarloo *et al.*, 2000; Ehling-Schulz *et al.*, 2005; Priest *et al.*, 2004). La recombinaison génétique constitue un phénomène naturel qui assure le brassage génétique et le maintien de la diversité génétique dans une population.

Les analyses des séquences concaténées et des séquences de chaque gène de ménage indiquent que la structure du groupe *B. cereus* est largement clonale avec quelques recombinaisons. Également, la distribution aléatoire des sept gènes de ménage sur le chromosome rend très peu probable un transfert horizontal de chacun des gènes entre les trois sérovares de *B. thuringiensis*, *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* et *B. weihenstephanensis*. Cependant, il est possible que les trois sérovares de *B. thuringiensis* aient reçu au cours de leur évolution des plasmides contenant les gènes *cry*, ce qui pourrait expliquer leur classification initiale comme *B. thuringiensis*. Comme le plasmide est instable par rapport au chromosome, il devient important de tenir compte principalement des résultats d'analyses des sept gènes de ménage lesquels

suggèrent la reclassification des trois souches de *B. thuringiensis* dans l'espèce *B. weihenstephanensis*.

2.3 Caractéristiques de *B. weihenstephanensis* chez les autres espèces du groupe *B. cereus*

La présence de trois sérovars psychrotolérants chez *B. thuringiensis*, nous laisse penser qu'il est possible de trouver des souches psychrotolérantes chez les autres espèces du groupe de *B. cereus*. Pour vérifier cela, nous avons analysé par MLSA les séquences de six gènes; ARNr 16S, *cspA*, *glpF*, *gmk*, *purH* et *tpi* chez 73 souches du groupe *B. cereus*. Cela comprend 23 souches de *B. cereus*, 12 souches de *B. anthracis*, 14 souches de *B. mycoides*, 10 souches de *B. thuringiensis*, deux souches de *B. pseudomycoides*, une souche de *B. cytotoxicus* et 11 souches de *B. weihenstephanensis*. Les analyses phylogénétiques ont révélé la présence de 3 groupes. Le groupe I contient toutes les souches de *B. anthracis*, la majorité des souches de *B. cereus* et quelques souches de *B. mycoides*. Le groupe II contient toutes les souches de *B. weihenstephanensis*, cinq souches de *B. cereus* et sept souches de *B. mycoides*. Le groupe III contient des souches de *B. mycoides* et des souches de *B. pseudomycoides*. Les souches disponibles ont été inoculées dans un milieu liquide et incubées à 7 °C et à 43 °C. Les résultats de croissance à 7 °C et à 43 °C ainsi que les séquences signatures identifiées au niveau des gènes ARNr 16S, *cspA*, *glpF*, *gmk*, *purH* et *tpi* ont confirmé que les cinq souches de *B. cereus* et les sept souches de *B. mycoides* dans le groupe II sont des souches psychrotolérantes. Les groupes I et III contiennent uniquement les souches mésophiles. La souche thermotolérante *B. cytotoxicus* forme une branche distincte et bien séparée des autres groupes.

Des études précédentes ont révélé la présence de souches psychrotolérantes chez *B. cereus*. En effet, dans les années 1990, plusieurs souches psychrotolérantes de *B. cereus* ont été isolées (Dufrenne *et al.*, 1995; Larsen et Jørgensen, 1997; Meer *et al.*, 1991; Stenfors et Granum, 2001; van Netten *et al.*, 1990). Cependant, certaines de ces souches psychrotolérantes ne possèdent pas les caractéristiques de

B. weihenstephanensis (Stenfors et Granum, 2001). D'autres souches psychrotolérantes de *B. cereus* qui possèdent les caractéristiques de *B. weihenstephanensis* ont été classées comme *B. weihenstephanensis* (Lechner *et al.*, 1998). Les souches psychrotolérantes de *B. cereus* identifiées dans notre étude proviennent de la Norvège où les conditions climatiques sont rudes (Helgason *et al.*, 1998). Les régions nordiques de ce pays connaissent un climat subarctique. D'après les résultats de notre étude, les cinq souches psychrotolérantes de *B. cereus* possèdent les caractéristiques physiologiques et génétiques de *B. weihenstephanensis* et par conséquent, elles doivent être reclassifiées comme *B. weihenstephanensis*.

D'après nos résultats, les souches psychrotolérantes de *B. mycoides* du groupe II possèdent les caractéristiques physiologiques et génétiques typiques de *B. weihenstephanensis* et par conséquent, elles doivent être reclassifiées comme *B. weihenstephanensis*. Les souches mésophiles de *B. mycoides* du groupe III sont génétiquement très proches de *B. pseudomycoides* suggérant leur regroupement dans une seule espèce, *B. pseudomycoides*. Le regroupement de *B. mycoides* avec *B. weihenstephanensis* soulève des interrogations sur la mobilité des gènes responsables de la forme rhizoïde ou mycoïde des colonies de *B. mycoides*. Di Franco *et al.*, (2002) avaient rapporté l'existence de deux morphotypes rhizoïdes chez *B. mycoides* dont les filaments sont orientés dans le sens des aiguilles d'une montre (dextrale) ou inversement (sinistrale). Une température à 38 °C inhibe la croissance de la forme dextrale, mais elle n'affecte pas la forme sinistrale qui continue sa croissance (Di Franco *et al.*, 2002). Des mutants de *B. mycoides* dépourvus de plasmide maintiennent la même morphologie que la souche sauvage. Donc, les gènes responsables de la forme des colonies ne sont pas plasmidiques.

Les résultats obtenus pendant ce projet confirment que la relation génétique entre les espèces du groupe *B. cereus* est trop complexe pour se baser uniquement sur les caractères phénotypiques lors de la classification (Rasko *et al.*, 2005). Des études phylogénétiques ont montré que les populations du groupe de *B. cereus* étaient souvent divisées en deux groupes majeurs, qui pourraient être subdivisés en sous-groupe en

fonction de la méthode utilisée (Helgason *et al.*, 1998, 2000, 2004; Keim *et al.*, 1997; Ko *et al.*, 2004; Priest *et al.*, 2004; Ticknor *et al.*, 2001). Plusieurs propositions touchant la classification des espèces du groupe de *B. cereus* ont été formulées. Certaines études ont montré que *B. cereus*, *B. thuringiensis* et *B. anthracis* sont très proches génétiquement. Par conséquent, certains chercheurs ont proposé de les regrouper dans une seule espèce (Bavykin *et al.*, 2004; Daffonchio *et al.*, 1998; Helgason *et al.*, 2000).

Dans le groupe *B. cereus*, les caractéristiques phénotypiques de *B. anthracis*, *B. thuringiensis* et *B. cereus* sont souvent liées à des éléments génétiques mobiles. L'hypothèse généralement admise est que ces trois espèces pourront être considérées comme des "pathotypes" qui proviennent d'un ancêtre commun. Leur diversification aurait eu lieu après des réarrangements génétiques et génomiques divers impliquant l'ADN mobile comme les transposons, les séquences d'insertion, les phages ou les plasmides lors des mécanismes de transfert horizontaux (la conjugaison, la transduction ou la transformation). Ceci est illustré par le fait que les plasmides contenant des facteurs de virulence peuvent être potentiellement échangés dans le groupe *B. cereus* (Reddy *et al.*, 1987). La virulence de *B. anthracis* provient de ses deux mégaplasmides pXO1 et pXO2 (Bhatnagar et Batra, 2001; Mock et Fouet, 2001). Les protéines insecticides formant le cristal chez *B. thuringiensis* sont codées par des gènes *cry* qui sont localisées au niveau du plasmide (Battisti *et al.*, 1985; Hu *et al.*, 2005). Les toxines émétiques (cereulides) chez les souches pathogènes de *B. cereus* sont codées par des gènes localisés au niveau du plasmide pCERE01, ressemblant au plasmide pXO1 de *B. anthracis* (Hoton *et al.*, 2005; Rasko *et al.*, 2007). Lors de la conjugaison bactérienne, les bactéries à Gram positif adoptent plusieurs stratégies de transfert de plasmide comme des mécanismes d'agrégation au niveau de la surface et une communication intercellulaire via des phéromones. (Andrup *et al.*, 1996; Andrup, 1998; Clewell et Francia, 2004; Dunny, 2007; Godon *et al.* 1994; Stentz *et al.* 2006). Plusieurs études ont confirmé l'existence de transferts de matériels génétiques chez *B. cereus* et *B. thuringiensis* (Gonzales *et al.*, 1982; Sabelnikov et Ulyashova, 1990; Wilcks *et al.*, 1998). Cependant, aucune étude n'a mentionné la possibilité d'un transfert des gènes responsables des formes mycoïdes ou rhizoïdes entre les espèces du groupe *B. cereus*.

De plus, les souches de *B. mycoides* peuvent perdre la capacité de former des colonies rhizoïdes (Logan et De Vos, 2009). Par conséquent, le critère d'identification de l'espèce *B. mycoides* n'est pas très stable.

D'autres chercheurs ont suggéré de classer les espèces du groupe de *B. cereus* dans sept groupes phylogénétiques distincts où le facteur écologique joue un rôle déterminant (Guinebretière *et al.*, 2008). D'après leurs analyses, le groupe I contient les souches de *B. pseudomycoides*, dont la température de croissance est comprise entre 10 °C et 43 °C. Le groupe II est composé de souches psychrotolérantes de *B. cereus* et *B. thuringiensis* dont la température de croissance est comprise entre 7 °C et 40 °C. Les souches de ce groupe ne contiennent pas la séquence signature associée à la psychrotolérance sur le gène *cspA* (Francis *et al.*, 1998). Les groupes III, IV et V regroupent *B. anthracis* et toutes les souches mésophiles de *B. cereus* et *B. thuringiensis* dont la température de croissance est comprise entre 10 °C et 45 °C. Le groupe VI contient les souches psychrotolérantes de *B. weihentephanensis*, *B. mycoides* et *B. thuringiensis* qui sont capables à croître à 5 °C, mais elles sont incapables à croître au-delà de 37 °C. Les souches de ce groupe possèdent la séquence signature liée à la psychrotolérance sur le gène *cspA* (Guinebretière *et al.*, 2008). Le groupe VII regroupe les souches thermotolérantes dont la température de croissance varie entre 20 °C et 50 °C représentés par l'espèce *B. cytotoxicus* (Auger *et al.*, 2008). Les auteurs de cette étude suggèrent que l'ancêtre du groupe de *B. cereus* était thermophile et qu'il a évolué vers la psychrophilie, permettant ainsi une adaptation à de nouvelles niches écologiques.

Le pouvoir de contaminer et de se développer dans les produits alimentaires n'est pas limité aux souches mésophiles de *B. cereus*. Plusieurs études ont rapporté l'implication des souches psychrotolérantes de *B. cereus* dans la contamination de plusieurs produits alimentaires en particulier les produits laitiers (Huck *et al.* 2007; Larsen et Jørgensen, 1997; Meer *et al.*, 1991). La pathogénicité de *B. cereus* réside dans sa capacité de produire des entérotoxines et des cereulides entraînant la diarrhée et des vomissements. Certaines souches identifiées comme *B. thuringiensis* possèdent des gènes d'entérotoxines similaires à ceux de *B. cereus* (Rivera *et al.*, 2000). Une étude a

montré que les cereulides sont produites uniquement par les souches mésophiles de *B. cereus* et dont les gènes responsables sont localisés au niveau du plasmide pBCE4810 (Ehling-Schulz *et al.*, 2006). Or, d'autres études ont montré que les souches psychrotolérantes sont capables de produire des entérotoxines et des cereulides comme les souches mésophiles de *B. cereus* (Altayar et Sutherland, 2006; Stenfors *et al.*, 2002; Stenfors *et al.*, 2007; Thorsen *et al.*, 2006). Selon Guinebretière *et al.*, (2008), le risque pour la santé des souches psychrotolérantes dépend de leur affiliation génétique au groupe II ou au groupe VI. Les intoxications alimentaires sont souvent provoquées par les souches du groupe II alors que les souches du groupe VI sont peu ou pas cytotoxiques (Francis *et al.*, 1998).

L'espèce *B. weihenstephanensis* regroupe la majorité des souches psychrotolérantes du groupe *B. cereus* qui sont dispersées dans la nature et pourraient contaminer les matières premières et les endroits de stockage réfrigérés de plusieurs industries alimentaires. Les spores des souches psychrotolérantes sont résistantes à la chaleur ce qui va leur permettre de survivre à la pasteurisation et à d'autres traitements. Ces bactéries continuent de se multiplier pendant la période de stockage à basse température (Guinebretière *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 1984). Ceci soulève plusieurs questions sur le risque potentiel pour la santé publique de ces souches psychrotolérantes lorsqu'elles sont présentes dans les produits réfrigérés.

Dans une étude récente, il a été démontré qu'à 37 °C, les souches psychrotolérantes de *B. weihenstephanensis* sont moins virulentes contre l'insecte *Galleria mellonella* et entraîne une faible cytotoxicité dans la lignée cellulaire Vero en comparaison avec les souches mésophiles de *B. cereus*. Cependant, à 15 °C les souches psychrotolérantes de *B. weihenstephanensis* deviennent aussi virulentes et cytotoxiques que les souches pathogènes de *B. cereus*. Ceci suggère que la virulence chez *B. weihenstephanensis* est contrôlée par la température. Les facteurs liés à la virulence deviennent instables à une température élevée, ce qui entraîne une faible toxicité. Le rôle de la température dans la virulence des souches psychrotolérantes constitue un danger réel pour la santé publique. Il devient alors urgent de comprendre les facteurs impliqués

dans la virulence des souches psychrotolérantes à basse température (Réjasse *et al.*, 2012).

Les microorganismes adaptés au froid se divisent en deux groupes; les psychrophiles et les psychrotolérants. Le terme psychrophile fut utilisé pour la première fois par Schmidt-Nielsen en 1902 pour désigner les microorganismes qui colonisent les environnements naturels froids de façon permanente. Les microorganismes psychrotolérants appelés également psychrotrophes coexistent avec les mésophiles dans différents habitats. Le terme psychrotrophe est utilisé dans l'industrie alimentaire alors que le terme psychrotolérant est utilisé en écologie.

En analysant les séquences concaténées des gènes *cspA*, *glpF*, *gmk*, *purH* et *tpi*, nous avons noté plusieurs substitutions nucléotidiques entre les souches mésophiles et les souches psychrotolérantes. La majorité de ces mutations (72 %) sont qualifiées de synonymes parce qu'elles n'engendrent pas de changement au niveau des séquences en acides aminés. Les autres mutations (28 %), qualifiées de non synonymes avaient entraîné des changements au niveau de 10 acides aminés aussi bien chez *B. cereus* que chez *B. mycooides*. Il semble que ces changements au niveau des acides aminés font partie des mesures adaptatives des bactéries face à un environnement froid. En effet, les mécanismes d'adaptation des souches psychrotolérantes consistent à déclencher une modification drastique des paramètres thermodynamiques au sein de la cellule (Bjelic *et al.*, 2008; Georlette *et al.*, 2004). Pour faire face au froid, la bactérie adopte des mesures qui lui permettent de survivre et se développer. Parmi ces mesures, il y a l'accumulation d'acides gras insaturés au niveau de la membrane qui va entraîner un abaissement du point de fusion de la membrane lui permettant ainsi de retrouver sa fluidité. Il y a également un changement dans l'enroulement de l'ADN entraînant la formation de molécule d'ADN beaucoup plus compacte (Eriksson *et al.*, 2002). Il est possible que la topologie de l'ADN joue un rôle dans la perception de la baisse de température permettant une induction de l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress dû au froid ou une inhibition de l'expression d'autres gènes (Prakash *et al.*, 2009). Aussi, on assiste à un arrêt partiel ou total de la synthèse de protéines de ménage au

profit de la synthèse de protéines impliquées dans l'adaptation de toute la machinerie cellulaire et dans la protection de la cellule face au froid (Hebraud et Potier, 1999; Phadtare, 2004; Thieringer *et al.*, 1998; Weber et Marahiel, 2002). Pour maintenir des flux métaboliques adéquats, les organismes adaptés au froid réduisent leurs réactions enzymatiques.

Les changements au niveau de la structure primaire des enzymes psychrophiles, en comparaison avec leur homologue mésophiles ou thermophiles, sont mineurs. Cependant, les facteurs impliqués dans la stabilité des protéines ont subi des changements importants (Feller et Gerday, 1997). Les mesures adaptatives des enzymes psychrophiles convergent vers deux objectifs lesquels consistent à améliorer l'efficacité catalytique de l'enzyme et se doter d'une bonne flexibilité conformationnelle. L'environnement physiologique de ces enzymes contrôle l'optimisation des paramètres catalytiques en ajustant les constantes k_{cat} , K_m ou les deux. Au niveau moléculaire, les déterminants de la flexibilité conformationnelle peuvent avoir comme origine une seule mutation ou un ensemble d'interactions sur l'ensemble de la structure. Afin d'augmenter leur flexibilité, les enzymes psychrophiles réduisent ou modifient les facteurs structuraux et les interactions impliquées dans la stabilité. Il est important de noter qu'il n'y a pas de règles générales qui s'appliquent pour toutes les enzymes adaptées au froid. Chaque enzyme adopte sa propre stratégie en procédant à un ou plusieurs changements (Feller et Gerday, 1997).

Les microorganismes psychrophiles et psychrotolérants fournissent des protéines et des enzymes qui sont utilisées dans différentes applications notamment dans l'industrie pharmaceutique, en médecine, en agriculture, en cosmétique, en environnement et dans d'autres domaines (Gounot, 1991). En effet, les enzymes actives à basse température pourraient être ajoutées aux détergents pour des lavages à basse température ou à d'autres solutions de nettoyage. Ces enzymes sont également utilisées dans :

- la fabrication de composés organiques fortement volatils, en travaillant à basse température.

- ÷ la transformation des aliments, ce qui permet de limiter la croissance des contaminants microbiens et d'économiser les dépenses liées à la pasteurisation.
- l'élimination des pectines et d'autres polysaccharides des jus de fruit ou le lactose du lait.
- le remplacement des agents de conservation chimiques dans les produits alimentaires.

La demande croissante de produits surgelés et réfrigérés crée de nouveaux besoins d'enzymes actives à basse température pour la transformation et la conservation des aliments (Brenchley, 1996).

Les hétérogénéités génétiques et phénotypiques des espèces du groupe de *B. cereus* ainsi que la présence de souches mésophiles, psychrotolérantes et thermotolérantes indiquent que des efforts additionnels doivent être déployés pour assurer une bonne classification des souches, sans aucune ambiguïté à l'intérieur du groupe *B. cereus*.

2.4 Développement d'un outil moléculaire pour distinguer les souches psychrotolérantes des mésophiles

Il est très difficile de distinguer les souches mésophiles des souches psychrotolérantes en se basant sur des observations microscopiques des cellules des deux groupes thermiques. La méthode classique consiste à incuber les souches à basse température (7 °C), ce qui pourrait prendre jusqu'à 14 jours pour déterminer si ces souches sont psychrotolérantes ou mésophiles (Meer *et al.*, 1991). Une méthode moléculaire a été développée en se basant sur l'amplification par PCR du gène ARNr 16S (von Stetten *et al.*, 1998). Cette méthode cible particulièrement les séquences signatures spécifiques des mésophiles et des psychrotolérants. Les profils d'amplification du gène ARNr 16S chez ces deux groupes thermiques étaient différents. Cependant, la souche VIR12 de *B. cereus* qui était capable à croître à 4 °C présente le profil de souche psychrotolérante et également le profil de souche mésophile. Ceci a été

expliqué par la coexistence de copie du gène ARNr 16S mésophile et psychrotolérant chez la même souche (von Stetten *et al.*, 1998). Nous avons développé une autre méthode moléculaire plus fiable basée sur la digestion du gène *pycA* avec l'enzyme de restriction PstI. Le gène *pycA* est un gène de ménage qui code pour la pyruvate carboxylase. Cette enzyme joue un rôle important dans le métabolisme du carbone (Schär *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2011). Lors de notre étude précédente (Soufiane *et al.*, 2013), l'alignement des séquences nucléotidiques du gène *pycA* chez les souches de *B. cereus* a révélé plusieurs substitutions nucléotidiques entre les souches mésophiles et les souches de *B. weihenstephanensis*. La substitution nucléotidique à la position 795 (thymine en adénine) a permis la création d'un site de clivage de l'enzyme PstI (⁷⁹¹CTGCAG⁷⁹⁶) chez les souches psychrotolérantes.

Nous avons analysé les séquences du gène *pycA* chez 168 souches représentant les sept espèces formant le groupe de *B. cereus*. Le gène *pycA* a été amplifié par PCR et digéré avec PstI pour les souches disponibles pour culture. Une analyse *in silico* a été effectuée pour les souches qu'on ne pouvait pas cultiver et dont la séquence du gène *pycA* était disponible dans GenBank. Le gène *pycA* chez toutes les souches psychrotolérantes avait un site de restriction de l'enzyme PstI. En effet, deux bandes de 543 bp et 1175 bp étaient visibles sur un gel d'agarose. Chez les souches mésophiles, le gène *pycA* ne pouvait pas être digéré par PstI. Une seule bande de 1718 bp était présente sur le gel d'agarose. Les souches psychrotolérantes identifiées avec cette méthode possèdent les caractéristiques typiques de *B. weihenstephanensis*. Elles sont capables à croître à 7 °C et non à 43 °C et possèdent les séquences signatures spécifiques à *B. weihenstephanensis* au niveau des gènes ARNr 16S et *cspA*. Cette méthode a l'avantage d'être simple, rapide, fiable et accessible à tous les laboratoires de microbiologie. Plusieurs centaines de souches bactériennes pourraient être analysées en quelques heures. Cette méthode pourrait être utile dans l'industrie alimentaire pour détecter les souches psychrotolérantes du groupe *B. cereus* qui sont responsables de la réduction de la durée de conservation des aliments réfrigérés, notamment le lait (Griffiths, 1992; Meer *et al.*, 1991). La température de stockage constitue un des paramètres les plus importants dans le contrôle des activités de microorganismes en

industrie alimentaire (Beales, 2004). Une température basse doit réduire ou arrêter la croissance des microorganismes. La majorité des réfrigérateurs opèrent à 4 °C. À cette température, la croissance de la plupart des microorganismes pathogènes à l'homme tels que *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Staphylococcus aureus* est inhibée (Bryan, 2004). Cependant, la présence des souches psychrotolérantes de *B. cereus* dans les aliments réfrigérés préoccupe énormément l'industrie alimentaire à cause d'un risque d'empoisonnement alimentaire. Ainsi, le développement d'un outil d'identification rapide et fiable des souches psychrotolérantes est d'une grande utilité pour l'industrie alimentaire afin d'assurer un bon contrôle de qualité.

2.5 Distribution des gènes de la couche S, *sap* et *eag* chez *B. thuringiensis*

Les couches S ou couches de surface sont disposées régulièrement sous forme d'un assemblage paracristallin organisé selon un modèle géométrique carré, hexagonal ou oblique. Les couches S sont présentes aussi bien chez les eubactéries que chez les archées. Elles sont constituées de protéines ou de glycoprotéines dont le poids moléculaire se situe entre 40 et 200 kDa. Elles ne peuvent être mises en évidence que par microscopie électronique. Les couches S protègent la cellule contre les fluctuations ioniques, les variations de pH, le stress osmotique, les enzymes ou les bactéries prédatrices. Cette couche contribue à la virulence chez les agents pathogènes. La synthèse des protéines de la couche S est soumise à un contrôle sévère afin d'assurer la couverture totale de la cellule (Mignot *et al.*, 2002; Sleytr et Messner, 1983).

Les protéines de la couche S, Sap et EA1, n'ont pas été étudiées chez *B. thuringiensis*. Cependant, deux études ont montré que les inclusions parasporales de deux souches de *B. thuringiensis* CTC et GP1 sont formées par les protéines Sap et EA1, respectivement (Peña *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2001, Zhu et Yu, 2008). L'objectif de notre étude consiste à déterminer la distribution des gènes de la couche S, *sap* et *eag* chez 80 souches de *B. thuringiensis* et à vérifier s'il y a une corrélation entre la présence des protéines Sap et EA1 et la psychrotolérance. Tout d'abord, nous avons constaté durant cette étude que la nomenclature des gènes de la couche S, *sap* et *eag* chez le groupe

B. cereus n'était pas standardisée dans la banque de données "GenBank". Par conséquent, nous recommandons que ces gènes soient nommés en se basant sur leur homologie. Ensuite, nous avons montré que les gènes *sap* et *eag* sont toujours présents en tandems chez seulement 25 % des 80 souches de *B. thuringiensis* analysées. Ces souches représentent 68 sérovars. Nos résultats sont conformes à ceux de Mignot *et al.*, (2001) lorsqu'ils ont étudié la distribution des protéines de la couche S chez des souches de *B. cereus* originaires du sol et de patients. Les analyses biochimiques et génétiques ont montré que seulement 37 % des souches de *B. cereus* possédaient les protéines de la couche S. Dans une autre étude menée par Guo *et al.*, (2008), les analyses immunologiques ont révélé que seulement 25 % des souches de *B. thuringiensis* réagissaient avec les anticorps spécifiques à Sap. Ces auteurs concluaient que 25 % des souches de *B. thuringiensis* pourraient avoir des inclusions parasporales formées de protéines de la couche S. Cependant, les souches de *B. thuringiensis* qui possèdent les protéines Sap et EA1, ont des inclusions parasporales formées par des protéines Cry. C'est le cas chez *B. thuringiensis* sérovars *finitimus*, *tochigiensis*, *roskildiensis*, *monterrey* et *pulsiensis* qui possèdent des inclusions parasporales formées par les protéines Cry28Aa1, Cry4Aa, Cry21Ba1, Cry7Aa et Cry8Ba, respectivement (Wojciechowska *et al.*, 1999; Sato et Asano, 2004). Par conséquent, il est très possible que l'inclusion parasporale chez la majorité des souches de *B. thuringiensis* qui possèdent les gènes *sap* et *eag*, soit formée de protéine Cry. Des cas particuliers demeurent possibles chez lesquels les inclusions parasporales sont formées de protéines Sap ou EA1 comme, par exemple, chez les souches de *B. thuringiensis* CTC et GPI respectivement.

Nous avons montré également que les gènes *sap* et *eag* sont présents chez toutes les souches de *B. anthracis* et de *B. mycoides* présentes dans cette étude. Certaines souches de *B. cereus* et de *B. weihenstephanensis* possèdent également les gènes *sap* et *eag*. Nous avons remarqué que les deux gènes de la couche S sont toujours présents en tandems, l'un à côté de l'autre au niveau du chromosome. Quand les gènes *sap* et *eag* sont absents, un autre tandem de gènes (*lytB/lytA*), lesquels codent pour des hydrolases de paroi, est présent. Le gène *lytB* code pour l'endo- β -N-Acetylglucosaminidase alors

que *lytA* code pour la N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase. Les hydrolases sont des enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse suivant la réaction générale :



Alors que certaines souches de *B. cereus*, *B. thuringiensis* possèdent les gènes de la couche S, *sap* et *eag*, d'autres souches de ces deux espèces possèdent les gènes d'hydrolase *lytB/lytA* (Figure 7.1). Cette variation dans la composition de la paroi est également présente chez les souches de *B. weihenstephanensis* et les autres souches psychrotolérantes identifiées dans ce projet. Par conséquent, la présence des gènes *sap* et *eag* ou *lytB/lytA* n'est pas influencée par la température de l'environnement. En effet, les gènes *sap* et *eag* peuvent être présents aussi bien chez les souches mésophiles que chez les souches psychrotolérantes. Nous avons constaté que deux gènes qui jouent un rôle dans le métabolisme de la paroi cellulaire, *csaA* et *csaB*, sont présents en amont des gènes *sap* et *eag* et du tandem *lytB/lytA*. Le gène *csaA* code pour une protéine impliquée dans la synthèse des polysaccharides alors que le gène *csaB* code pour une pyruvyltransférase qui catalyse les premières réactions dans la synthèse de péptidoglycane, qui est un composant important de la paroi bactérienne.

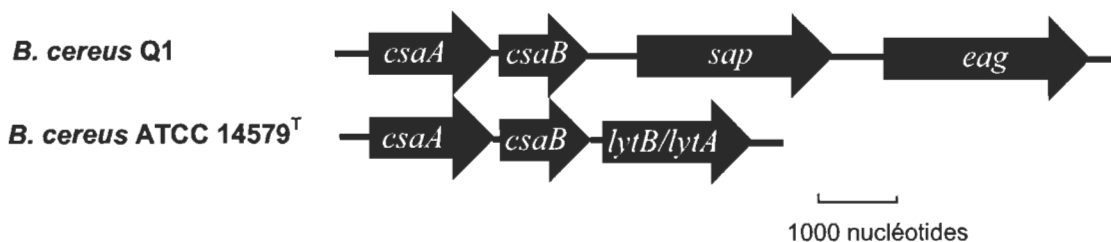


Figure 0.1 La disposition schématique des gènes *csaA* et *csaB* par rapport aux gènes *sap*, *eag* et *lytB/lytA* au niveau du chromosome chez *B. cereus* Q1 et *B. cereus* ATCC 14579 (la souche type).

Le rôle des gènes *csaA* et *csaB* chez les souches du groupe *B. cereus* qui possèdent *lytB/lytA* mais qui sont dépourvues de *sap* et *eag* demeure inconnu. Comme les protéines de la couche S sont synthétisées en abondance, cela nécessite beaucoup d'énergie de la bactérie. Il serait intéressant d'étudier la distribution environnementale ainsi que les

interactions écologiques qui pourront avoir un impact majeur sur l'expression des gènes de la couche S.

2.6 Conclusion

Le groupe *Bacillus cereus sensu lato* comprend sept espèces génétiquement très proches : *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus cytotoxicus* et *Bacillus weihenstephanensis*. Ces espèces sont classées en se basant principalement sur des critères phénotypiques et physiologiques. L'espèce *B. weihenstephanensis* est caractérisée par sa capacité à croître à 7 °C, mais pas à 43 °C et la présence de séquences signature spécifiques sur les gènes ARNr 16S et *cspA*. Les analyses moléculaires appuient la création de l'espèce *B. weihenstephanensis* parce qu'elle est toujours placée dans un groupe bien distinct. Nous avons montré dans ce projet que *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* possèdent les caractéristiques physiologiques et génétiques typiques de *B. weihenstephanensis*. De plus, les analyses par MLSA des séquences de sept gènes de ménage (*glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *purH*, *pycA* et *tpi*) montrent que *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* sont toujours distants des autres souches de *B. thuringiensis* et groupées avec *B. weihenstephanensis*. Aussi, les analyses des séquences des gènes de ménage nous ont permis d'identifier des nouvelles séquences signatures et des substitutions nucléotidiques spécifiques à *B. weihenstephanensis*. En faisant abstraction aux inclusions parasporales, les trois souches de *B. thuringiensis* doivent être classées comme *B. weihenstephanensis*.

L'espèce *B. thuringiensis* était toujours considérée comme une espèce mésophile. Or, la découverte de trois souches psychrotolérantes chez *B. thuringiensis* nous a poussé à s'interroger sur la possibilité de trouver des souches psychrotolérantes chez *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides* et *B. pseudomycoides*. Les analyses phylogénétiques des séquences de cinq gènes de ménage (*cspA*, *glpF*, *gmk*, *purH* et *tpi*) placent cinq souches de *B. cereus* et sept souches de *B. mycoides* avec *B. weihenstephanensis*. De plus, elles possèdent les mêmes séquences signatures que *B. weihenstephanensis*. Les résultats de

croissance à 7 °C et à 43 °C confirment que les cinq souches de *B. cereus* et les sept souches de *B. mycoides* sont psychrotolérantes. Toutes les souches de *B. anthracis* et *B. pseudomycoides* possèdent les caractéristiques des mésophiles.

En conclusion, les analyses phylogénétiques regroupent les souches de *B. cereus* en trois groupes majeurs. Le groupe I qui est mésophile comprend principalement *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus* et quelques *B. mycoides*. Le groupe II qui est psychrotolérant contient *B. weihenstephanensis* et les souches psychrotolérantes de *B. thuringiensis*, *B. cereus* et *B. mycoides*. Le groupe III qui est également mésophile comprend *B. pseudomycoides* et quelques *B. mycoides*. Il devient logique de suggérer la reclassification des souches psychrotolérantes identifiées dans ce projet comme des souches appartenant à l'espèce *B. weihenstephanensis*.

Ces résultats montrent que la classification des espèces du groupe *B. cereus* ne peut pas se baser sur des critères phénotypiques et physiologiques. L'hétérogénéité génétique et phénotypique ainsi que la présence des souches mésophiles, psychrotolérantes et thermotolérantes chez des espèces du groupe *B. cereus* indiquent que des travaux additionnels sont nécessaires pour une bonne classification de ces espèces.

Des études ont montré que les inclusions parasporales chez les souches *B. thuringiensis* CTC et GP1 sont composées non pas de protéines Cry mais de protéines de la couche S, Sap et EA1. Nous avons montré que ces deux protéines ne sont présentes que chez seulement 25 % de *B. thuringiensis*. La majorité des souches de *B. thuringiensis* possèdent des hydrolases (LytB/LytA). Il est intéressant de constater que la présence de Sap et EA1 ou LytB/LytA n'est pas influencée par la température de l'environnement. La composition de la paroi chez les souches psychrotolérantes est variable. Dans le même groupe thermique, certaines souches possèdent Sap et EA1 alors que d'autres possèdent LytB/LytA. De plus, les inclusions parasporales chez plusieurs souches de *B. thuringiensis* qui possèdent Sap et EA1, sont formées par des protéines Cry. Il est probable que les inclusions parasporales de *B. thuringiensis* CTC et GP1

soient contaminées par les protéines de la couche S, Sap et EA1 lors des manipulations. Par conséquent, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour vérifier la nature des inclusions parasporales chez *B. thuringiensis* CTC et GP1.

2.7 Perspectives de recherche

Les analyses en microscopie électronique à transmission confirment la présence d'inclusion parasporale chez *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis*. Cependant, la composition de leurs inclusions parasporales n'a pas encore été identifiée. En effet, les études précédentes sur la caractérisation de *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis* et *bolivia* avaient révélé seulement les tailles des protéines formant les inclusions parasporales sans pouvoir les identifier. *Bacillus thuringiensis* sérovar *navarrensis* produit une petite inclusion parasporale composée d'une seule protéine de 66 kd qui n'est visible sur un gel d'acrylamide que s'il est coloré avec le nitrate d'argent. *Bacillus thuringiensis* sérovar *bolivia* produit une grosse inclusion parasporale composée d'une seule protéine de 155 kd. Elle est très visible sur un gel d'acrylamide après coloration avec le bleu de Coomassie. Durant ces études, les auteurs ont essayé d'amplifier le gène responsable de cette inclusion parasporale en utilisant plusieurs paires d'amorces spécifiques à certains gènes *cry* mais sans succès. Il serait intéressant d'identifier cette protéine de façon plus ciblée. Pour y parvenir, il faut purifier les inclusions parasporales en utilisant un gradient de sucrose. La protéine formant l'inclusion devrait être solubilisée dans un tampon alcalin puis visualisée sur gel SDS Acrylamide. La bande protéique devrait être coupée et séquencée en utilisant la dégradation enzymatique d'Edman. Il existe une autre méthode qui focalise principalement sur les gènes *cry*. Cette méthode permet l'amplification par PCR de tous les gènes *cry* en utilisant des amorces dégénérées correspondant aux séquences conservées des blocs des protéines Cry. Il est fort probable que ces trois souches de *B. thuringiensis* produisent des inclusions parasporales composées de nouvelles protéines Cry dont les propriétés sont encore inconnues.

Les souches de *B. weihenstephanensis* ont été isolées initialement à partir du lait pasteurisé, placé à 7 °C pendant 10 à 16 jours. (Lechner *et al.*, 1998). Dans ces conditions, les souches psychrotolérantes qui sont capables de sporuler et de se développer en présence de l'oxygène vont être favorisées. Il serait intéressant de déterminer la population bactérienne totale et celle du groupe *B. cereus* présentes dans le lait pendant tout le processus depuis la traite jusqu'au stockage. La source de *B. weihenstephanensis* demeure inconnue. Une étude récente démontrait la présence des souches de *B. weihenstephanensis* dans le lait par la contamination des équipements utilisés dans la traite (Yakubchak et Galaburda, 2012).

Dans ce projet d'étude, nous avons montré que *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* sont des souches psychrotolérantes qui possèdent les caractéristiques typiques de *B. weihenstephanensis*. L'activité insecticide de *B. thuringiensis* sérovar *navarrensis* était nulle contre les larves de lépidoptères, coléoptères et diptères. Par contre, *B. thuringiensis* sérovar *bolivia* était toxique contre les larves de deux lépidoptères (*Plutella xylostella* et *Trichoplusia ni*). Des études ont montré que la souche KBAB4 de *B. weihenstephanensis* cultivée à 15 °C devient beaucoup plus toxique contre les insectes par rapport à la même souche cultivée à 37 °C (Réjasse *et al.*, 2012). Il serait intéressant de vérifier l'effet des basses températures sur l'activité insecticide de *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* en les testant contre les larves de lépidoptères, coléoptères et diptères. Comme la température constitue un facteur important dans le métabolisme cellulaire, il serait intéressant d'étudier l'effet de la température sur la formation des inclusions parasporales chez ces trois souches de *B. thuringiensis*. Pour y parvenir, il faut effectuer des analyses en microscopie électronique à transmission des cultures de *B. thuringiensis* sérovars *navarrensis*, *bolivia* et *vazensis* à différentes températures.

Des études récentes ont montré que des souches de *B. weihenstephanensis* pourraient produire des entérotoxines et des cereulides qui sont responsables des intoxications alimentaires (Altayar et Sutherland, 2006; Stenfors *et al.*, 2002; Stenfors *et al.*, 2007; Thorsen *et al.*, 2006). Nous avons identifié cinq souches psychrotolérantes de

B. cereus (BGSC 6A36, BGSC 6A37, AH603, AH621 et BDRD-ST196) qui possèdent les mêmes caractéristiques physiologiques et génétiques que *B. weihenstephanensis*. Il serait intéressant de vérifier la présence des gènes d'entérotoxines *nhe*, *hbl* ou *cytK* ou de cereulides chez ces cinq souches psychrotolérantes de *B. cereus*. Pour cela, il faut faire des amplifications par PCR en utilisant des amorces spécifiques à ces gènes de virulence.

Des études précédentes ont révélé la présence de deux morphotypes dextrale et sinistrale chez les colonies rhizoïdes de *B. mycoides* (Di Franco *et al.*, 2002). Une température à 38 °C inhibe la croissance de la forme dextrale, mais elle n'affecte pas la forme sinistrale qui continue sa croissance (Di Franco *et al.*, 2002). Il serait intéressant de savoir si les colonies rhizoïdes des souches psychrotolérantes de *B. mycoides* (BGSC 6A20, BGSC 6A47, BGSC 6A68, DSM 299, DSM 309, DSM 384 et ATCC 6462) présentent la forme dextrale alors que les souches mésophiles représentent la forme sinistrale chez *B. mycoides*. Si cela se confirme, la morphologie des colonies serait le premier facteur phénotypique qui est en rapport avec la psychrotolérance.

Les protéines de la couche S, Sap et EA1 ne sont présents que chez 25 % des souches de *B. thuringiensis*. Les autres souches de *B. thuringiensis* possèdent le tandem LytB/LytA. Les facteurs qui contrôlent la présence des protéines Sap et EA1 à la surface cellulaire sont probablement liés à l'environnement. Afin de mettre en évidence les différences au niveau de la paroi cellulaire, il serait intéressant d'analyser par microscopie électronique des coupes transversales des souches de *B. thuringiensis* possédant les protéines Sap et EA1 et LytB/LytA. D'après les résultats obtenus dans notre étude, il devient important de connaître le rôle des gènes *sap*, *eag* ou *lytB/lytA* dans le bon fonctionnement cellulaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adiri, R. S., Gophna, U. et Ron, E. Z. (2003). Multilocus Sequence Typing (MLST) of *Escherichia coli* 078 strains. *FEMS Microbiology Letters*, 222(2), 199-203.
- Afchain, A. L., Carlin, F., Nguyen-The, C. et Albert, I. (2008). Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurised and chilled foods. *International Journal of Food Microbiology*, 128(1), 165-173.
- Altayar, M. et Sutherland, A. D. (2006). *Bacillus cereus* is common in the environment, but emetic toxin-producing isolates are rare. *Journal of Applied Microbiology*, 100(1), 7-14.
- Andrup, L., Jorgensen, O., Wilcks, A., Smidt, L. et Jensen, G. B. (1996). Mobilization of "non-mobilizable" plasmids by the aggregation-mediated conjugation system of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, 36(2), 75-85.
- Andrup, L. (1998). Conjugation in gram-positive bacteria and kinetics of plasmid transfer. *APMIS Supplement*, 84(106), 47-55.
- Ankarloo, J., Caugant, D. A., Hansen, B. M., Berg, A., Kolstø, A-B. et Lövgren, A. (2000). Genome stability of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* isolates. *Current Microbiology*, 40(1), 51-56.
- Ash, C., Farrow, A. E., Wallbanks, S. et Collins, M. D. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters of Applied Microbiology*, 13(4), 202-206.
- Auger, S., Galleron, N., Bidnenko, E., Ehrlich, S. D., Lapidus, A. et Sorokin, A. (2008). The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is representative of a cluster of thermophilic strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1276-1280.
- Bach, H. J., Errampelli, D., Leung, K. T., Lee, H., Hartmann, A., Trevors, J. T. et Munch, J. C. (1999). Specific detection of the gene for the extracellular neutral protease of *Bacillus cereus* by PCR and blot hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 3226-3228.

- Bartoszewicz, M., Bideshi, D. K., Kraszewska, A., Modzelewska, E. et Swiecicka, I. (2009). Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* display genetic and psychrotrophic properties characteristic of *Bacillus weihenstephanensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 1967-1975.
- Battisti, L., Green, B. et Thorne, C. (1985). Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 162(2), 543-550.
- Bavykin, S. G., Lysov, Y. P., Zakhariev, V., Kelly, J. J., Jackman, J., Stahl, D. A. et Cherni, A. (2004). Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3711-3730.
- Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 1-20.
- Berliner, E. (1911). Uber die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe. *Zeitschr Ges Getreidew*, 3, 63-70.
- Berliner, E. (1915). Uber die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia Kuhnii*, Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n. sp.. *Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie*, 2(1), 29-56.
- Bhatnagar, R. et Batra, S. (2001). Anthrax toxin. *Critical Review Microbiology*, 27(3), 167-200.
- Bjelic, S., Brandsdal, B. O et Aqvist, J. (2008). Cold adaptation of enzyme reaction rates. *Biochemistry*, 47(38), 10049-10057.
- Brenchley, J. E. (1996). Psychrophilic microorganisms and their cold-active enzymes. *Journal of Industrial Microbiology*, 17(5-6), 432-437.
- Brenner, D. J., Fanning, G. R., Rake, A. V. et Johnson, K. E. (1969). Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite. *Analytical Biochemistry*, 28(1), 447-459.
- Bryan, F. L. (2004). The "danger zone" reevaluated. *Food Safety Magazine*, 10(1), 55-69.
- Chaloner, G. L., Ventosilla, P. et Birtles, R. J. (2011). Multi-locus sequence analysis reveals profound genetic diversity among isolates of the human pathogen *Bartonella bacilliformis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(7), e1248.

- Clewell, D. B. et Francia, M. V. (2004). Conjugation in gram-positive bacteria. In B. E. Funnell et G. Phillips (dir.), *Plasmid biology* (p.227-256). Washington, DC. ASM Press.
- Crosa, J. H., Brenner, D. J. et Falkow, S. (1973). Use of a single-strand specific nuclease for analysis of bacterial and plasmid deoxyribonucleic acid homo- and heteroduplexes. *Journal of Bacteriology*, 115(3), 904-911.
- Daffonchio, D., Borin, S., Frova, G., Manachini, P. L. et Sorlini, C. (1998). PCR fingerprinting of whole genomes: the spacers between the 16S and 23S rRNA genes and of intergenic tRNA gene regions reveal a different intraspecific genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 107-116.
- de Barjac, H. et Bonnefoi, A. (1962). Essai de classification biochimique et serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*. *Entomophaga*, 7, 5-31.
- de Barjac, H. et Bonnefoi, A. (1968). A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with key to their differentiation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 11(3), 335-347.
- de Barjac, H. et Bonnefoi, A. (1973). Mise au point sur la classification des *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga*, 18(1), 5-17.
- de Barjac, H. (1978). Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques: *B. thuringiensis* var. *israelensis* serotype H14. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D: Sciences naturelles*, 286(10), 797-800.
- De Ley, J., Cattoir, H. et Reynaerts, A. (1970). The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *European Journal of Biochemistry*, 12(1) 133-142.
- Di Franco, C., Beccari, E., Santini, T., Pisaneschi, G. et Tecce, G. (2002). Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*. *BMC Microbiology*, 2, 1-15.
- Dingle, K. E., Colles, F. M., Wareing, D. R., Ure, R., Fox, A. J., Bolton, F. E., Bootsma, H. J., Willems, R. J., Urwin, R. et Maiden, M. C. (2001). Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), 14-23.
- Drobniewski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(4), 324-338.

- Duc, L. H., Hong, H. A., Barbosa, T. M., Henriques, A. O. et Cutting, S. M. (2004). Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2161-2171.
- Dufrenne, J., Bijwaard, M., te Giffel, M., Beumer, R. et Notermans, S. (1995). Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 27(2-3), 175-183.
- Dulmage, H. T. (1970). Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15(2), 232-239.
- Dunny, G. M. (2007). The peptide pheromone-inducible conjugation system of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: cell-cell signaling, gene transfer, complexity, and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362, 1185-1193.
- Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretiere, M. H., Lindback, T., Andersson, M., Schulz, A., Fricker, M., Christiansson, A., Granum P. E., Märtilbauer, E., Nguyen-The, C., Salkinoja-Salonen, M. et Scherer, S. (2005). Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology*, 151(1), 183-197.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Grallert, H., Rieck, P., Wagner, M. et Scherer, S. (2006). Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiology*, 2(6), 20.
- Enright, M. C. et Spratt, B. G. (1998). A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae* identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*, 144, 3049-3060.
- Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J. et Spratt, B. G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1008-1015.
- Enright, M. C., Spratt, B. G., Kalia, A., Cross, J. H. et Bessen, D. E. (2001). Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between emm type and clone. *Infection and Immunity*, 69(4), 2416-2427.
- Eriksson, S., Hurme, R. et Rhen, M. (2002). Low-temperature sensors in bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1423), 887-893.

- Ezaki, T., Hashimoto, Y. et Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane-filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(3), 224-229.
- Fagerlund, A., Brillard, J., Furst, R., Guinebretière, M. H. et Granum, P. E. (2007). Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group. *BMC Microbiology*, 7, 43.
- Feller, G. et Gerday, C. (1997). Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53(10), 830-841.
- Fernandez-Herrera, M., De-Mingo, I. G. et Blat-Martin, N. (1987). Inositol hexaphosphate 'in vitro' mineralization by means of two *B. cereus* strains. *Anales de Edafologia y Agrobiologia*, 46, 423-432.
- Ferrandis, M. D., Andrew, R., Porcar, M., Iriarte, J., Cosmao-Dumanoir, V., Lecadet, M. M., Caballero, P. et Ferré, J. (1999). Characterization of *Bacillus thuringiensis* serovar *bolivia* (serotype H63), a novel serovar isolated from the Bolivian high valleys, *Letters of Applied Microbiology*, 28, 440-444.
- Francis, K. P., Mayr, R., von Stetten, F., Stewart, G. et Scherer, S. (1998). Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3525-3529.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365-378.
- Fuller, R. (1991). Probiotics in Human Medicine. *Gut*, 32(4), 434-442.
- Garcia-Robles, I., Sanchez, J., Gruppe, A., Martinez-Ramirez, A. C., Rausell, C., Real, M. D. et Bravo, A. (2001). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 strain in hymenopteran forest pests Insect. *Biochemistry and Molecular Biology*, 31(9), 849-856.
- Georlette, D., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., Marx, J. C., Sonan, G., Feller, G. et Gerday, C. (2004). Some like it cold: Biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(1), 25-42.
- Godon, J. J., Jury, K., Shearman, C. A. et Gasson, M. J. (1994). The *Lactococcus lactis* sex-factor aggregation gene *cluA*. *Molecular and Microbiology*, 12(4), 655-663.

- Goldberg, L. J. et Margalit, J. (1977). A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News*, 37(3), 355-358.
- González, J. M. Jr., Dulmage, H. T. et Carlton, B. C. (1981). Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, 5(3), 351-365.
- González, J. M. Jr., Brown, B. J. et Carlton, B. C. (1982). Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proceeding of the National Academy of Sciences (USA)*, 79(22), 6951-6955.
- Gough, J. M., Akhurst, R. J., Ellar, D. J., Kemp, D. H. et Wijffels, G. L. (2002). New isolates of *Bacillus thuringiensis* for control of livestock ectoparasites. *Biological Control*, 23(2), 179-189.
- Gounot, A. M. (1991). Bacterial Life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. *Journal of Applied Bacteriology*, 71(5), 386-397.
- Granum, P. E. et Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157(2), 223-228.
- Griffiths, M. W. (1992). *Bacillus cereus* in liquid milk and other milk products. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 275, 36-39.
- Groudieva, T., Grote, R. et Antranikian, G. (2003). *Psychromonas arctica* sp. nov., a novel psychrotolerant, biofilm-forming bacterium isolated from Spitzbergen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 539-545.
- Guinebretière, M. H., Berge, O., Normand, P., Morris, C., Carlin, F. et Nguyen-The, C. (2001). Identification of bacteria in pasteurized zucchini purees stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purees. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4520-4530.
- Guinebretiere, M. H. et Sanchis, V. (2003). *Bacillus cereus* sensu lato. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie*, 18, 95-103.
- Guinebretiere, M. H., Thompson, F. L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M. et De Vos, P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology*, 10(4), 851-865.

- Guinebretière, M. H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M. L., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P. E., Lereclus, D., De Vos, P., Nguyen-The, C. et Sorokin, A. (2013). *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(1), 31-40.
- Guo, G., Zhang, L., Zhou, Z., Ma, Q., Liu, J., Zhu, C., Zhu, L., Yu, Z. et Sun, M. (2008). A new group of parasporal inclusions encoded by the S-layer gene of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 282(1), 1-7.
- Hanage, W. P., Fraser, C. et Spratt, B. G. (2005). Fuzzy species among recombinogenic bacteria. In C. P. Robert et G. Casella (dir.), *Monte Carlo Statistical Methods* (p.6). New York: Springer. *BMC Biol* 3, 6.
- Harrell, L. J., Andersen, G. L. et Wilson, K. H. J. (1995). Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(7), 1847-1850.
- Hauge, S. (1955). Food poisoning caused by aerobic spore forming bacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 18(3), 591-595.
- Hebraud, M. et Potier, P. (1999). Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1(2), 211-219.
- Heimpel, A. M. et Angus, T. A. (1958). The taxonomy of insect pathogens related to *Bacillus cereus* Fr. and Fr.. *Canadian Journal of Microbiology*, 4, 531-541.
- Helgason, E., Caugant, D. A., Lecadet, M. M., Chen, Y., Mahillon, J., Lövgren, A., Hegna, I., Kvaløy, K. et Kolstø, A-B. (1998). Genetic diversity of *Bacillus cereus*/*B. thuringiensis* isolates from natural sources. *Current Microbiology*, 37(2), 80-87.
- Helgason, E., Økstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I. et Kolstø, A-B. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*— one species on the basis of genetic evidence. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2627-263.
- Helgason, E., Tourasse, N. J., Meisal, R., Caugant, D. A. et Kolstø, A-B. (2004). Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 191-201.

- Hill, K. K., Ticknor, L. O., Okinaka, R. T., Asay, M., Blair, H., Bliss, K. A., Laker, M., Pardington, P. E., Richardson, A. P., Tonks, M., Beecher, D. J., Kemp, J. D., Kolstø, A-B., Lee Wong, A. C., Keim, P. et Jackson, P. J. (2004). Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 1068-1080.
- Homan, W. L., Tribe, D., Poznanski, S., Li, M., Hogg, G., Spalburg, E., Van Embden, J. et Willems, R. J. L. (2002). Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), 1963-1971.
- Hoton, F. M., Andrup, L., Swiecicka, I. et Mahillon, J. (2005). The cereulide genetic determinants of emetic *B. cereus* are plasmidborne. *Microbiology*, 151(7), 2121-2124.
- Hu, X., Hansen, B. M., Yuan, Z., Johansen, J. E., Eilenberg, J., Hendriksen, N. B., Smidt, L. et Jensen, G. B. (2005). Transfer and expression of the mosquitocidal plasmid pBtoxis in *Bacillus cereus* group strains. *FEMS Microbiology Letters*, 245(2), 239-247.
- Huck, J. R., Hammond, B. H., Murphy, S. C., Woodcock, N. H. et Boor, K. J. (2007). Tracking Spore-Forming Bacterial Contaminants in Fluid Milk-Processing Systems. *Journal Dairy Science*, 90(10), 4872-4883.
- Iriarte, J., Bel, Y., Ferrandis, M. D., Andrew, R., Murillo, J., Ferré, J. et Caballero, P. (1998). Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. *Systematic and Applied Microbiology*, 21(1), 97-106.
- Iriarte, J., Cosmao Dumanoir, V., Bel, Y., Porcar, M., Ferrandis, M. D., Lecadet, M-M., Ferré, J. et Caballero, P. (2000). Characterization of *Bacillus thuringiensis* ser. *balearica* (serotype H48) and ser. *navarrensensis* (serotype H50): Two novel serovars isolated in Spain. *Current Microbiology*, 40, 17-22.
- Ishiwata, S. (1905a). Concerning 'Sotto-Kin' a *Bacillus* of a disease of the silkworm. *Report Association Seric* (Japan), 160, 1-8.
- Ishiwata, S. (1905b). About "Sottokin", a *Bacillus* of a disease of the silk-worm. *Dai nihon Sanshi Kaiho. Report Association Seric* (Japan), 161, 1-5.
- Johnson, K. M., Nelson, C. L. et Busta, F. F. (1984). Influence of heating and cooling rates on *Bacillus cereus* spore survival and growth in a broth medium and in rice. *Journal of Food Science*, 49(1), 34-39.

- Keim, P., Kalif, A., Schupp, J., Hill, K., Travis, S. E., Richmond, K., Adair, D. M., Hugh-Jones, M., Kuske, C. R. et Jackson, P. (1997). Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *Journal of Bacteriology*, 179(3), 818-824.
- Keim, P., Price, L. B., Klevytska, A. M., Smith, K. L., Schupp, J. M., Okinaka, R., Jackson, P. J. et Hugh-Jones, M. E. (2000). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2928-2936.
- Ko, K. S., Kim, J. W., Kim, J. M., Kim, W., Chung, S. I., Kim, I. J. et Kook, Y. H. (2004). Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* gene. *Infection and Immunity*, 72(9), 5253-5261.
- Kotetishvili, M., Stine, O. C., Kreger, A., Morris, J. G. Jr. et Sulakvelidze, A. (2002). Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5), 1626-1635.
- Kotiranta, A., Haapasalo, M., Kari, K., Kerosuo, E., Olsen, I., Sorsa, T., Meurman, J. H. et Lounatmaa, K. (1998). Surface structure, hydrophobicity, phagocytosis, and adherence to matrix proteins of *Bacillus cereus* cells with and without the crystalline surface protein layer. *Infection and Immunity*, 66(10), 4895-4902.
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K. et Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infection*, 2(2), 189-198.
- Larsen, H. D. et Jørgensen, K. (1997). The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology*, 34(2), 179-186.
- Lecadet, M-M., Frachon, E., Cosmao Dumanoir, V., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P. et Thiery, I. (1999). Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 86(4), 660-672.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K. P., Prüß, B. M., Kaplan, T., Wießner-Gunkel, E., Stewart, G. S. A. B. et Scherer, S. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(4), 1373-1382.
- Li, Z., Pan, Y., Wu, Q. et Li, L. (1989). Numbers, compositions and enzyme activities of denitrifiers in paddy soils of Taihu Lake district (China). *Acta Pedologica Sinica*, 26(1) 79-86.

- Logan, N. A. et De Vos, P. (2009). Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174^{AL}. In P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K-H. Schleifer et W. B. Whitman (dir.), *Bergey's Manual of systematic bacteriology* (p. 21-128). New York, 2^{ème} édition. Springer.
- Lund, T. et Granum, P. E. (1996). Characterisation of a non-hemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a food-borne outbreak. *FEMS Microbiology Letters*, 141(2-3), 151-156.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M. et Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceeding of the National Academy of Sciences (USA)*, 95(6), 3140-3145.
- Marroquin, L. D., Elyassnia, D., Griffiths, J. S., Feitelson, J. S. et Aroian, R. V. (2000). *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 155(4), 1693-1699.
- Meats, E., Feil, E. J., Stringer, S., Cody, A. J., Goldstein, R., Kroll, J. S., Popvic, T. et Spratt, B. G. (2003). Characterization of encapsulated and nonencapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1623-1636.
- Meer, R. R., Baker, J., Bodyfelt, F. W. et Griffiths, M. W. (1991). Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. *Journal of Food Protection*, 54(12), 969-979.
- Mescher, M. F. et Strominger, J. L. (1976). Structural (shape-maintaining) role of the cell surface glycoprotein of *Halobacterium salinarium*. *Proceeding of the National Academy of Sciences (USA)*, 73(8), 2687-2691.
- Mesnage, S., Tosi-Couture, E., Mock, M. et Fouet, A. (1999). The S-layer homology domain as a means for anchoring heterologous proteins on the cell surface of *Bacillus anthracis*. *Journal of Applied Microbiology*, 87(2), 256-260.
- Mesnage, S., Fontaine, T., Mignot, T., Delepierre, M., Mock, M. et Fouet, A. (2000). Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *EMBO Journal*, 19(17), 4473-4484.
- Mignot, T., Denis, B., Couture-Tosi, E., Kolstø, A-B., Mock, M. et Fouet, A. (2001). Distribution of S-layers on the surface of *Bacillus cereus* strains: phylogenetic origin and ecological pressure. *Environmental Microbiology*, 3(8), 493-501.

- Mignot, T., Mesnage, S., Couture-Tosi, E., Mock, M. et Fouet, A. (2002). Developmental switch of S-layer protein synthesis in *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1615-1627.
- Milner, J. L., Silo-Suh, L., Lee, J. C., He, H., Clardy, J. et Handelsman, J. (1996). Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), 3061-3065.
- Mock, M. et Fouet, A. (2001). Anthrax. *Annual Review Microbiology*, 55(1), 647-671.
- Nakamura, L. K. et Jackson, M. A. (1995). Clarification of the taxonomy of *Bacillus mycoides*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1), 46-49.
- Nakamura, L. K. (1998). *Bacillus pseudomycooides* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(3), 1031-1035.
- Noller, A. C., McEllistrem, M. C., Pacheco, A. G. F., Boxrud, D. J. et Harrison, L. H. (2003). Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5389-5397.
- Ohba, M. et Aizawa, K. (1986). Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 47(1), 12-20.
- Papke, R. T., Koenig, J. E., Rodriguez-Valera, F. et Doolittle, W. F. (2004). Frequent recombination in a saltern population of *Halorubrum*. *Science*, 306(5703), 1928-1929.
- Papke, R. T., Zhaxybayeva, O., Feil, E. J., Sommerfeld, K., Muise, D. et Doolittle, W. F. (2007). Searching for species in *haloarchaea*. *Proceeding of the National Academy of Sciences (U S A)*, 104(35), 14092-14097.
- Pei, Z. et Blaser, M. J. (1990). Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. Role of surface array proteins in virulence in a mouse model. *Journal of Clinical Investigation*, 85(4), 1036-1043.
- Peña, G., Miranda-Rios, J., de la Riva, G., Pardo-López, L., Soberón, M. et Bravo, A. (2006). A *Bacillus thuringiensis* S-layer protein involved in toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 353-360.
- Phadtare, S. (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. *Current Issues in Molecular Biology*, 6(2), 125-136.

- Pinchuk, I. V., Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B., Sorokulova, I. B., Megraud, F. et Urdaci, M. C. (2001). *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(11), 3156-3161.
- Prakash, S., Bhat, S. R., Quiros, C. F., Kirti, P. B. et Chopra V. L. (2009). *Brassica* and its close allies: cytogenetics and evolution. *Plant Breeding Reviews*, 31, 21-187.
- Priest, F. G., Barker, M., Baillie, L. W. J., Holmes, E. C. et Maiden, M. C. J. (2004). Population Structure and Evolution of the *Bacillus cereus* Group. *Journal of Bacteriology*, 186(23), 7959-7970.
- Pum, D., Neubauer, A., Györfvay, E., Sára, M. et Sleytr, U. B. (2000). S-layer proteins as basic building blocks in a biomolecular construction kit. *Nanotechnology*, 11(2), 100-107.
- Rasko, D. A., Altherr, M. R., Han, C. S. et Ravel, J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(2), 303-329.
- Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Økstad, O. A., Fouts, D. E., Jiang, L., Cer, R. Z., Kolstø, A.-B., Gill, S. R. et Ravel, J. (2007). Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *Journal of Bacteriology*, 189(1), 52-64.
- Rau, J., Perz, R., Klittich, G. et Contzen, M. (2009). Cereulide forming presumptive *Bacillus cereus* strains from food – differentiating analyses using cultural methods, LC-MS/MS, PCR, and infrared spectroscopy in consideration of thermotolerant isolates. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 122(1-2), 25-36.
- Read T. D., Salzberg, S. L., Pop, M., Shumway, M., Umayam, L., Jiang, L., Holtzapple, E., Busch, J. D., Smith, K. L., Schupp, J. M., Solomon, D., Keim, P. et Fraser, C. M. (2002). Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. *Science*, 296(5575), 2028-2033.
- Reddy, A., Battisti, L. et Thorne, C. B. (1987). Identification of self-transmissible plasmids in four *Bacillus thuringiensis* subspecies. *Journal of Bacteriology*, 169(11), 5263-5270.
- Réjasse, A., Gilois, N., Barbosa, I., Huillet, E., Bevilacqua, C., Tran, S., Ramarao, N., Stenfors Arnesen, L. P. et Sanchis, V. (2012). Temperature-dependent production of various PlcR-controlled virulence factors in *Bacillus weihenstephanensis* strain KBAB4. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2553-2561.

- Rivera, A. M. G., Granum, P. E. et Priest, F. G. (2000). Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 190, 151-155.
- Sabelnikov, A. G. et Ulyashova, L. (1990). Plasmid transformation of *Bacillus cereus* on cellophane membranes. *FEMS Microbiology Letters*, 60(1-2), 123-126.
- Sanchis, V., Agaisse, H., Chaufaux, J. et Lereclus, D. (1996). Construction of new insecticidal *Bacillus thuringiensis* recombinant strains by using the sporulation non-dependent expression System of cryIIIA and a site specific recombination vector. *Journal of Biotechnology*, 48(1-2), 81-96.
- Sára, M. et Sleytr, U. B. (1987). Molecular sieving through S layers of *Bacillus stearothermophilus* strains. *Journal of Bacteriology*, 169(9), 4092-4098.
- Sára, M., Pum, D. et Sleytr, U. B. (1992). Permeability and charge dependent adsorption properties of the S-layer lattice from *Bacillus coagulans* E38-66. *Journal of Bacteriology*, 174(11), 3487-3493.
- Sára, M. et Sleytr, U. B. (2000). S-layer proteins. *Journal of Bacteriology*, 182(4), 859-868.
- Sato, K. et Asano, S. (2004). Cloning and sequencing of the gene for a putatively nematode-toxic crystal protein, Cry21Ba1, from *Bacillus thuringiensis* serovar *roskildiensis*. *Japanese Journal of Nematology*, 34, 79-88.
- Schär, J., Stoll, R., Schauer, K., Loeffler, D. I. M., Eylert, E., Joseph, B., Eisenreich, W., Fuchs, T. M. et Goebel, W. (2010). Pyruvate carboxylase plays a crucial role in carbon metabolism of extra- and intracellularly replicating *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 192(7), 1774-1784.
- Seki, T., Chung, C. K., Mikami, H. et Oshima, Y. (1978). Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus *Bacillus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 28(2), 182-189.
- Shisa, N., Wasano, N., Ohgushi, A., Lee, D-H. et Ohba, M. (2002). Extremely high frequency of common flagellar antigens between *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, 213(1), 93-96.
- Skerman, V. B., McGowan, V. et Sneath, P. H. A. (1980). Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30(1), 225-420.
- Sleytr, U. B., et Messner, P. (1983). Crystalline surface layers on bacteria. *Annual Review Microbiology*, 37, 311-339.

- Soufiane, B. et Côté, J-C. (2009). Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, *gyrB* and *aroE* gene sequence analyses. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 95(1), 33-45.
- Soufiane, B. et Côté, J-C. (2010). *Bacillus thuringiensis* serovars *bolivia*, *vazensis* and *navarrensis* meet the description of *Bacillus weihenstephanensis*. *Current Microbiology*, 60(5), 343-349.
- Soufiane, B., Sirois, M. et Côté, J-C. (2011). Mutually exclusive distribution of the *sap* and *eag* S-layer genes and the *lytB/lytA* cell wall hydrolase genes in *Bacillus thuringiensis*. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 100(3), 349-364.
- Soufiane, B., Baizet, M. et Côté, J-C. (2013). *Bacillus thuringiensis* serovars *bolivia*, *vazensis* and *navarrensis* and *Bacillus weihenstephanensis* share similar housekeeping gene sequences indicative of a common phylogeny. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 103(1), 195-205.
- Soufiane, B. et Côté, J-C. (2013). *Bacillus weihenstephanensis* characteristics are present in *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 341(2), 127-137.
- Soufiane, B. et Côté, J-C. (2013). Discrimination among mesophilic and psychrotolerant strains in the *Bacillus cereus* group based on the PstI digestion of the *pycA* gene. *Current Microbiology*, 67, 148-155.
- Spencer, R. C. (2003). *Bacillus anthracis*. *Journal of Clinical Pathology*, 56(3), 182-187.
- Stackebrandt, E. et Goebel, B. M. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4), 846-849.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. D., Kämpfer, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C et Whitman, W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 1043-1047.
- Stanley, T. et Wilson, I. G. (2003). Multilocus enzyme electrophoresis. *Molecular Biotechnology*, 24(2), 203-220.

- Stenfors, L. P. et Granum, P. E. (2001) Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 197(2), 223–228
- Stenfors, L. P., Mayr, R., Scherer, S. et Granum, P.E. (2002). Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 215(1), 47-51.
- Stenfors Arnesen, L. P., O'Sullivan, K. et Granum, P. E. (2007). Food poisoning potential of *Bacillus cereus* strains from Norwegian dairies. *International Journal of Food Microbiology*, 116(2), 292-296.
- Stentz, R., Gasson, M. et Shearman, C. (2006). The Tra domain of the lactococcal CluA surface protein is a unique domain that contributes to sex factor DNA transfer. *Journal of Bacteriology*, 188(6), 2106-2114.
- Sun, M., Zhu, C. et Yu, Z. (2001). Cloning of parasporal body protein gene resembling to S-layer protein genes from *Bacillus thuringiensis* CTC strain. *Acta Microbiologica Sinica*, 41, 141-147.
- Takeda, K., Kang, Y., Yazawa, K., Gono, T. et Mikami, Y. (2010). Phylogenetic studies of *Nocardia* species based on *gyrB* gene analyses. *Journal of Medical Microbiology*, 59(2), 165-171.
- Tang, K. H., Tang, Y. J. et Blankenship, R. E. (2011) Carbon metabolic pathways in phototrophic bacteria and their broader evolutionary implications. *Frontiers in Microbiology*, 2, 165.
- Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C. et Faille, C. (2006). Variability among *Bacillus cereus* strains in spore formation properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *International Journal of Food Microbiology*, 110(3), 254-262.
- Thieringer, H. A., Jones, P. G. et Inouye, M. (1998). Cold shock and adaptation. *Bioessays*, 20(1), 49-57.
- Thorsen, L., Hansen, B. M., Nielsen, K. F., Hendriksen, N. B., Phipps, R. K. et Budde, B. B. (2006). Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide producing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5118-5121.

- Ticknor, L. O., Kolstø, A-B., Hill, K. K., Keim, P., Laker, M. T., Tonks, M. et Jackson, P. J. (2001). Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4863-4873.
- Van Loo, I. H. M., Heuvelman, K. J., King, A. J. et Mooi, F. R. (2002). Multilocus sequence typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), 1994-2001.
- Van Netten, P., Van De Moosdijk, A., Van Hoensel, P., Mossel, D. A. A. et Perales, I. (1990). Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *Journal of Applied Microbiology*, 69(1), 73-79.
- Von Stetten F., Francis K. P., Lechner S., Neuhaus K. et Scherer S. (1998). Rapid discrimination of psychrotolerant and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of 16S rDNA. *Journal of Microbiology Methods*, 34(2), 99-106.
- Von Stetten F., Mayr R. et Scherer S. (1999). Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. *Environmental Microbiology*, 1(6), 503-515.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. et Trüper H. G. (1987). International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(4), 463-464.
- Weber, M. H. et Marahiel, M. A. (2002). Coping with the cold: the cold shock response in the Gram-positive soil bacterium *Bacillus subtilis*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1423), 895-907.
- Wellman-Desbiens, É., Lucas, É., et Côté, J-C. (2011). Screening of the nematicidal activity and sub-lethal effects of the bacterium *Bacillus thuringiensis* on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *International Journal of Nematology*, 21(2), 169-180.
- Wildhaber, I. et Baumeister, W. (1987). The cell envelope of *Thermoproteus tenax*: three-dimensional structure of the surface layer and its role in shape maintenance. *EMBO Journal*, 6(5), 1475-1480.
- Wilks, K. E., Dunn, K. L. R., Farrant, J. L., Reddin, K. M., Gorringe, A. R., Langford, P. R. et Kroll, J. S. (1998). Periplasmic superoxide dismutase in meningococcal pathogenicity. *Infection and Immunity*, 66(1), 213-217.

- Wojciechowska, J. A., Lewitin, E., Revina, L. P., Zalunin, I. A. et Chestukhina, G. G. (1999). Two novel delta-endotoxin gene families *cry26* and *cry28* from *Bacillus thuringiensis* ssp. *finitimus*. *FEBS Letters*, 453(1-2), 46-48.
- Xu, D. et Côté, J-C. (2006). Sequence diversity of the *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus sensu lato* flagellin (H antigen) protein: Comparison with H serotype diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4653-4662.
- Yamamoto, S. et Harayama, S. (1995). PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 1104-1109.
- Yakubchak, O. et Galaburda, M. (2012). Contamination of bulk milk by psychrotrophic microorganisms during milking and milk processing. *Earth Bioresources and Quality of Life*, 1
- Zhu, C. et Yu, Z. (2008). The surface layer protein of *Bacillus thuringiensis* CTC forms unique intracellular parasporal inclusion body. *Journal of Basic Microbiology*, 48(4), 302-307.