

République Algérienne Démocratique et Populaire
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Université Amar thelidji Laghouat
جامعة عمار تليجي بالأغواط
Faculté des sciences
كلية العلوم
Département de biologie
قسم البيولوجيا



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master
Filière : Sciences Biologiques
Option : Microbiologie Appliquée

THEME

**Etude de la thermorésistance des spores du groupe *B.cereus* isolées à partir
de certaines épices commercialisées dans la région de Laghouat**

Présenté par:

BENALI Cheima

BOUHIRED Hind

Soutenu publiquement le 30/06/2022 devant le jury composé de :

President: Mr.BECHEUR Mourad M.A.A Université Amar Telidji –Laghouat

Examineur: Mr.DJEBLI Ahmed M.A.A Université Amar Telidji –Laghouat

Promoteur: Mr.MADOURI Redouane M.A.A Université Amar Telidji –Laghouat

Remerciements

Nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir guidé, aidé et donné la patience et le courage pour accomplir ce travail.

*Nous voudrions dans un premier temps remercier notre encadreur **Mr.MADOURI Redouane** pour ses précieux conseils, ses encouragements et pour sa patience, sa rigueur durant notre préparation de ce mémoire.*

*Nos sincères remerciements à **Mr.BECHEUR Mourad**, D'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance.*

*Nos sincères remerciements à **Mr.DJEBLI Ahmed**, qui a consacré son temps pour l'examen de ce travail.*

Nos remerciements à tous les membres de l'équipe de laboratoire de l'université de Laghouat pour leur aide.

Nous tenons aussi à remercier chaleureusement tous nos enseignants de département de biologie qui nous ont suivis au long de nos études.

Enfin, nous tenons à remercier tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

MERCI !

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

*A mes chers Parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour,
leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de
mes études*

*A mon cher frère YAKOUB pour leurs encouragements
permanents, et leur soutien moral,*

*A ma chère sœur RAHIL pour leur appui et leur
encouragement,*

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon
parcours universitaire,*

Mon cher binôme CHEIMA,

*Toutes mes amies, particulièrement : RACHA, SOUHILA,
RANDA, MARIA, MAROUA,*

*À tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin et qui m'ont
accompagné*

Merci d'être toujours là pour moi.

Hind

Dédicace

*Je tiens c'est avec grande plaisir que je dédie ce
modeste travail :*

A ma chère mère

A mon cher père

*qui n'ont jamais cessé, de formuler des prière à mon
égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je
puisse atteindre mes objectifs*

A mes chères sœurs, HDJAR, SOUMIA et son mari

A mon cher frère MOHAMMED

*pour ses soutiens moral et leurs conseils précieux tout
au long de mes études.*

A ma chère binôme, HIND

pour sa patience et sa coopération

A toutes mes amies, particulièrement: MOUFIDA,

OUAFAA, ASSMA, WAHIBA et BOUCHRA.

pour leur aides et supports dans les moment difficiles.

Chéïma

Liste des abréviations

AFNOR : Association française de normalisation.

A_w: L'activité de l'eau.

BHIB: Brain Heart Infusion Broth (bouillon Cœur-cervelle).

Cytk: La cytotoxine K.

Dt : Durée de réduction décimale.

DPA : L'acide dipicolinique.

HBL : Hémolysine BL.

ISO : Organisation internationale de normalisation.

MnSO₄ : Sulfate monohydrate de manganèse.

MYP : Mannitol eggvolkpolymyxin.

NHE : Entérotoxine non hémolytique.

NK : Natural killer

P : Paramètre de distribution.

TIAC : Toxi-infections alimentaires collectives

TSE : Tryptone sel eau.

UFC : Unités Formatrices de Colonie.

WP : Water peptone

Z : Paramètre sensibilité au traitement thermique.

Liste des figures

Figure 01 : *Bacillus thuringiensis*. Images en microscope de contraste de phase objectifs 100 X. (A) : *B. thuringiensis* phase sporulée.....6

Figure 02 : Cycle de sporulation et germination de *Bacillus subtilis*.....8

Figure 03: Schematic representation of the internal structure of a bacterial spore.....9

Figure 04: Echantillons d'épices pesées dans des pots stériles.....20

Figure 05 : Préparation des dilutions décimales et d'ensemencement sur milieu Mossel.....22

Figure 06 : Ensemencement de la galerie API50 CH.....23

Figure 07 : Observation macroscopique des colonies *Bacillus cereus* sur la gélose Mossel complète.....28

Figure 08 : Diagramme représentant les niveaux de contamination des épices par les spores de *Bacillus cereus*.....29

Figure 09 : La galerie API50.....30

Figure 10 : colonies de *B.cereus* sur GN après traitement thermique.....31

Figure 11 : Cinétique de destruction de la souche 1, A(90°C), B(95°C), C(100°C).....32

Figure 12 : Cinétique de destruction de la souche 2, A(95°C), B(100°C), C(105°C).....33

Figure 13 : Cinétique de destruction de la souche 3, A(95°C), B(100°C), C(110°C).....34

Figure 14 : Cinétique de destruction de la souche 4, A(95°C), B(100°C), C(105°C).....35

Figure 15 : Cinétique de destruction de la souche 6, A(85°C), B(95°C), C(100°C).....36

Figure 16 : Cinétique de sensibilité de la souche 1-CUR.....38

Figure 17 : Cinétique de sensibilité de la souche 2-Gin.....38

Figure 18 : Cinétique de sensibilité de la souche 3-Mél.....38

Figure 19 : Cinétique de sensibilité de la souche 4-Cum.....38

Figure 20 : Cinétique de sensibilité de la souche 6-Fen.....39

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification phénétique du genre *Bacillus*.....7

Tableau 02 : Groupes phylogénétiques de *B. cereus sensu lato*.....8

Tableau 03 : Les toxines de *B. cereus* qui jouent un rôle dans le développement d'infections locales ou systémiques.....15

Tableau 4 : Caractéristiques des maladies à symptômes émétiques et à symptômes diarrhéiques.....17

Tableau 05 : Nombre d'échantillons d'épice prélevés.....21

Tableau 06 : L'origine d'épices et leurs codes.....24

Tableau 07 : Barème du traitement thermique.....25

Tableau 08 : Les paramètres de thermorésistance des 5 souches retenues.....37

Résumé

Les produits alimentaires déshydratés dont les épices et les herbes séchées peuvent être contaminées par plusieurs microorganismes sporulés. *Bacillus cereus* est une bactérie qui forme des spores thermorésistantes reconnue pour son implication dans les TIAC.

Ce travail a été réalisé pendant la période de février jusqu'à Avril, il vise à rechercher et dénombrer ce groupe de bactéries. En effet, 20 échantillons ont été prélevés puis analysés. Les résultats ont montré que parmi les 20 échantillons 12 ont été contaminés avec un taux maximal de $1,313 \times 10^9$ ufc/g dans le Carvi et un taux minimal de $2,55 \times 10^4$ ufc/g dans le Cumin.

L'étude de la thermorésistance des spores de *B.cereus* a été réalisée à six températures différentes. Les valeurs de la destruction thermique obtenues sont : D95°C comprise entre 9.73 à 27.36min, les valeurs D100°C de 5.59 à 11.17min et D105°C sont 6,001 et 11,04min.

Concernant la sensibilité thermique Zt des souches étudiées a montré des valeurs comprises entre 15.38°C à 32.15°C pour les souches 3-Mél qui était la plus résistante et la souche 6-Fen qui était la plus sensible.

Les résultats obtenus lors de cette étude peuvent construire un outil lors d'une étude plus large sur l'estimation des risques liés à la consommation des *B. cereus* dans les plats cuisiniers.

Mots clés : Epice, *B.cereus*, spores, Thermorésistance, destruction thermique, sensibilité thermique

Abstract

Dehydrated food products including spices and dried herbs can be contaminated with several spore-forming microorganisms. *Bacillus cereus* is a bacterium that forms heat-resistant spores recognized for its involvement in TIAC.

This work was carried out during the period from February to April, it aims to find and count this group of bacteria. Indeed, 20 samples were taken and then analyzed. The results showed that among the 20 samples, 12 were contaminated with a maximum rate of 1.313×10^9 cfu/g in Caraway and a minimum rate of 2.55×10^4 cfu/g in Cumin.

The study of the thermoresistance of *B.cereus* spores was carried out at six different temperatures. The thermal destruction values obtained are: $D_{95^\circ\text{C}}$ between 9.73 and 27.36min, the $D_{100^\circ\text{C}}$ values from 5.59 to 11.17min and $D_{105^\circ\text{C}}$ are 6.001 and 11.04min.

Regarding the thermal sensitivity Z_t of the strains studied showed values between 15.38°C and 32.15°C for the 3-Mel strains which was the most resistant and the 6-Fen strain which was the most sensitive.

The results obtained during this study can build a tool during a larger study on the estimation of the risks associated with the consumption of *B. cereus* in cooked dishes.

Keywords: Spice, *B.cereus*, spores, Thermoresistance, thermal destruction, thermal sensitivity

ملخص

يمكن أن تتلوث المنتجات الغذائية المجففة بما في ذلك التوابل والأعشاب المجففة بالعديد من الكائنات الحية الدقيقة المكونة للجراثيم. *Bacillus cereus* هي بكتيريا تشكل جراثيم مقاومة للحرارة معترف بها لمشاركتها في التسمم الغذائي الجماعي.

تم تنفيذ هذا العمل خلال الفترة الممتدة من فبراير إلى أبريل و يهدف هذا العمل إلى البحث وتعداد هذه المجموعة من البكتيريا. في الواقع ، تم أخذ 20 عينة ثم تحليلها. أظهرت النتائج أنه من بين 20 عينة 12 منها كانت ملوثة بمعدل أقصاه 1.313×10^9 cfu / g في الكراوية ومعدل لا يقل عن 2.55×10^4 cfu / g في الكمون.

أجريت دراسة المقاومة الحرارية لأبواغ *B.cereus* عند ستة درجات حرارة مختلفة. قيم التدمير الحراري التي تم الحصول عليها هي D95: درجة مئوية بين 9.73 و 27.36 دقيقة ، وقيم D100 درجة مئوية من 5.59 إلى 11.17 دقيقة و D105 درجة مئوية هي 6.001 و 11.04 دقيقة.

فيما يتعلق بالحساسية الحرارية للسلاسل المدروسة أظهرت قيم Zt بين 15.38 درجة مئوية و 32.15 درجة مئوية لسلاسل 3-Mel الأكثر مقاومة وسلالة 6-Fen الأكثر حساسية.

النتائج التي تم الحصول عليها خلال هذه الدراسة يمكن أن تبني أداة خلال دراسة أكبر لتقدير المخاطر المرتبطة باستهلاك *B. cereus* في الأطباق المطبوخة.

الكلمات المفتاحية: التوابل ، *B.cereus* ، الأبواغ ، المقاومة الحرارية ، التدمير الحراري ، الحساسية الحرارية.

Table des matières

Remerciements	II
Dédicace	III
Liste des abréviations	V
Liste des figures	VI
Liste des tableaux	VII
Résumé	VIII
Abstract	IX
Table des matières	XI
Introduction générale	1

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur le groupe *Bacillus cereus* sensu lato et thermorésistance des spores

I. Caractéristiques de <i>Bacillus cereus</i> sensu lato.....	5
I.1. Morphologie de <i>Bacillus cereus</i>	5
I.2. Caractéristiques biochimiques.....	6
I.3. Taxonomie.....	6
I.3.1. Phénétique.....	7
I.3.2. Phylogénétique.....	7
I.4. Sporulation.....	8
I.5. Structure de la spore de <i>Bacillus cereus</i>	9
a. Cœur.....	9
b. Membrane interne.....	10
c. Cortex.....	10
d. Membrane externe.....	10
e. Manteaux.....	10
f. Exosporium.....	10

I.6. Germination.....	10
II. La thermorésistance des spores <i>Bacillus cereus</i>	11
II.1. Facteurs influençant la thermorésistance.....	11
II.1.1. Influence de température.....	12
II.1.2. Influence de pH.....	12
II.1.3. Influence de l'activité d'eau A_w	12
II.2. Paramètres de la thermorésistance.....	12
II.2.1. Paramètre D_t	12
II.2.2. Paramètre Z_t	13
III. <i>Bacillus cereus</i> dans les produits alimentaires.....	14
III.1. Incidence de <i>Bacillus cereus</i> sur différents aliments.....	14
III.2. <i>Bacillus cereus</i> dans les épices.....	14
III.3. Pouvoir toxique de <i>Bacillus cereus</i>	15
III.4. Formes d'intoxication alimentaire.....	15
III.4.1. Forme émétique.....	16
III.4.2. Forme diarrhéique.....	16

Partie 2 : Partie expérimentale

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Description de la région d'échantillonnage.....	20
II.2. Prélèvement des échantillons.....	20
II.3. Recherche des spores <i>Bacillus cereus</i> dans les échantillons.....	21
II.3.1. Isolement des spores <i>Bacillus cereus</i>	21
a. Préparation des échantillons.....	21
b. Dénombrement des colonies <i>Bacillus cereus</i>	22
II.4. Confirmation de l'appartenance au groupe <i>B. cereus</i>	23
II.5. Préparation de stock de spores.....	24
II.6. Etude de la thermorésistance.....	24

II.6.1 Traitement thermique et dénombrement.....	25
II.6.2 Dénombrement des colonies survivantes.....	26
a. Analyse des données de survie des spores thermorésistantes.....	26
 <i>Chapitre III : Résultats et Discussion</i> 	
I. Résultats de la recherche des spores de <i>Bacillus cereus</i> dans les épices	28
II. Résultat de la Confirmation de l'appartenance au groupe <i>Bacillus cereus</i>	30
III. Etude de la thermorésistance des spores <i>Bacillus cereus</i>	30
III.1. Résultat de la cinétique de destruction thermique Dt.....	36
III.2. Sensibilité au traitement thermique Zt.....	37
 <i>Conclusion</i> 	
Références bibliographiques.....	42
Annexes.....	49

Introduction Générale

Introduction générale

Les épices et herbes aromatiques occupent une place prépondérante dans la cuisine traditionnelle algérienne. Ces produits sont d'origine végétale (dérivés de diverses parties anatomiques des plantes), malgré leur faible valeur nutritionnelle, mais ils ont une bonne valeur sensorielle et une profonde influence sur le système digestif. **(Garbowska et al.,2015).**

La plupart de ces produits ayant une faible activités d'eau (<0,85) ils sont stockées dans des conditions sèches après la récolte; cependant, le contact avec l'air et l'augmentation de l'humidité affecte la qualité des épices en augmentant la probabilité de contamination microbienne **(Kim et al .,2012).**

Cependant, des tests de qualité microbienne ont révélé que les épices et les herbes séchés peuvent présenter des niveaux microbiens élevés allant jusqu'à 10^8 (ufc/g). Parmi les micro-organismes détectables *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.* et *Clostridium perfringens* **(McKee, 1995)**. Bien que les levures et les moisissures (par exemple *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* et *Penicillium spp.*) peuvent créer des problèmes graves en raison de leur capacité à produire des aflatoxines **(Flannigan; Hui, 1976; O;Riordan; Wilkinson, 2008; Santin,2005)**. *Bacillus cereus* forment des endospores survivent dans diverses conditions de stress **(Aksu, 1994)**.

Les plats cuisinés sont assaisonnés par les épices et cuits à différentes températures pendant un certain temps, ce procédé permet d'éliminer les formes végétatives, les seules vivants sont les spores, qui résistent à la cuisson grâce à la thermorésistance.

Les spores de *B.cereus* germent lorsqu'elles se trouvent dans des conditions environnementales favorables. Elle provoque deux syndromes d'intoxication alimentaire distincts, caractérisés respectivement par la diarrhée et les vomissements **(Banwart, 1989 ; Cliver, 1990 ; Eley, 1992)**.

Introduction générale

L'objectif de cette étude vise à :

- Déterminer le niveau de contamination par les spores de *B.cereus* dans les épices et les herbes séchées commercialisés dans la commune de Metlili wilaya de Ghardaïa.
- Etudier la thermorésistance de certaines souches appartenant au groupe *Bacillus cereus sensu lato*.

Notre mémoire s'organise comme suit :

- Une première partie synthétise les caractéristiques du groupe *Bacillus cereus* ainsi que leur la thermorésistance.
- Deuxième partie expérimentale, explique la méthodologie de travail suivie par les résultats obtenus avec leurs discussions.
- Enfin une conclusion et perspectives.

*Partie 1 : Synthèse
bibliographique*

Chapitre I :
Généralités sur le
groupe Bacillus cereus
sensu lato

Généralités sur le groupe *Bacillus cereus sensu lato*

I. Caractéristiques de *Bacillus cereus sensu lato*

Bacillus cereus sensu lato (*B. cereus* s.l.), également connu sous le nom de groupe *B. cereus* (Liu et al, 2017). Ce sont des bâtonnets à Gram positif, anaérobies facultatifs et sporulés. En tant qu'organismes ubiquitaires associés au sol, *B. cereus* s. l. se trouvent couramment dans les produits alimentaires où ils peuvent causer la détérioration (Dréan, 2015).

Le groupe *Bacillus cereus* comprend sept espèces étroitement apparentées : *B. cereus sensu stricto* (appelé aussi *B. cereus*), *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus anthracis* et plus récemment *Bacillus cytotoxicus* (Guinebretière, et al. 2013).

La température optimale de croissance est comprise entre 28 et 35°C, la température de croissance minimale est 4-5°C et un maximum de 48°C. *B. cereus* peut croître à des valeurs de pH de 4,9 à 9,3. L'activité de l'eau minimum (A_w) pour la croissance est de 0,93 (Jääskeläinen, 2008; Senesi et Ghelardi, 2010; Bermúdez-Aguirre et al., 2012).

Bacillus cereus peut se développer à des pH variant de 4,3 à 9,3 (Forsythe, 2000), et pour des A_w supérieures à 0,912 (Kramer et Gilbert, 1989).

I.1. Morphologie de *Bacillus cereus*

Les espèces constituant le groupe *Bacillus cereus sensu lato* sont à coloration Gram-positif, formant des bâtonnets de 3 µm de long pour 1 µm de large environ, aérobies ou anaérobies facultatives. (Venkateswaran et al., 2017).

Elles présentent un génome avec un faible pourcentage en bases GC (environ 35 %), avec un génome de 5.3 à 5.9 Mb. Elles produisent des endospores et peuvent être mobiles grâce à une ciliature péritriche. (Venkateswaran et al., 2017).

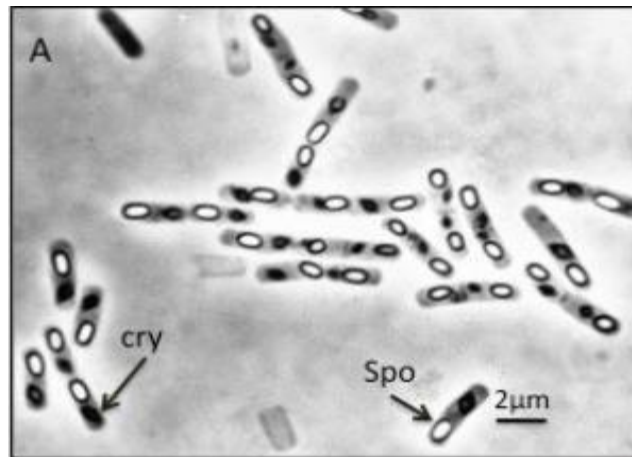


Figure 1: *Bacillus thuringiensis*. Images en microscope de contraste de phase objectifs 100 X. (A) : *B. thuringiensis* phase sporulée (Laurent Consentino, 2019).

I.2. Caractéristiques biochimiques

Les espèces de groupe *Bacillus cereus* sensu lato est caractérisé par la production de plusieurs substances potentiellement pathogènes telles que les hémolysines, les phospholipases C, la toxine causant des vomissements (Cereulide), les entérotoxines (Turnbull et al, 2002). Ainsi que la production de la lécithinase et le catalase, mais pas l'oxydase (Sutra et al.,1998).

I.3. Taxonomie

Selon Euzéby (2002), les bactéries du genre *Bacillus* font partie du :

- Domaine des eubactéries (ou Eubacteria).
- Phylum (ou division) des firmicutes.

Aussi dénommées bactéries à bas G+C % et à coloration positive [Larpent ,2000].

Le genre *Bacillus* est un genre bactérien particulièrement hétérogène. (Dromigny,2008).

La classification moléculaire la plus répandue du groupe *B. cereus* se base sur le séquençage du gène de ménage panC qui code la pantoate-bêta-alanine ligase C (Guinebretière et al., 2008).

I.3.1. Phénétique

Selon **Drobniewski, (1993)** le genre *Bacillus* est réparti en trois grands groupes selon la morphologie de la spore et du sporange.

Tableau 01 : Classification phénétique du genre *Bacillus* **Drobniewski, (1993)**.

Groupes	Caractéristiques	
	Sous-groupe A	Sous-groupe B
Groupe I	<ul style="list-style-type: none"> - Bactéries à grandes cellules - Largeur des cellules supérieure ou égale à 1 µm - Production de spores ellipsoïdes ou cylindriques - Spores centrales ou terminales - Spore qui ne dilate pas les sporanges - Des inclusions protoplasmiques de poly-bêta-hydroxybutyrate (<i>B.anthraxis</i>, <i>B.cereus</i>, <i>B.mycoides</i>, <i>B.thuringiensis</i>, <i>B.pseudomycoïdes</i>.) 	<ul style="list-style-type: none"> - Bactéries à petites cellules (diamètre inférieur à 1µm). - Dépourvues d'inclusions protoplasmiques de polybêta-hydroxybutyrate (<i>B.subtilis</i>, <i>B.pumilus</i>, <i>B.licheniformis</i>, <i>B.firmus</i> ...).
Groupe II	<ul style="list-style-type: none"> - Bacilles sont à coloration de Gram variable - Des sporanges gonflés - Spores ellipsoïdes centrales ou terminales (<i>B.alvei</i>, <i>B.brevis</i>, <i>B.circulans</i>...) 	
Groupe III	<ul style="list-style-type: none"> - Des espèces hétérogènes à coloration de Gram variable - Des sporanges gonflés - Des spores sphériques terminales ou sub-terminales 	

I.3.2. Phylogénétique

Les souches de groupe, *B. cereus* sensu lato se répartissant chacune dans un ou plusieurs groupes. Les sept groupes génétiques possèdent des capacités d'adaptation thermique différentes, des plus psychrotrophes aux plus thermotolérants, et différents Degrés d'association avec des maladies transmises par les aliments.

Le groupe VI est le plus psychrotrophe et n'a encore jamais été associé à des toxi-infections alimentaires. Les groupes II, IV, V sont psychrotrophes à mésophiles et les groupes III et VII sont mésophiles à thermotolérants. (Anses, 2016)

Tableau 2 : Groupes phylogénétiques de *B. cereus sensu lato* (Anses, 2016).

Groupes phylogénétiques	Dénomination
I	<i>B.pseudomycoïdes</i>
II	<i>B. thuringiensis</i> ou <i>B. cereus</i>
III	<i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> ou <i>B. anthracis</i>
IV	<i>B. thuringiensis</i> ou <i>B. cereus</i>
V	<i>B. thuringiensis</i> ou <i>B. cereus</i>
VI	<i>B. weihenstephanensis</i> , <i>B. mycoïdes</i> ou <i>B. thuringiensis</i>
VII	<i>B. cytotoxicus</i>

I.4. Sporulation

La spore qui prend naissance à l'intérieur même de la cellule végétative est une cellule nouvelle et différent du point de vue structure, composition chimique et enzymatique. Le phénomène de sporulation est déclenché par l'épuisement des ressources nutritives dans un contexte physico-chimique qui peut être variable suivant les espèces (Leclerc et al, 1995).

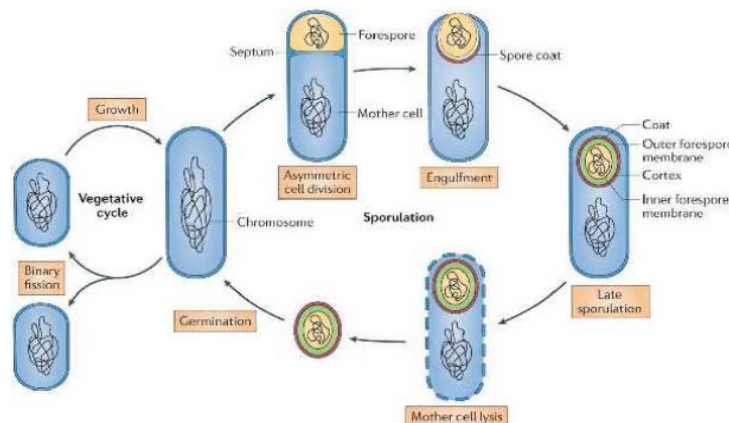


Figure 02 : Cycle de sporulation et germination de *Bacillus subtilis* (McKenney et al, 2013).

I.5. Structure de la spore de *Bacillus cereus*

Les spores des espèces de *Bacillus* sont dormantes et extrêmement résistantes à de nombreux stress environnementaux, notamment la chaleur, la dessiccation, les radiations et une variété de produits chimiques toxiques. En conséquence, les spores peuvent survivre pendant des périodes extrêmement longues, certainement des centaines d'années et peut-être beaucoup plus longtemps (Stelow et al, 2006).

En générale, les spores de *Bacillus* ont une forme ovale a sphérique, varie cylindrique elles sont terminales ou non, mesurant en moyenne 1 μm à 2 μm (Dromigy, 2008).

La spore se compose de l'extérieur vers l'intérieur d'un: exosporium, des tunique interne, externe, d'une membrane externe, d'un cortex, d'une membrane interne et d'un cœur (Abbas;2014).

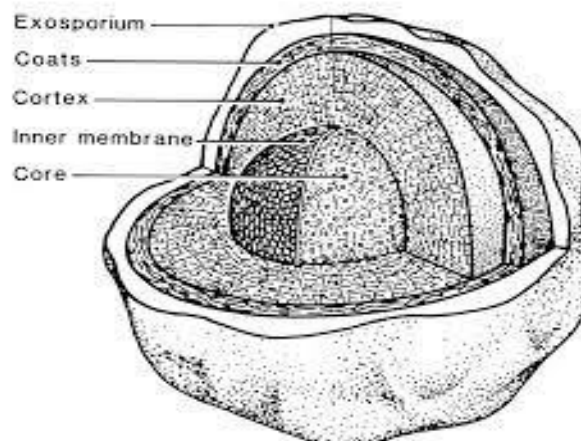


Figure 03: Schematic representation of the internal structure of a bacterial spore (Reproduced from Foster and Johnstone, 1990).

a. Cœur

Le cœur contient le cytoplasme de la spore avec les composants cellulaires réguliers, tels que les protéines cytoplasmiques, les ribosomes et l'ADN. (Setlow ,2006). Accompagnée par l'acide dipicolinique (DPA) qui est essentiel à la résistance de la spore. (Te Giffel ,1997).

b. Membrane interne

Le noyau de la spore est entouré par la membrane interne. La membrane interne devient la membrane cytoplasmique de la cellule végétative naissante lors de la germination. (Cowan et al., 2004).

c. Cortex

Le cortex est composé de peptidoglycane (Popham 2002). Il est essentiel pour la formation d'une spore dormante et pour la réduction de la teneur en eau du noyau de la spore, (Setlow ,2003).

d. Membrane externe

La fonction précise de la membrane externe qui se trouve sous les couches de spores n'est pas claire, bien que cette membrane soit une structure essentielle dans la formation des spores (Piggot et Hilbert 2004).

e. Manteaux

Le manteau des spores est composée de plusieurs couches (Driks 1999, 2002b; Lai et al. 2003). De plus, le manteau est impliqué dans la résistance aux rayonnements UV environnementaux (Riesenman et Nicholson, 2000).

f. Exosporium

La couche de spores est entourée d'une structure lâche semblable à une membrane appelée exosporium. est important pour l'hydrophobicité et l'adhérence des spores propriétés (Faille et al., 2002 ; Koshikawa et al., 1989).

I.6.Germination

La germination comprend 2 phases:

- ✓ La germination proprement dite, pendant laquelle la spore se réhydrate (elle perd alors sa thermo-résistance) et remet en fonction la machinerie des synthèses des acides nucléiques et protéines ;
- ✓ L'émergence de la cellule hors de l'enveloppe de la spore, et la croissance de la cellule jusqu'au stade de la première division (Couvert, 2000).

II. La thermorésistante des spores *Bacillus cereus*

La thermorésistance de la spore est une de ses principales propriétés, elle varie selon les espèces et peut dans certain cas, permettre la survie après 10 min à 120⁰C, une forte thermorésistance de la spore et souvent corrélée à la thermophilie de la forme végétative. Les spores sont également plus résistantes aux radiations, au pH, aux rayonnements et d'autres facteurs environnementaux. (**Sagripanti et al, 2006 ; Henriques et moran, 2007**).

La thermorésistance des spores est élevée dans les produits à faible activité d'eau (Aw) et aussi au procédé de stérilisation à la chaleur sèche qu'à la chaleur humide (**Jenson et Moir., 2003**).

La résistance aux fortes températures serait due à trois facteurs principaux, la déshydratation du protoplaste, la minéralisation et l'adaptation thermique (**Cazemier et al, 2001**). En effet, le fait d'élever la température de sporulation accentuait la déshydratation du protoplaste, ce qui avait pour conséquence une très nette augmentation de la thermorésistance (**Beaman et Gerhardt, 1986**).

L'acquisition de la thermorésistance est réalisée via l'accumulation de plusieurs composés en quantités très importantes dans le cortex, les principaux étant l'acide dipicolinique (DPA) et des cations divalents, essentiellement du calcium Ca²⁺. En 1960, **Hashimoto et al**. Remarquent déjà que la résistance est fortement liée à la quantité d'acide dipicolinique présent, il en va de même pour la réfringence. La teneur en acide dipicolinique est telle, jusqu'à 15 % de la masse de la spore, qu'elle dépasse le seuil de solubilité, le composé se trouve alors sous forme cristalline (**Leuschner et Lillford, 2001**), ainsi que les protéines SASP protègent les spores en protégeant l'ADN (**Setlow and Setlow, 1994**)

II.1. Facteurs influençant la thermorésistance

Divers facteurs peuvent fortement influencer la thermo-résistance des spores. Pendant de nombreuses décennies, seule la température était prise en compte dans le calcul des barèmes de pasteurisation et de stérilisation.

La tendance actuelle est l'intégration de nouveaux facteurs environnementaux jouant également un rôle prépondérant tels que le pH et l'activité de l'eau. (**Merzougui et al.,2013**).

II.1.1. Influence de température

L'effet de la température sur la résistance des spores de plusieurs souches de *Bacillus* à la chaleur a fait l'objet de nombreux travaux (**Baweja et al., 2008; Carlin, 2011; Nguyen Thi Minh et al., 2011; Planchon et al., 2011**). Ces travaux ont montré que les spores produites à hautes températures étaient plus résistantes aux traitements par la chaleur que celles produites à basses températures. Chez *B.subtilis*, les études montrent que l'augmentation de la température de sporulation dans une gamme comprenant trois températures différentes (30 °C, 37 °C et 44 °C) augmente la résistance des spores à la chaleur (**Igura et al., 2003**).

Dans une étude menée par **Melly et al., 2002**, il a été montré que chez *B. subtilis*, l'augmentation de la température conduisait à une diminution de la teneur en eau du cœur de la spore. La teneur du DPA dans les spores de *B. cereus* et de *B. anthracis* augmente avec la hausse de la température (**Baweja et al., 2008; Planchon et al., 2011**).

II.1.2. Influence de pH

Le pH est connu pour avoir une forte influence sur la résistance thermique des microorganismes. Un pH acide (pH = 4) du milieu lors du traitement peut provoquer une résistance thermique plus faible de spores, comparé à un pH neutre. Les spores de *B. cereus* ATCC 4342 ont montré une résistance plus faible lorsque le pH de sporulation était de 5.5, par rapport à un pH égal à 7 (**Merzouguiet al., 2013**).

II.1.3. Influence de l'activité d'eau Aw

L'activité de l'eau (aw) est tout comme le pH, un élément essentiel dans la détermination de la thermo-résistance des microorganismes. A l'inverse d'un pH bas, qui favorise la destruction thermique, une faible aw lors du traitement provoquera une augmentation de la résistance à la chaleur. En revanche, une faible activité de l'eau (<0,98) du milieu de récupération a montré une inhibition de la germination et de la croissance de spores de *B. cereus* (**Martinez et al., 2007**).

II.2. Paramètres de la thermorésistance

II.2.1. Paramètre Dt

La destruction thermique des spores en fonction de la durée de traitement à une température donnée peut être modélisée. Le modèle déterministe qui définit la durée de réduction décimale, symbolisée D, est l'un des plus courants. Cette durée correspond au

temps nécessaire (en minutes) pour réduire la population d'un facteur 10, à une température donnée (**Katzin et al., 1943**). La cinétique de destruction des microorganismes est, dans la grande majorité des cas, décrite par l'équation suivante :

$$\text{Équation01 : } \text{Log N} = \text{LogN0} - \frac{t}{d}$$

Avec

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

II.2.2. Paramètre Zt

Un autre paramètre, appelé paramètre de thermorésistance ou facteur d'activation thermique et noté Z, correspond à la variation de la température de traitement qui conduit à la modification d'un facteur 10 la durée de réduction décimale D (**Bigelow, 1921**).

Un grand nombre de modèles non linéaires est disponible pour ajuster les courbes de destruction présentant différentes allures : un épaulement initial, un effet de traîne, une allure sigmoïde (avec épaulement et traîne), une convexité ou concavité, une allure biphasique par exemple (**Mafart et al., 2010**).

Ces modèles peuvent décrire chacune des allures précédemment citées via l'utilisation d'équations permettant une modélisation généralement satisfaisante de cinétique d'inactivation d'allures différentes (**Geeraerd et al., 2000; Geeraerd et al., 2005**).

$$\text{Equation 02 : } \text{Log}\delta = \text{Log}\delta' - \frac{T-T'}{Zt}$$

Z correspond à l'élévation de la température qui permet de diviser la valeur de D par 10

- T : Température étudiée.
- T': Température de référence notée 121.1°C.
- D' : la durée de traitement thermique à la température de référence 121.1°C permettant une réduction décimale de la population microbienne.

III. *Bacillus cereus* dans les produits alimentaires

Les spores *B. cereus* sont présentes à des niveaux variables dans toutes les catégories d'aliments, des produits secs ou déshydratés, tels que les épices, les herbes aromatiques, certains légumes, les céréales et les farines. Ces matières premières entrant dans la composition d'un produit fini, sont des sources potentielles de contamination (Anses.,2016).

III.1. Incidence de *Bacillus cereus* sur différents aliments

Les altérations d'aliment causées par *Bacillus* sont principalement des défauts organoleptiques telles que des saveurs désagréables : notes rances, fruitées, levurées, amères (Meer et al.,1991). Ces altérations sont dues à la production d'acide et/ou d'enzyme (telles que des lipases et protéases) et d'autres composés indésirables (Burgess et al., 2010).

Les spores de *B. cereus* ont une grande capacité d'adhésion aux surfaces des équipements, et être ainsi à l'origine de la formation de biofilms (Andersson et al. 1995). Ces biofilms, difficiles à éliminer par les traitements de nettoyage, peuvent à leur tour produire des spores.

Les risques pour le consommateur sont le plus souvent liés à une multiplication de *B.cereus* lors de l'exposition des aliments à des températures inappropriées.

III.2. *Bacillus cereus* dans les épices

Les épices et les herbes sont dérivées de différentes parties anatomiques des plantes, telles que les feuilles, les racines et les tiges. Bien que leur valeur nutritionnelle ait diminué, ils possèdent une bonne valeur sensorielle et ont un effet profond sur le tube digestif. (Garbowska, Pluta et Rozanska, 2015; Yan, Meng et Kim, 2012).

Les épices et les herbes sont souvent cultivées dans des zones chaudes et humides, stockées dans des conditions sèches, parce que leur exposition à l'air et à l'humidité affecte leur qualité et peut être exposée à des dommages microbiens (Kim, Sagong, Choi, Ryu & Kang,2012).

Les épices contiennent divers micro-organismes, Y compris les bactéries sporulées qui peuvent vivre dans les endroits secs. Parmi les micro-organismes les plus résistants au dessèchement est les spores de *B. cereus*, qui produit une gamme de toxines ce qui augmente les risques pour la santé (Ainiza, Jinap, & Sanny, 2015; Schaarschmidt et al., 2016; Witkowska, Hickey, Alonso-Gomez, & Wilkinson, 2011).

III.3. Pouvoir toxique de *Bacillus cereus*

B. Cereus peut produire de nombreuses toxines (tableau2). En dehors des entérotoxines, d'autres toxines jouent un rôle dans le développement d'infections locales ou systémiques :

Tableau 03 : Les toxines de *B. cereus*. qui jouent un rôle dans le développement d'infections locales ou systémiques (**R. Teyssou.,et al 1998**).

Dénomination	Activités toxiques majeures
Hémolysine (céréolysine)	Toxine cytolytique thiol-dépendante. Activité cytotoxique et cardiotoxique létale chez la souris. Inactivée par le cholestérol
Hémolysine II	Hémolysine thermolabile. Rôle in vivo non défini. Non inactivée par le cholestérol
Phospholipase C	Phospholipase cytolytique. Relargage des enzymes lysosomiales des polynucléaires neutrophiles. Rôle dans la pathogénie des lésions oculaires.
Entérotoxine	Trois composants : B, L1 et L 2. Activité hémolytique, cytotoxique et dermonécrotique. Augmentation de la perméabilité vasculaire.
Toxine émétisante	Toxine thermostable. Inhibition du cycle d'oxydation mitochondrial des acides gras in vivo et in vitro. Effet émétisant aboli par la vagotomie et par les antagonistes des récepteurs de la sérotonine

De plus, il provoque deux types de de maladies gastro-intestinales, à savoir les syndromes diarrhéiques et émétiques, qui résultent de la production de diverses toxines (**Blakey et Priest, 1980; Ehling-Schulz et coll., 2004**).

III.4. Formes d'intoxication alimentaire

Bacillus cereus est un pathogène opportuniste émergent, fréquemment associé à des toxi-infections alimentaires. Les symptômes provoqués par *Bacillus cereus* lors décontaminations alimentaires sont généralement ceux d'une gastro-entérite (**Granum,1994**) due à la production de toxines émétique (céréulide) et diarrhéiques (entérotoxine).

III.4.1. Forme émétique

L'intoxication émétique se déclenche rapidement 1 à 5 heures après ingestion des aliments contaminés indiquant que la toxine est produites dans l'aliment, la production de la toxine responsable des symptômes émétiques, la céréulide, est restreinte a seulement quelques souches de *B.cereus* mésophiles très proches les unes des autres (**Altayar et Sutherland,2006 ; Ehling-Schulz et al., 2005**).La dose de céréulide suffisante pour provoquer des symptômes émétiques serait de l'ordre de 5 à 10 µg/kg de masse corporelle (**Anses, 2016**).

La céréulide est un petit polypeptide cyclique thermostable, liés par des liaisons peptidiques ou esters (**Agata et al., 1994**). Grâce à sa structure, la céréulide n'est pas affecté par les températures élevées (121°C pendant 15 min), le pH acide jusqu'à pH 2, et les protéases intestinales comme la trypsine et la pepsine (**Shinagawa et al.,1996**).

La céréulide induit l'apoptose de plusieurs types cellulaires (**Jääskeläinen et al., 2003; Virtanen et al.,2008**), en particulier les cellules hépatiques (**Yokoyama et al., 1999**) et les cellules NK de la réponse immunitaire (**Paananen et al., 2002**).

III.4.2. Forme diarrhéique

Dans le cas d'une intoxication diarrhéique, les symptômes surviennent plus tardivement, 8 à 16 heures après ingestion de l'aliment contaminé, indiquant que les entérotoxines sont produites dans l'intestin après l'ingestion des bactéries ou des spores (**Altayar et Sutherland, 2006 ; Ehling-Schulz et al., 2005**). La maladie diarrhéique est caractérisée par des douleurs abdominales et la diarrhée (**Sim, 1998; Beattie et Williams,2000;Granum, 2007**).

Le syndrome diarrhéique provoquée par *B. cereus* est médiée par une ou les trois entérotoxines diarrhéiques: les toxines tripartites hémolysine BL (Hbl) et entérotoxine non hémolytiques (Nhe), les deux formes de cytotoxine K (cytK-1 et cytK-2) (**Fagerlund et al., 2004**).

Les toxi-infections diarrhéiques à *B. cereus* sont le plus souvent associées à une consommation d'aliments contenant au moins 10⁵ ufc/g. Toutes les souches de *B. cereus* n'ont pas la même capacité à provoquer des symptômes diarrhéiques (**Anses, 2016**).

Tableau 4 : Caractéristiques des maladies à symptômes émétiques et à symptômes diarrhéiques (Anses, 2016).

Durée moyenne d'incubation	Principaux symptômes	Complications
Maladies à symptômes émétiques		
30 min à 5 h	<ul style="list-style-type: none"> - Nausées - Vomissements - Malaises - Diarrhées et douleurs abdominales occasionnelles 	Activité toxique sur plusieurs types de cellules humaines et peut provoquer une dégénérescence, toutefois réversible, du foie.
Maladies à symptômes diarrhéiques		
6 à 24 h	<ul style="list-style-type: none"> - Diarrhées aqueuses - Douleurs abdominales - Nausées occasionnelles 	Les complications des maladies à symptômes diarrhéiques sont exceptionnelles

***Partie2 : Etude
Expérimentale***

Chapitre II:
Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de Microbiologie, Département de Biologie, Université Ammar Al-Telidji, Laghouat

II.1. Description de la région d'échantillonnage

La Wilaya de Ghardaïa se situe au centre de la partie Nord du Sahara algérien. A environ 600 Km au sud de la capitale du pays, Alger. Elle couvre une superficie de 86.560 km². Ses coordonnées géographiques sont : **(D.P.A.T., 2009)**.

- Altitude 480 m.
- Latitude 32° 30' Nord.
- Longitude 3° 45' Est.

II.2. Prélèvement des échantillons

20 échantillons d'épices et des herbes séchés ont été prélevés à partir de deux endroits différents dans la commune de Metlili, wilaya de Ghardaïa.

Les épices utilisées dans cette étude proviennent du marché international égyptien et indien. Les échantillons ont été pesés dans des pots stériles (chaque pot contient 20 g) dans les mêmes conditions de vente au client puis transférés au laboratoire pour analyse.



Figure 04 : Echantillons d'épices pesées dans des pots stériles.

Tableau 05 : Nombre d'échantillons d'épice prélevés.

Epices	Nombre d'échantillons
Gingembre زنجبيل	02
Cumin كمون	02
Curcuma كركم	02
Carvi كروية	02
Poivron noir	02
Poivron rouge	02
Mélange راس الحانوت	01
Coriandre كسبرة	01
Cannelle قرفة	01
Fenouil بسباس	01
Fenugrec حلبة	01
Srayar (herbes du désert séchées)	01
Keri de poulet	01
Shaybah cheikh (<i>Artemisia absinthium</i>)	01

II.3. Recherche des spores *Bacillus cereus* dans les échantillons

II.3.1. Isolement des spores *Bacillus cereus*

a. Préparation des échantillons

Les échantillons d'épices ont été ouvert dans une zone stérile (bec bunsen).a l'aide d'une spatule stérile une quantité de 10 g d'épices a été pesé et mélange avec 90 ml d'eau peptone tamponnée .Le mélange était ensuite porté au bain marie a 80⁰C pendant 10 min, suivi de refroidissement dans l'eau glacée. Ce traitement permet d'éliminer la flore végétative présente dans les échantillons.

Des dilutions décimales successives étaient alors réalisées dans l'eau peptone à partir des mélanges traités thermiquement. Une série de dilutions allant à 10^{-3} est effectuée.

La recherche des spores a été réalisée par étalement de chaque dilution sur le milieu Mossel complet (**voir annexe 01**) c'est un milieu sélectif utilisé pour la recherche et le dénombrement de *Bacillus cereus* dans les produits alimentaires (**ISO 7932**). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 h.

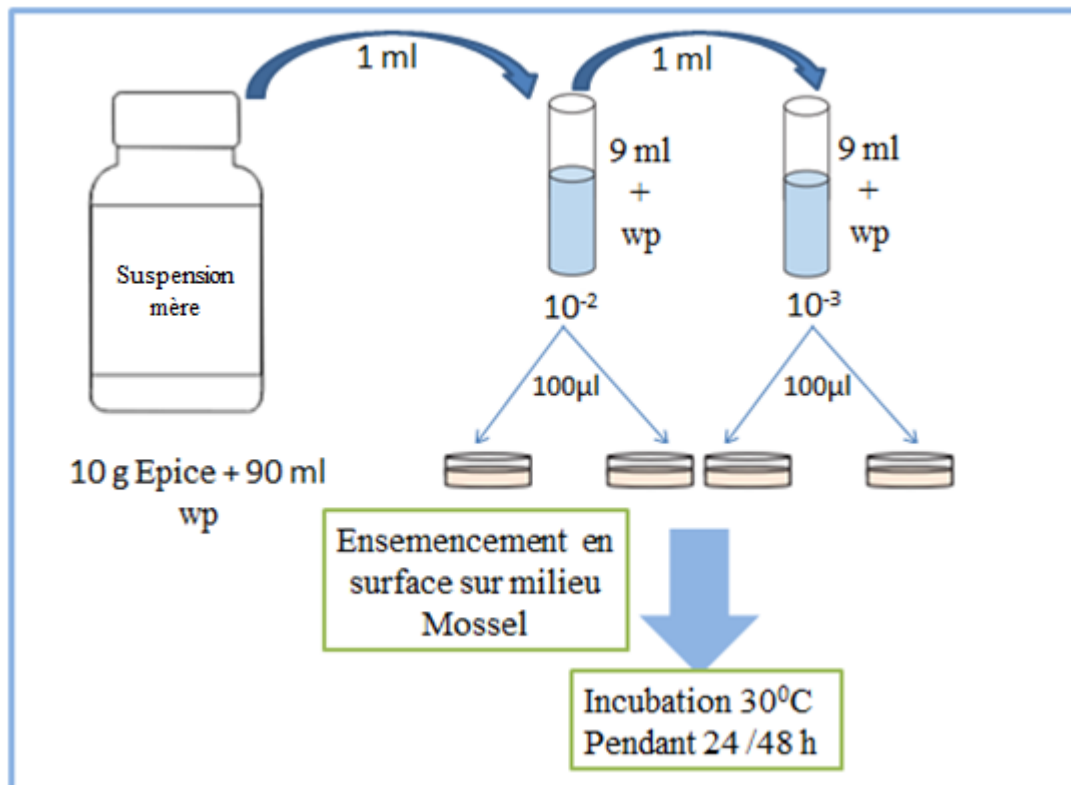


Figure 05 : Préparation des dilutions décimales et d'ensemencement sur milieu Mossel.

b. Dénombrement des cellules *Bacillus cereus*

Le dénombrement de *Bacillus cereus* a été effectué suivant la méthode préconisée par la norme **ISO 7932 (2005)**. Elle consiste à dénombrer les cellules de *Bacillus cereus* présomptifs à 30°C . En se basant sur l'ensemencement des échantillons sur la gélose sélective Mossel complète (additionné de jaune d'œuf et de la polymyxine B).

Les colonies des *Bacillus cereus* sont caractérisées par une couleur rose dû à l'absence d'utilisation de mannitol (mannitol -) entourée d'un halo blanc dû à la dégradation de la lécithine de jaune d'œuf (lécithinase positif + la résistance à la polymyxine B).

Le résultat est rapporté en UFC/g à l'aide de l'équation de **la norme AFNOR (1994)**:

$$N = \frac{\sum C}{V(n1+0,1n2)d}$$

Où:

N: Nombre d'UFC/g

C: Somme des colonies comptées sur les boîtes retenues de deux dilutions successives.

V : Volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte en ml.

n1: Nombre des boîtes retenues à la première dilution.

n2: Nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution.

d: Taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

II.4. Ensemencement de la galerie API 50 CHB

API 50 CHB est un système standardisé constituée de 50 microtubes permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone des micro-organismes .La spore (souche 10-PN) est mis en suspension dans le milieu CHB puis inoculé dans chaque tube de la galerie jusqu'à la moitié le reste des tubes sont rempli avec l'huile de paraffine. La galerie est incubée à 30⁰C pendant 24.



Figure 06 : Ensemencement de la galerie API50 CH.

II.5.Préparation de stock de spores

Pour la constitution du stock de spores, le protocole utilisé a été inspiré de celui utilisé par **(Gaillard et al.,1998)** . Tout d’abord, les cellules ont été pré-cultivées à 37 ° C pendant 24 h dans BHIB (Bouillon cœur-cervele).

Un volume de 0,5 ml de la pré-culture a été étalé sur la surface de gélose nutritive additionnée de 40 mg/L de MnSO₄ et 100 mg/L de CaCl₂ en boites de Pétri. ces boitesensemencées ont ensuite été incubées à 30°C pendant 4 jours jusqu’à ce que la production maximale de spores soit obtenue **(Baril et al., 2012)**.

Les spores ont ensuite été recueillies en grattant la surface de la gélose et mises en suspension dans 20 ml d'eau distillée stérile. La suspension de spores a été lavée trois fois avec de l'eau distillée stérile suivie d'une étape de centrifugation à 10 000 g pendant 15 min. Le culot lavé a été mis en suspension dans de l'eau/éthanol (1V/1V) à 4 C° pendant 12 h afin d'éliminer la forme végétative. Les spores ont été récoltées par centrifugation à 10 000 g puis lavées trois fois. Le culot final a été mis en suspension dans un volume minimal d'eau distillée stérile pour obtenir 1010 spores par millilitre.

Le stock des spores de *Bacillus cereus* obtenu était conservé à 4°C dans de l'eau distillée stérile pendant deux mois avant le traitement thermique **(Ziane et al.,2014)**.

II.6.Etude de la thermorésistance

Les souches que nous avons utilisées pour l'étude de la thermorésistance, a été isolées et stockées depuis l’année (2021). Parmi ces souches nous avons choisi 10 souches décrites dans le tableau suivant **(tableau06)**

II.6.1 Traitement thermique et dénombrement

La thermorésistance des 10 souches a été réalisée dans des tubes à essais à 6 températures et 4 durées différentes (**tableau07**).

Tableau 07 : Barème du traitement thermique.

Durée Température	85C°	90C°	95C°	100C°	105C°	110C°
3min					*	*
5min	*	*	*	*	*	*
10min	*	*	*	*	*	*
15min					*	*
20min	*	*	*	*		
30min	*	*	*	*		

Un volume de stock sporales (100µl) est dilué dans un tube contient 5ml de BHIB (matrice alimentaire) considéré comme solution mère. 1 ml de cette solution est dilué dans 4 tubes contient 5 ml de BHIB, les tubes était porté au bain marie thermostaté a la température étudié (85C°,90C°,95C°,100C°), après le traitement ils sont récupérés à des intervalles de temps (10 min, 15 min, 20 min, 30min). Le traitement à 100°C et 110°C a été effectué de la même manière mais dans un bain d'huile. Un tube t0 de chaque souche était dénombré sans traitement thermique. Correspondant à N0 la population initiale.

Après avoir retiré les tubes et laissé refroidir, une série de dilutions décimales successives à WP étaient réalisées jusqu'à 10⁻⁵.

Le dénombrement des bactéries survivantes était effectué dans la gélose nutritive (annexe 01). Un volume de 1 ml de dilution 10⁻⁴ et 10⁻⁵ étaitensemencé en masse dans milieu GN puis incubée à 37°C pendant 24h.

II.6.2 Dénombrement des cellules survivantes

La charge en *Bacillus cereus* des échantillons était déterminée suivant la formule de la norme **AFNOR (1994)**

Chapitre III :
Résultats et discussion

I. Résultats de la recherche des spores de *Bacillus cereus* dans les épices

Après l'incubation des souches a 30⁰C pendant 24h à 48h, les colonies de *Bacillus cereus* apparues en couleur rose entouré d'un halo blanc (production de la lécithinase) et de différentes tailles (**figure07**).



Figure 07 : Observation macroscopique des colonies *Bacillus cereus* sur la gélose Mossel complète.

L'obtention des colonies roses indique l'absence de fermentation du mannitol et l'apparition d'un halo opaque autour de chacune des colonies obtenues montre que les lécithines ont été hydrolysées par la lécithinase.

La recherche des spores de *Bacillus cereus* dans les 20 échantillons d'épices a montré les résultats suivant :

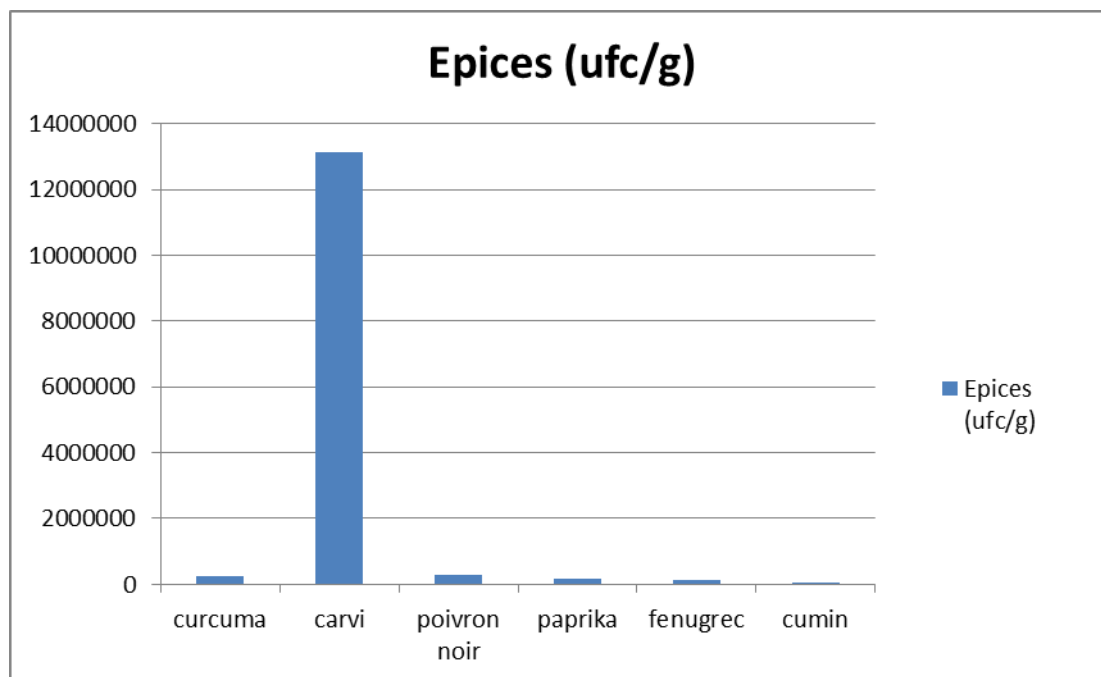


Figure 08 : Diagramme représentant les niveaux de contamination des épices par les spores de *Bacillus cereus*.

L'analyse de 20 échantillons d'épices a montré que les échantillons les plus contaminés sont **Carvi, Paprika, Mélange, Cannelle, Fenouil, Poivron noir, Curcuma, Fenugrec** tandis que le **Cumin** a été le moins contaminé, avec un résultat négatif pour les échantillons du **Gingembre, Coriandre, Srayar, Keri, Shaybah cheikh**.

Aksu et al (2000) ont montré que les niveaux de contamination par *Bacillus cereus* les plus élevés ont été obtenus à partir de Paprika, Poivron noir, Cumin. Les échantillons de Coriandre et de Gingembre avaient les niveaux de contamination les plus bas.

D'après Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 publié sur le JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 39 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires. Le seuil de contamination d'épices et d'herbes séchées par les cellules de *Bacillus cereus* est limité par 10^4 UFC/g. nos résultats ont montrés que le Curcuma, Carvi, Poivron noir, Paprika, Fenugrec, Cumin atteints des valeurs de $2,53 \times 10^5$ ufc/g ; $1,31 \times 10^9$ ufc/g ; $2,81 \times 10^5$ ufc/g ; $1,90 \times 10^5$ ufc/g ; $1,15 \times 10^5$ ufc/g ; $2,55 \times 10^4$ ufc/g respectivement, ces résultats dépassent le seuil de contamination.

Les travaux de **Kneifel et al (1994)** ont montré que les échantillons du gingembre et du curry avaient un nombre de *Bacillus cereus* aussi élevé que 10^5 ufc/g.

Ces valeurs par rapport aux autres études, semblaient être dues à la composition chimique des épices (Sucheela ; 2007), ainsi que les conditions de cultures, de production et de transformation des épices (Kneifel et Berger ; 1993).

II. Résultat de la galerie API 50 CHB

Pour une identification par une galerie API 50 une acidification produite par la souche à identifier est recherché, ce qui se traduit par le virage de couleur dans le tube. Après incubation de la plaque à 30°C pendant 24h la souche 10-PN a montré les résultats suivants :



Figure 09 : la galerie API 50

La comparaison de ces résultats par rapport à celles donnés par le fournisseur confirme l'appartenance de cette souche au groupe *B.cereus*.

III. Etude de la thermorésistance des spores *Bacillus cereus*

Après incubation à 37°C pendant 24H, les cellules de *Bacillus cereus* apparaissent dans la GN comme suit :

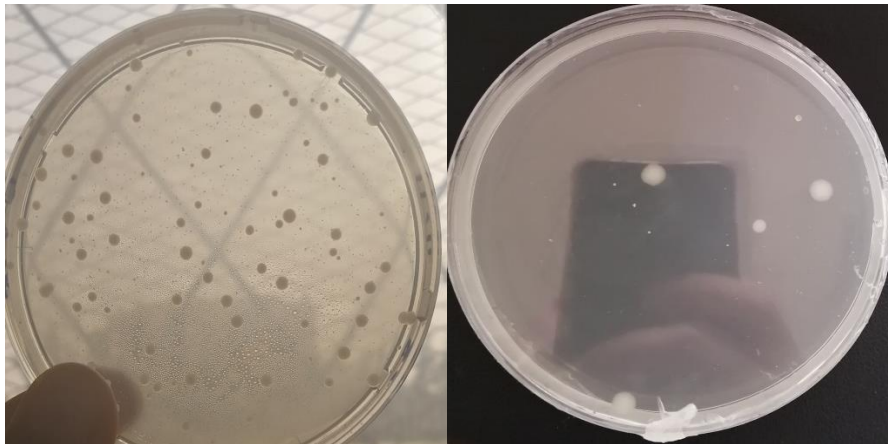


Figure 10 : colonies de *B.cereus* sur GN après traitement thermique.

III.1. Résultat de la cinétique de destruction thermique DT

La thermorésistance a été étudiée sur dix souches à différentes températures 85°C, 90°C, 95°C, 100°C, 105°C 110°C. Les meilleurs résultats ont été retenus pour être traité par le modèle de **Mafart et al., (2002)** Les figures 11, 12, 13, 14,15 montrent les cinétiques de destructions des souches choisies après traitement thermique selon le barème précédemment décrit :

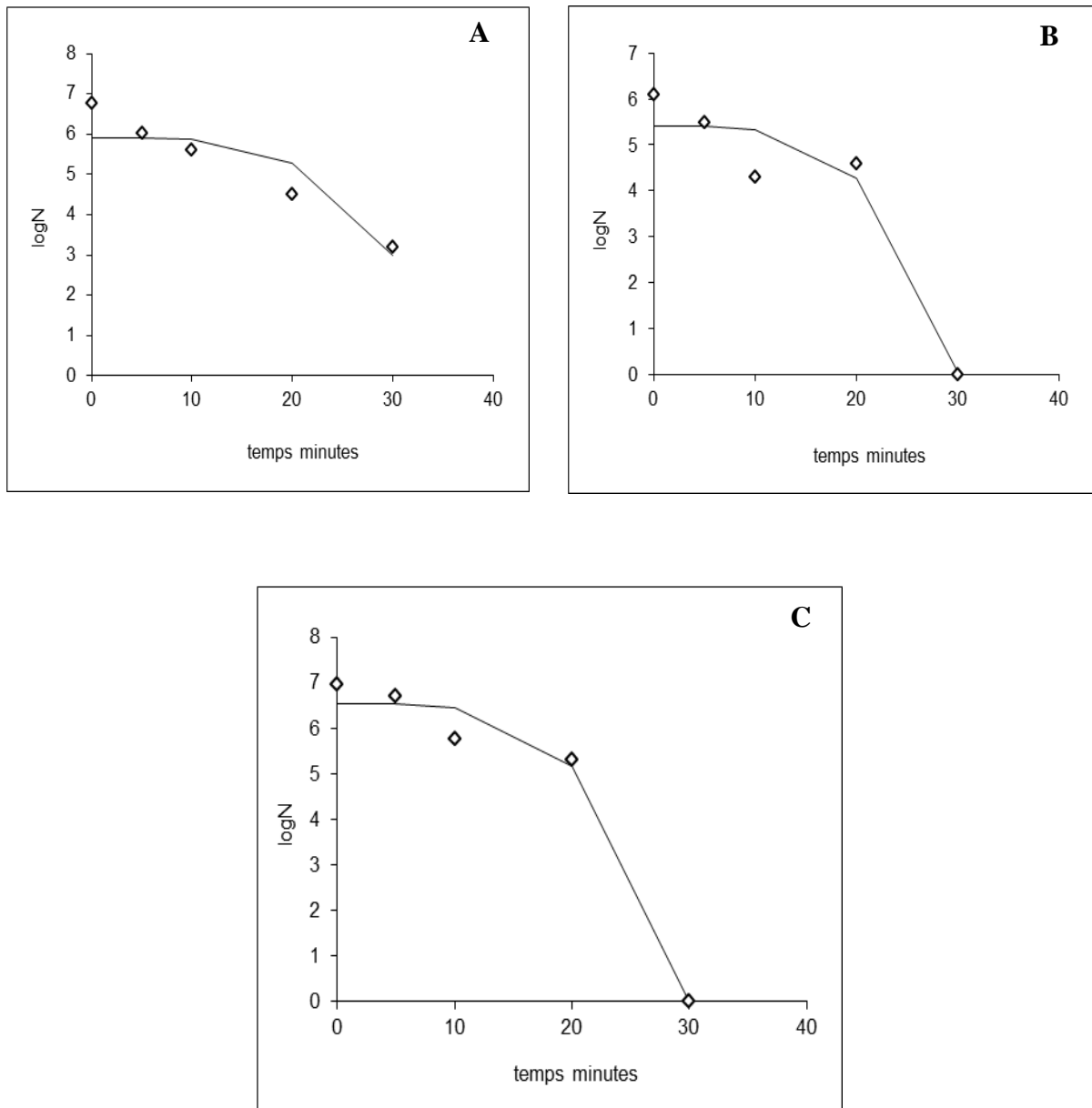


Figure 11 : Cinétique de destruction de la souche1-CUR, A(90°C), B(95°C),C(100°C).

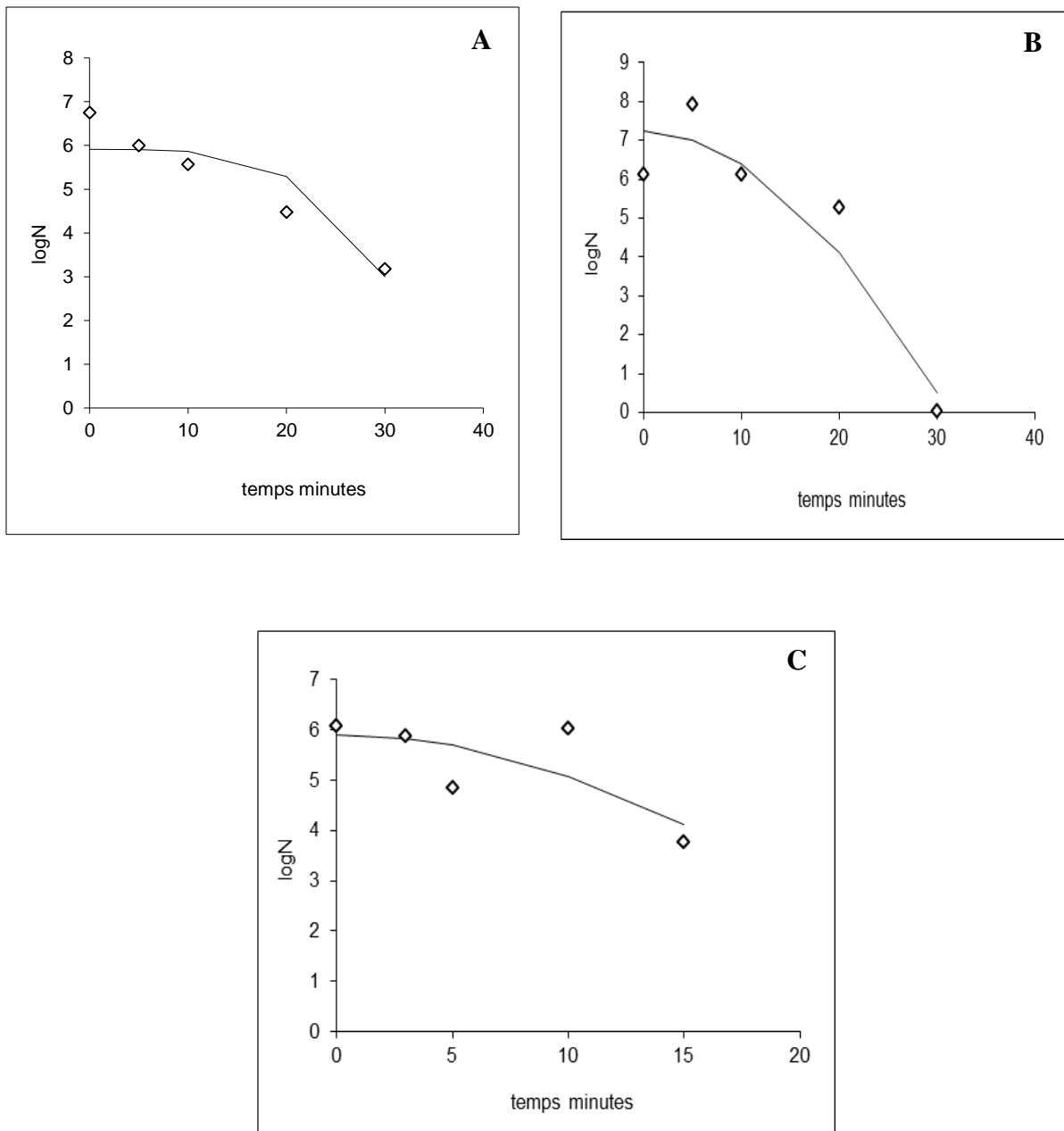


Figure 12 : Cinétique de destruction de la souche 2-Gin, A(95°C), B(100°C), C(105°C).

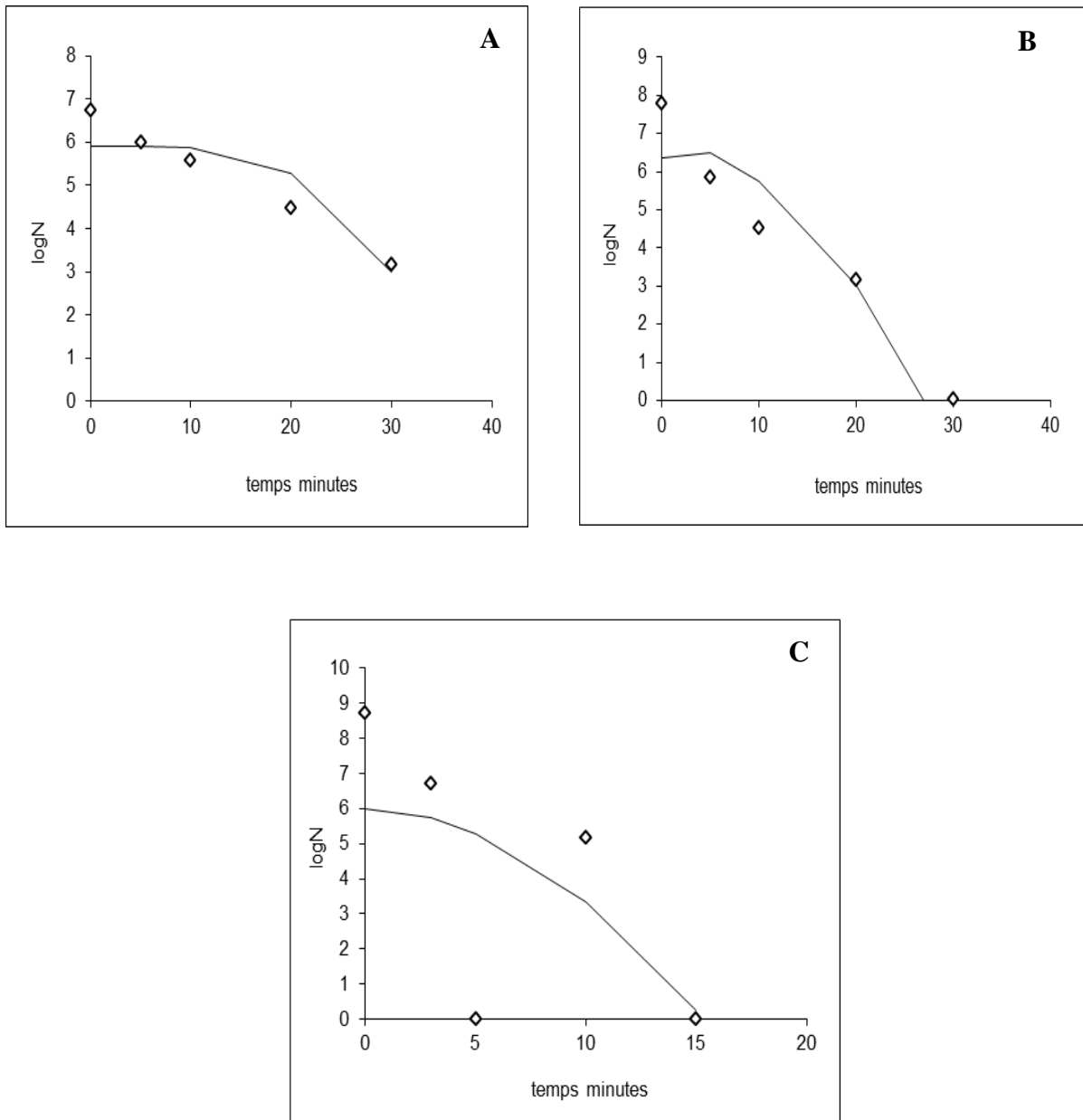


Figure 13 : Cinétique de destruction de la souche3-Mél, A(95°C), B(100°C), C(110°C).

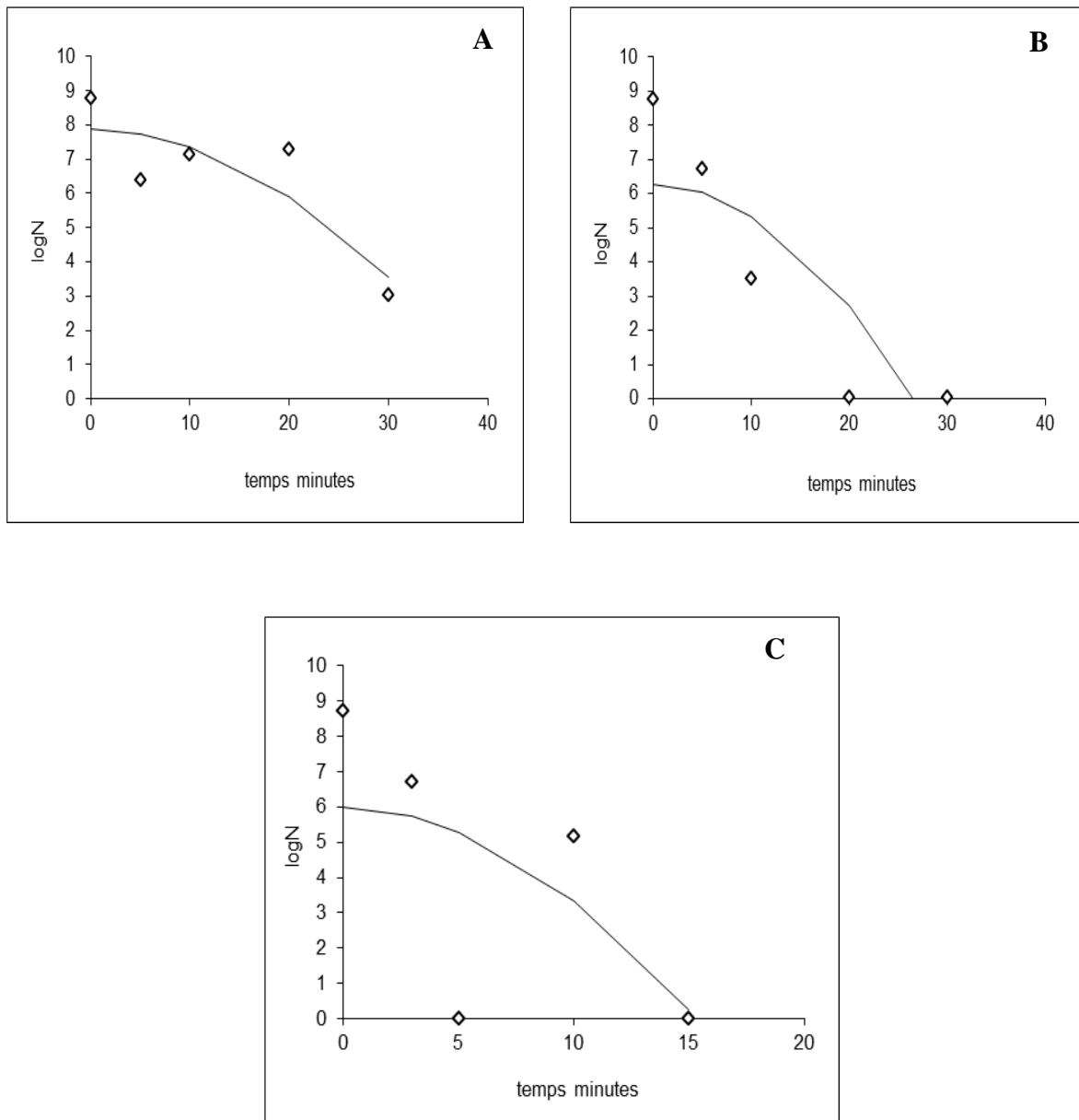


Figure 14 : Cinétique de destruction de la souche 4-Cum, A(95°C), B(100°C),C(105°C).

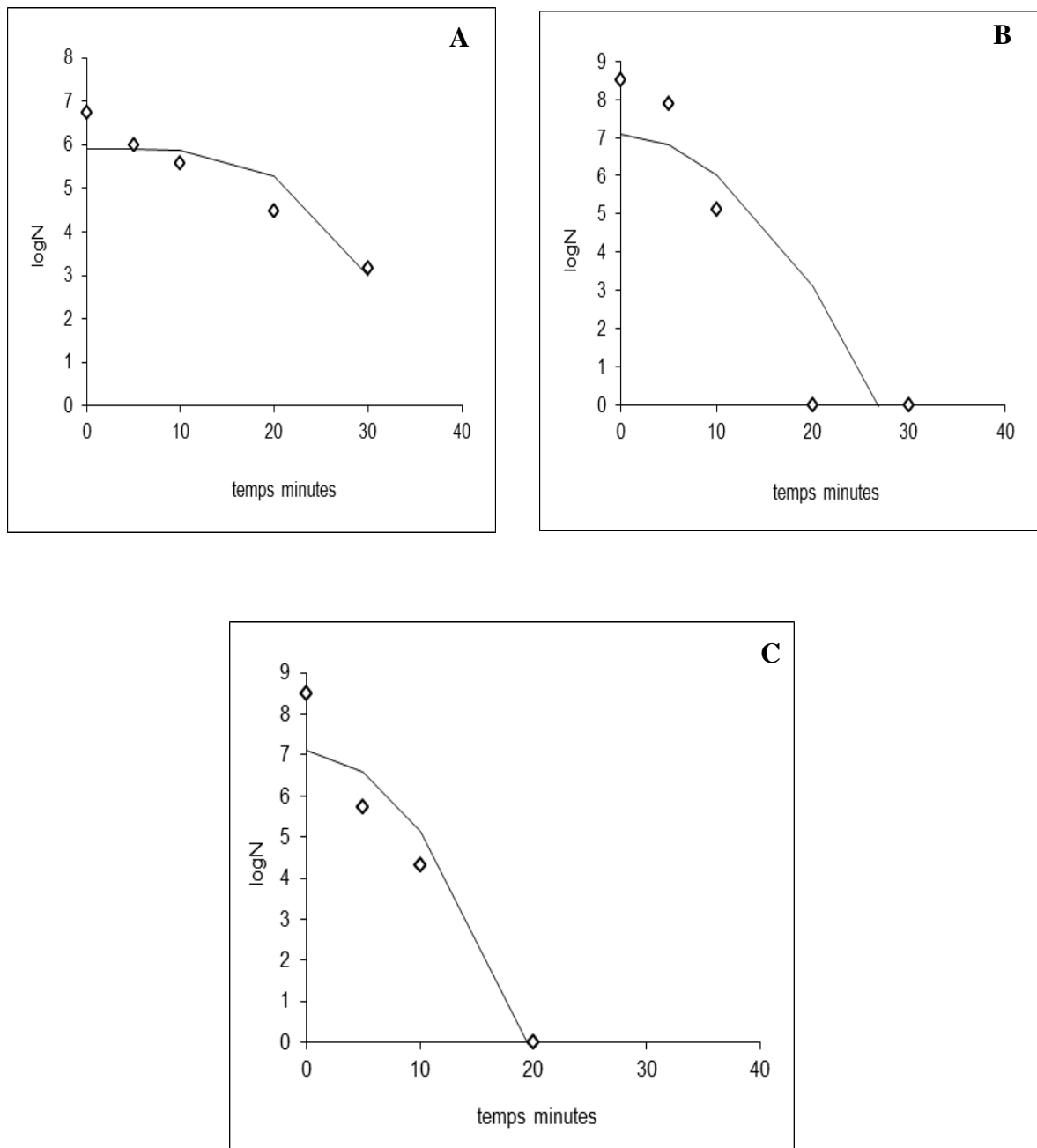


Figure 15 : Cinétique de destruction de la souche 6-Fen, A(85°C), B(95°C), C(100°C).

Les cinétiques de destruction thermique ont montré une homogénéité de forme Figures (11, 12, 13, 14, 15).

Tableau 08 : Les paramètres de thermorésistance des 5 souches retenues

Le tableau (08) montre que les valeurs de $DT^{\circ}C$ des souches 1-CUR, 2-Gin, 3-Mél, 4-Cum et 6-Fen sont inversement proportionnelles à la température du traitement.

Une valeur de 74,89min pour la $D_{85^{\circ}C}$ a été enregistrée pour la souche S6-Fen tandis que des valeurs comprises entre 9,73-27,36min ont été obtenu pour la $D_{95^{\circ}C}$.

L'augmentation du barème de traitement révèle des $D_{100^{\circ}C}$ entre 5,59-11,17min et des valeurs du $D_{105^{\circ}C}$ comprises entre 6,001 et 11,04min.

La seule souche qui a résisté à un traitement sévère a montré une valeur $D_{110^{\circ}C}$ de 5,53min. Ces résultats montrent une relation étroite entre les valeurs de DT et l'origine des souches. La souche 6-Fen semble être la plus sensible à une température de $85^{\circ}C$ par contre ce traitement reste inefficaces sur les autres souches, tandis que la souche 3-Mél semble être la plus résistante à la température $110^{\circ}C$ avec une valeur 5,53min.

Nos résultats du $D_{100^{\circ}C}$ qui varient entre 5.59-11.17min sont beaucoup plus élevés que celles des spores de *Bacillus cereus* isolées à partir du lait infantile enregistrés par **Stoeckel, et al. (2013)** avec des valeurs $D_{100^{\circ}C}$ qui varient entre 1.8 et 3.5min.

La valeur $D_{110^{\circ}C}$ obtenue par **Pereira et al.,(2019)** à partir de spores isolées de fèves de cacao était plus élevée (92,9 min) par rapport à la valeur $D_{110^{\circ}C}$ qu'on a trouvé (5.53).

Ziane et al.,(2014) et à partir des souches isolées à partir du couscous emballé a enregistré des valeurs de $D_{95^{\circ}C}$ (entre 0.68 et 18.85min) qui sont inférieure par rapport à nos valeurs $D_{95^{\circ}C}$ entre 9.73 et 27.36.

Les valeurs Dt que nous avons obtenues sont beaucoup élevées ce qui nous laisse penser qu'il s'agit bien des souches particulièrement thermorésistantes. Cette résistance exceptionnellement élevée peut être dû à très faible l'Aw des produits d'origine de ces souches.

III.2.Sensibilité au traitement thermique ZT

Les figures 18, 19, 20, 21, 22 montrent les cinétiques de sensibilité à différents traitement thermique Zt :

Les valeurs $Zt^{\circ}C$ de la sensibilité au traitement thermique étaient comprises entre $15.38^{\circ}C$ à $32.15^{\circ}C$. La valeur la plus élevée était enregistré chez la souche 3-Mél et la plus faible valeur était observée chez la souche 6-Fen, tandis qu'une valeur de Zt $16.74^{\circ}C$ pour la souche 1-CUR, $25.36^{\circ}C$ pour la souche 2-Gin et $27.39^{\circ}C$ pour la souche 4-Cum.

Les valeurs de Zt obtenues lors de ce travail sont plus élevées que celles obtenues par **Benamara et al. (2016)** dont les valeurs sont comprises entre 7.75-21.34°C tandis que **Benahmed et al. (2020)** ont trouvé des valeurs Zt comprises entre 6.5 à 18.6°C.

Ziane et al., (2014) ont montré aussi des valeurs de Zt de l'ordre de 7.52 à 10.38°C sur des souches isolées à partir de la semoule de couscous commercialisée de la région de Laghouat moins résistants.

On comparant nos résultats par rapport à celles obtenus lors des études antérieures, il semble claire que l'origine de la souche de *B.cereus* est un facteur influençant leur thermorésistance.

Conclusion

Conclusion

La plupart des aliments cuits sont souvent contaminé par divers types de bactéries sporulées thermorésistantes. Le groupe *Bacillus cereus sensu lato* est souvent rencontré dans les produits qui subissent un traitement thermique et/ou déshydraté (faible A_w), elles peuvent être à l'origine des intoxications alimentaires .

Les objectifs de cette étude étaient de rechercher et dénombrer les spores de ce groupe de bactéries dans les épices commercialisées dans la région de Ghardaïa et d'étudier la thermorésistance de certains souches.

Les résultats ont montré que parmi les 20 échantillons analysés, 12 ont été contaminé par les spores de *B.cereus* avec un taux maximal $1,31 \times 10^9$ ufc/g dans le Carvi et un taux minimal $2,55 \times 10^4$ ufc/g dans le Cumin.

L'étude de la thermorésistance des spores *B.cereus* a montré des valeurs $D_{95^\circ\text{C}}$ comprise entre 9.73 à 27.36min, les valeurs $D_{100^\circ\text{C}}$ de 5.59 à 11.17min et $D_{105^\circ\text{C}}$ sont 6,001 et 11,04min.

Les souches ont montré une sensibilité thermique Z_t qui peuvent aller de 15.38°C à 32.15°C . La souche 3-Mél était la plus résistante, la souche 6-Fen était la plus sensible.

Les résultats obtenus lors de cette étude peuvent construire un outil lors d'une étude plus large sur l'estimation des risques liés à la consommation des *B. cereus* dans les plats cuisiniers.

Ces résultats ont cependant été insuffisants pour étudier la thermorésistance des spores *Bacillus cereus*, pour cela il serait préférable que d'autres tests biochimiques soient réalisés, et une identification moléculaire des souches soit effectuée. Puis il serait recommandé d'approfondir l'étude de la thermorésistance à des températures plus élevées, et d'étudier l'effet de pH et A_w sur la thermorésistance. Les limites de la présente étude constituent des axes de recherche pour des futurs travaux .

*Références
bibliographique*

Références bibliographique

1. **Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I., Isobe, M., (1994).** A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. FEMS Microbiol. Lett. 121, 31–34.
2. **Ainiza, W. M. W., Jinap, S., & Sanny, M. (2015).** Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in single and mixed spices. Food Control, 50, 913e918.
3. **Aksu H, Bostan K, Ergun O, (2000).** Presence of *Bacillus cereus* in packaged some spices and herbs sold in Istanbul. Pakistan journal of biological sciences. V 3(5) P 710/712.
4. **Altayar M., Sutherland A. D. (2006).** *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. J. Appl. Microbiol. 100 714.
5. **Andersson, A., Ronner, U. and Granum, P. E. (1995).** What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? International Journal of Food Microbiology 28, 145-55.
6. **Anses , (2016).** Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments: *Bacillus cereus*. Disponible sur (<https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-infectieuses-dorigine-alimentaire/toxi-infections-alimentaires-collectives/donnees/#tabs>).
7. **Arnesen, S., Fagerlund, A., Granum, P., (2008).** From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol. Rev. 32, 579–606.
8. **Asano, S.I., Nukumizu, Y., Bando, H., Iizuka, T., Yamamoto, T., (1997).** Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 63, 1054–1057.
9. **Barbara Setlow, Swaroopa Atluri, Ryan Kitchel, Kasia Koziol-Dube, and Peter Setlow (2006).** Role of Dipicolinic Acid in Resistance and Stability of Spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-Protective α/β -Type Small Acid-Soluble Proteins. Journal of bacteriology. V 188(11): P 3740–3747.
10. **Bartoszewicz, M., Hansen, B., Swiecicka, I., (2008).** The members of the *Bacillus cereus* vbg group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. Food Microbiol. 25, 588–596.
11. **Baweja, R.B., Zaman, M.S., Mattoo, A.R., Sharma, K., Tripathi, V., Aggarwal, A., Dubey, G.P., Kurupati, R.K., Ganguli, M., Chaudhury, N.K., Sen, S., Das, T.K., Gade, W.N., Singh, Y., 2008.** Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. Arch. Microbiol. 189, 71-79.
12. **Beattie S. H. and Williams A. G. 2000.** Detection of toxins. In Encyclopedia of Food Microbiology (vol 1). Edited by Robinson R. K., Batt C. A. and Patel P. D. Academic Press, San Diego, USA. pp: 141-149.
13. **Beecher, D., Macmillian, J., (1991).** Characterization of the components of

hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Infect. Immun. 59, 1778–1784.

14. Beecher, D., Schoeni, J., Wong, A., (1995). Enterotoxigenic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Infect. Immun. 63, 4423–4428.

15. Benahmed M, LEGUERINEL N, Moussa-boudjemaa B, (2020). Biodiversity, spoilage capacity and heat resistance of mesophilic aerobic spores isolated from milk powders marketed in Algeria International Journal of Dairy Technology. V(0)

16. Bigelow W.D., (1921). The logarithmic nature of thermal death time curves. *J. Infect. Diseases* 29, 528-536.

17. Blakey, L., Priest, F., (1980). The occurrence of *Bacillus cereus* in some dried foods including pulses and cereals. *J. Appl. Bacteriol.* 48, 297–302.

18. Burgess B.A, Lohmann K.L , Blakley B.R, (2010). Excessive sulfate and poor water quality as a cause of sudden deaths and an outbreak of diarrhea in horses. *The Canadian Veterinary Journal.* V 51(3) P: 277–282.

19. Couvert O. 2002. Prise en compte de l'influence du pH dans l'optimisation des traitements thermiques .Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université de Bretagne Occidentale, pp10.12.20.

20. D.P.A.T., Direction de la planification et de l'Aménagement du Territoire de la Wilaya de Ghardaïa, 2009- Atlas de Ghardaïa, 164 p.

21. Driks, A. (1999) The *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 1–20.

22. Drobniowski., F. A.(1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clinical microbiology reviews*, 6, 324-338.

23. Dromigny E.(2008). *Bacillus cereus*. Edition Lavoisier, 1-233.

24. Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Scherer, S., (2004). *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol. Nutr. Food Res.* 48, 479–487.

25. Ehling-Schulz M, Svensson B, Guinebretiere M.H, Lindbäck H, Andersson M, Schulz A, Fricker M, Christiansson A, Granum P, Märtilbauer E, Nguyen-The C, Salkinoja-Salonen M, Scherer S; (2005). *Emetic toxin formation of Bacillus cereus is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains.* *Microbiology society V* 151, p:183-197.

26. Fagerlund A., Ween A., Lund T., Hardy S.P. and Granum P.E. 2004. Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology V* 150 P 2689- 2697.

27. Faille, C., C. Jullien, F. Fontaine, M. N. Bellon-Fontaine, C. Slomianny, and T. Benezech. 2002. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Can J Microbiol* **48**:728-738.

- 28. Flannigan, B., & Hui, S. C. (1976).** Occurrence of aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* in mold floras of ground spices. *Journal of Applied Bacteriology*, 41(3), 411e418.
- 29. Forsythe.S.J, (2000).**Basic aspects.In: *The microbiologie of safe food*.Blackwell Science.Ed .byForsythe S., MA, USA, p. 10-52.
- 30. Gaillard, s., leguérinel, i. & mafart, P.(1998).** Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *Journal of Food Science*,63 (5), 887-889.
- 31. Gaillard S. (2003).**Modélisation de la thermorésistance, de la viabilité et du comportement à la recroissance de *Bacillus cereus* en fonction de la température, du pH et de l'activité aqueuse. Thèse de Doctorat en Microbiologie.Université de Bretagne Occidentale,pp.8.12.15.
- 32. Garbowska, M., Pluta, A. B., & Rozanska, L. S. (2015).** Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiology*, 49, 1e5.
- 33. Geeraerd A., Herremans C., VanImpe J. 2000.**Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* 59, 185_209.
- 34. Granum, P., (1994).** *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Bacteriology* 76 (Symposium supplement), pp 6 1-66.
- 35. Granum, P., O'Sullivan, K., Lund, T., (1999).** The sequence of the non-haemolytic en-terotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 225–229.
- 36. Granum P.E. (2007).** *Bacillus cereus*. In: *Food Microbiology: Fundaments and Frontiers*, 3 rd ED. Edited by Doyle M. and Beuchat L. 3rd Edition, ASM Press, Washington, D.C. pp: 445-456.
- 37. Guinebretière, Marie-Hélène ; Auger, Sandrine; Galleron, Nathalie ; Contzen, Matthias ; et al. (2013).** " *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. est une nouvelle espèce thermotolérante du groupe *Bacillus cereus* parfois associée à une intoxication alimentaire ". *Journal international de microbiologie systématique et évolutive* . 63 (1) : 31-40.
- 38. Guinebretière, M.-H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M.,Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., De Vos, P., (2008).** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ. Microbiol.* 10, 851–865.
- 39. Heinriches, J., Beecher, D., MacMillan, J., Zilinskas, B., (1993).** Molecular cloning and characterization of the hblA gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 175, 6760–6766.
- 40. Igura, N., Kamimura, Y., Islam, M.S., Shimoda, M., Hayakawa, I., 2003.** Effects of minerals on resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and hydrostatic pressure.

Applied and Environmental Microbiology 69, 6307-6310.

41. Jääskeläinen, E., Teplova, V., Andersson, M., Andersson, L., Tammela, P., Andersson, M., Pirhonen, T., Saris, N.-E., Vuorela, P., Salkinoja-Salonen, M., (2003). In vitro assay for human toxicity of cereulide, the emetic mitochondrial toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*. *Toxicol. In Vitro* 17, 737–744

42. Jenson I, Moir CJ, (2003). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Ch 14 In: Hocking AD (ed) *Foodborne microorganisms of public health significance*. 6th ed. Australian institute of Food Science and Technology NSW Branch, Sidney, p. 445-478.

43. Katzin L. I., Sandholzer L. A. & Strong, M. E. 1943. Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurization. *J. Bacteriol.* 45, 256-272.

44. Kim, J. M., Forghani, F., Kim, J. B., Park, Y. B., Park, M. S., Wang, J., et al. (2012). Improved multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Bacillus cereus* emetic and enterotoxic strains. *Food Science Biotechnology*, 21(5), 1439e1444.

45. Kim, S.-Y., Sagong, H.-G., Choi, S. H., Ryu, S., & Kang, D.-H. (2012). Radio-frequency heating to inactivate *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* 157:H7 on black and red pepper spice. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1e2), 171e175.

46. Kneifel W, Berger E, (1994). Microbiological Criteria of Random Samples of Spices and Herbs Retailed on the Austrian Market. *J Food Protect*, 57: 893/901.

47. Kramer, J., Gilbert, R., (1989). *Foodborne Bacterial Pathogens. Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Marcel Dekker, inc., New-York.

48. Leclerc H, Gaillard J.L. et Simonet M, (1995). *Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien*. Ed Doin 1995. P 335. paris.

49. Leuschner R., Lillford P. (2001). Investigation of bacterial spore structure by high resolution solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy and transmission electron microscopy. *International Journal of Food Microbiology* 63, 35_50.

50. Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., et al. (2017). Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 2499–2508. doi: 10.1099/ijsem.0.001821.

51. Lund, T., De Buyser, M.L., Granum, P.E., (2000). A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.* 38, 254–261.

52. Marina Stoeckel, Anja Westermann, Zeynep Atamer, Jörg Hinrichs, (2013). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores in infant formula under shear conditions. *Dairy Science & Technology*. 93:163–175.

53. Martinez.s, borrajo.r, franco.i, carballo.J, (2007), “Effect of environmental parameters on growth kinetics of *Bacillus cereus* (ATCC 7004) after mild heat

treatment”International Journal of Food Microbiology, , 223-227.

54. McKee, L. H. (1995). Microbial contamination of spices and herbs: A review. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 28, 1e11.

55. Melly, E., Genest, P.C., Gilmore, M.E., Little, S., Popham, D.L., Driks, A., Setlow, P., (2002). Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *J. Appl. Microbiol.* 92, 1105-1115.

56. Merzougui S., Lkhider M. & Cohen N.(2013). *Bacillus cereus*, un réel problème pour l’industrie agro alimentaire?. ScienceLib Editions Mersenne: volume 5, N°130915.

57. Mikkola, R., Saris, N.-E.L., Grigoriev, P.A., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S., 1999. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide. *Eur. J. Biochem.* 263, 112–117.

58. NF EN ISO 7932 (Juillet 2005) : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présomptifs - Technique par comptage des colonies à 30 °C.

58. Ngamwongsatit, P., Buasri, W., Pianariyanon, P., Pulsrikarn, C., Ohba, M., Assavanig, A., Panbangred, W., (2008). Broad distribution of enterotoxin genes (hblCDA, nheABC, cytK, and entFM) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 352–356.

59. O’Riordan, M. J., & Wilkinson, M. G. (2008). A survey of the incidence and level of aflatoxin contamination in a range of imported spice preparations on the Irish retail market. *Food Chemistry*, 107(4), 1429e1435.

60. Paananen, A., Mikkola, R., Sareneva, T., Matikainen, S., Hess, M., Andersson, M., Julkunen, I., SALKINOJA-SALONEN, M., Timonen, T., 2002. Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Clin. Exp. Immunol.* 129, 420–428.

61. Paul Dréan, Catherine M McAuley, Sean C Moore, Narelle Fegan & Edward M Fox(2015). Characterization of the spore-forming *Bacillus cereus sensu lato* group and *Clostridium perfringens* bacteria isolated from the Australian dairy farm environment *BMC Microbiology* V 15, Article number: 38

62. Pereira A,N, Stelaria H,A, Carlinb F, Sant’Anaa A,S, (2013). Inactivation kinetics of *Bacillus cereus* and *Geobacillus stearothermophilus* spores through roasting of cocoa beans and nibs. *LWT -Food Science and Technology.* 111 P394–40

63. Piggot, P.J. and Hilbert, D.W. (2004) Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* 7, 579–586.

64. Planchon, S., Dargaignaratz, C., Levy, C., Ginies, C., Broussolle, V., Carlin, F., (2011). Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 degrees C and 30 degrees C display variations in their properties. *Food Microbiol.* 28, 291-297.

65. Santin, E. (2005). Mould growth and mycotoxin production. In D. E. Diaz (Ed.), *The*

mycotoxin blue book (pp. 225e234). Nottingham: Nottingham University Press.

66. Schaarschmidt, S., Spradau, F., Mank, H., Banach, J. L., Fels-Klerx, H. J., Hiller, P., (2016). Public and private standarts for dried culinary herbs and spices e Part II: Production and produc_x0016_et standarts for ensuring microbiological safety. Food Control, 70, 360e370.

67. Schoeni, J., Wong, A., (2005). *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. J.Food Prot. 68,636–648.

68. Sim R.B. (1998). *Bacillus cereus* gastroenteritis. In. Hausler W. and M. Sussman (eds.), Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, vol.3. Arnold, London, Great Britain pp: 551-556

69. Setlow, P. (2003) Spore germination. *Curr Opinion Microbiol* 6, 550–556.

70. Setlow, P.(2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of AppliedMicrobiology* 101, 514-525.

71. Shinagawa, K., Ueno, Y., Hu, D., Ueda, S., Sugii, S., (1996). Mouse lethal activity of a HEp-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. *J.Vet. Med. Sci.* 58, 1027–1029.

72. Turnbull, P. C., Jackson, P. J., Hill, K. K., Keim, P., Kolstø, A. B., and Beecher, D. J. (2002). “Longstanding taxonomic enigmas within the ‘*Bacillus cereus* group’ are on the verge of being resolved by far-reaching molecular developments: forecasts on the possible outcome by an ad hoc team,” in *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*, eds R. Berkeley, M. Heyndrickx, N. Logan, and P. De Vos (Oxford: Blackwell Publishing), 23–36.

73. Ramarao, N., Sanchis, V., (2013). The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a re-view. *Toxins* 5, 1119–1139.

74. Riesenman, P. J., and W. L. Nicholson. (2000). Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Appl Env Microbiol* 66:620-626.

75. R. Teyssou., P. Hance., E. Nicand., J.Y. Nizou., Y. Buisson.,(1998). Les infections à *Bacillus cereus* :bactériologie, clinique et traitement. *La Lettre de l'Infectiologue mars 1998.,Tome XIII , n° 3 ,P.101 .*

76. Ryan, P., Macmillan, J., Zilinskas, B., (1997). Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J.Bacteriol.* 79, 2551–2556.

77. Virtanen, S.M., Roivainen, M., Andersson, M.A., Ylipaasto, P., Hoornstra, D., Mikkola, R., Salkinoja-Salonen, M.S., (2008). In vitro toxicity of cereulide on porcine pancreatic Langerhans islets.*Toxicon* 51, 1029–1037.

78. Witkowska, A. M., Hickey, D. K., Alonso-Gomez, M., & Wilkinson, M. G. (2011). The microbiological quality of commercial herb and spice preparations used in the formulation of a chicken supreme ready meal and microbial survival following a simulated industrial heating process. *Food Control*, 22, 616-625.

79. Yokoyama, K., Ito, M., Agata, N., Isobe, M., Shibayama, K., Horii, T., Ohta, M., (1999). Pathological effect of synthetic cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, is reversible in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24, 115–120.

80. Ziane M., Desriac N., Le Chevalier P., Couvert O, Moussa-Boudjema, B. & Leguerinel I. (2014). Identification, heat resistance and growth potential of mesophilic spore-forming bacteria isolated from Algerian retail packaged couscous. *Food Control*. 45.16-21-82.

Annexes

Annexe 1: Milieu de culture et diluants

1. Milieu Mossel

Mossel de base

Extrait de viande..... 1g/l
Peptone.....10g/l
Sodium chloride10g/l
D-mannitol10 g/l
Rouge de phénole0.025g/l
Agar-agar13.5 g/l
Eau distillé.....1000ml

Mossel complet

Milieu Mossel de base90ml
Solution de polymixine B1ml
Émulsion de jaune d'œuf10ml

PH du milieu :7,2±0,2 .

Émulsion de jaune d'œuf

- ✧ Utilisation des œufs de poule fraîches avec leur coquille intacte
- ✧ Lavage des œufs avec un détergent liquide, rinçage avec l'eau de robinet puis immerger dans l'alcool pendant 30 seconds.
- ✧ Flamber l'œuf entre deux becs bunsen .
- ✧ En utilisant des procédures aseptiques, Casser l'œuf et séparer le jaune du blanc en transférant à plusieurs reprises le jaune d'une moitié de la coquille d'œuf à l'autre.
- ✧ Récupérer le jaune d'œuf dans un bécher et ajouter l'eau distillée stérile jusqu'à obtenir une émulsion .
- ✧ Ajouter 1ml de Solution polymixine B.

2. BHIB

Extrait cœur-cerveille.....17,5g
Peptone pancréatique de gélatine.....10g
Chlorure de sodium.....5,0 g
Phosphate disodique2,5 g
Glucose..... 2,0 g

3. Gélose nutritive

Extrait de viande.....15g
Extrait de levure.....2g
Peptone.....10g
Chlorure de sodium.....5g
Agar.....1.5g

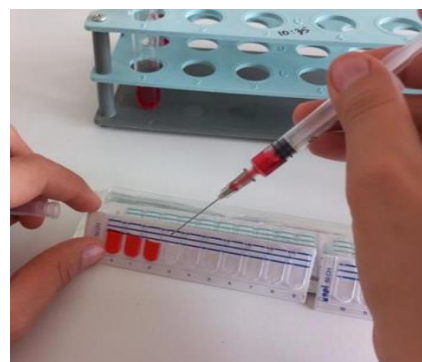
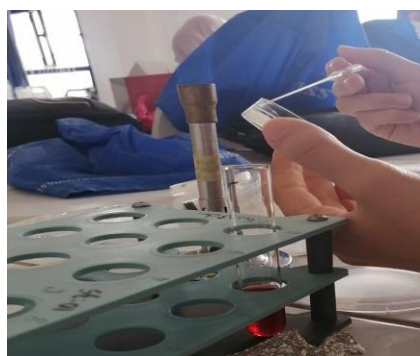
4. GN enrichie

GN.....1l
Mnso4.....40mg/l
Cacl2.....100mg/l
ED.....1000ml

pH :6,8-7,4

Annexes 02: Tableaux et figures

planche 1: de la galrie API 50 CHB/E:



3. Tableau de niveau de contamination des échantillons d'épices:

Epices	Nombre d'échantillon	Nombre d'échantillon contaminé	Les valeurs en ufc/g
Cumin	2	1	$2,55 \times 10^4$ ufc/g
Curcuma	2	2	$2,53 \times 10^5$ ufc/g
Carvi	2	2	$1,313 \times 10^9$ ufc/g
Poivron noir	2	1	$2,81 \times 10^5$ ufc/g
Paprika	2	2	$1,90 \times 10^5$ ufc/g ;
Fenugrec	1	1	$1,15 \times 10^5$ ufc/g

Annexes 03 :

Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 publié sur le JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 39 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires

26		JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 39		S Chaoual 1438 2 juillet 2017	
12- Légumes, fruits, végétaux et produits à base de végétaux					
Catégories des denrées alimentaires	Micro-organismes/ métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc/g)	
		n	c	m	M
Fruits et légumes frais	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10 ²	10 ³
Fruits et légumes prêts à l'emploi ⁽¹⁾	Germes aérobies à 30 °C	5	2	5.10 ⁶	5.10 ⁷
	Flore lactique	5	2	5.10 ⁵	5.10 ⁶
	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
Epices, mélange d'épices et herbes aromatiques séchées	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10 ²	10 ³
	Anaérobies sulfite-réducteurs	5	2	10 ³	10 ⁴
	Levures et moisissures	5	2	10 ⁴	10 ⁵
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Bacillus cereus</i> (2)	5	2	10 ³	10 ⁴
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
Herbes séchées (thés, camomilles...)	Germes aérobies à 30 °C	5	2	10 ⁴	10 ⁵
	Coliformes thermotolérants	5	2	10	10 ²
	Moisissures	5	2	10 ³	10 ⁴
	Anaérobies sulfite-réducteurs	5	2	10	10 ²
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
Herbes aromatiques fraîches	Germes aérobies à 30 °C	5	2	5.10 ⁶	5.10 ⁷
	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10 ²	10 ³
	Anaérobies sulfite-réducteurs	5	2	10 ²	10 ³
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	