

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEURE
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AMAR THLIDJI LAGHOUAT**



**Faculté des Sciences
Département de biologie**

**Mémoire de fin d'études en vue d'obtention du diplôme
De master en sciences biologiques.
Option : Microbiologie appliquée.**

Thème :

**Etude de l'influence de certains facteurs
environnementaux sur la croissance des souches de
B.cereus isolées à partir des épices commercialisées dans
la région de Lghouat**

Présenté par:

Teggar yousra.

Gaoui safa.

CHettikh Nouria.

Devant le Jury :

Président : MESSOUDI.O

MCB

Examineur : DJEBLIA

MAB

Encadreur : MADOURI R.

MAA

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

D'abord nous remercions Dieu qui nous a donné la patience, le courage et la

volonté pour réaliser ce mémoire

Nous tenons aussi à présenter nos sincères remerciements

*À notre encadreur DR. **Madouri Redouane.** de nous avoir proposé ce sujet et de diriger notre travail pour son aide, Ses critiques et ses suggestions*

*Nous remercions Mr **MESSOUDI OMAR** d'avoir accepté la présidence du jury de la soutenance.*

*Nous remercions Mr **Djebli Ahmed.** qui a accepté d'examiner ce modeste travail*

Nous voudrions remercier aussi les techniciens du laboratoire de microbiologie et particulièrement Gaoui Halima pour sa patience, son aide précieuse et ses valeureux conseils.

Enfin, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire .

Avous tous, un grand Merci.

Dédicaces.

A la mémoire de mon cher papa TEGGAR AHMED

Je ne saurais exprimer mon grand chagrin en ton absence.

*J'aurais aimé que tu sois à mes cotés ce jour. que ce travail soit
une prière pour le repos de ton âme.*

A ma très chère maman

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon grand respect, et ma
reconnaissance pour les sacrifices que tu as consentis pour mon
éducation. J 'implore dieu le tout puissant de vous accorder bonne
santé et longue vie.*

A Mes frère, et mes soeurs.

Yousra

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

*À mes parents pour leur tendresse, leur
amour ainsi que leurs nombreux sacrifices, à
mes soeurs et mes frères pour leurs soutiens.*

À mes professeurs et à mon encadreur.

Et à mes collègues du travail,

Ainsi qu'à mes chers amis de ma promotion 2019/2020

À Tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer.

Safia

Dédicaces

Du fond de mon cœur, Je dédie ce mémoire ...

A mon marie HACHEM, aucune dédicace ne peut exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez fournis pour mon instruction et mon bien être.

A mon cher père, a celle qui m'a noyée de ses sentiments et le cœur qui m'a réchauffe d'amour. Que le BON DIEU tout puissant le soigne et le protège.

NOURIA

Résumé

Table de matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale	1
Chapitre I: Synthèse bibliographique	3
Généralités sur les épices	4
I.1. Histoire d'épices	4
I.2. Définition des épices	4
I.3. Production d'épices	7
I.3.1. Transport	8
I.3.2. Battage	8
I.3.3. Séchage	8
I.3.4. Nettoyage	8
I.3.5. Emballage	8
I.3.6. Espace de rangement	9
I.4. Classification des épices	9
I.5. Utilisations des épices	9
I.5.1. Utilisation nutritionnelle	9
I.5.2. Utilisation médicinale	10
I.5.3. Utilisation en cosmétique	11
I.6. Propriétés des épices	11
I.6.1. Activité antimicrobienne des épices	11
I.6.2. Activité antioxydante des épices	12
I.6.3. Toxicité des épices	12
I.7. Contamination des épices	12
II. Généralités sur le <i>Bacillus cereus</i>	13
II.1. Taxonomie et Phylogénie du groupe <i>Bacillus cereus</i>	13
II.2. Caractéristiques de <i>Bacillus cereus</i>	14
II.2.1. <i>Bacillus cereus</i> dans les aliments	14
II.2.2. Thermo-résistance de <i>Bacillus cereus</i>	15
II.2.3. <i>Bacillus cereus</i> , agent de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC)	15
II.2.4 Pouvoir pathogène	16
II.3. Caractéristiques des spores	17
II.3.1 Généralités	17
II.3.2. Les spores de <i>Bacillus cereus</i> dans les aliments	18

Partie II : EXPERIMENTALE	
Chapitre II.1 Matériel et méthodes	
II. 1. 1.Généralités	20
II. 1.1.1 Présentation de la zone d'étude	20
II. 1.2 Techniques d'Enquête et collecte de l'information	21
II. 1.2.1 Investigation au niveau des herboristes	21
II.1.2.Echantillonnage et prélèvement des épices	21
II.1.3 Isolement et de dénombrement de <i>Bacillus cereus</i>	22
II.1.3.1 Évaluation de la charge initiale en <i>B. cereus</i> dans les épices	23
II.1.3.2 Dénombrement de <i>Bacillus cereus</i>	24
II.1.3.3 Conservation des souches	25
II.1.2. L'identification des souches purifiées	25
II.1.2.1 Etude macroscopique	25
II.1.2.1.1 Caractérisation phénotypique	25
II.1.2.1.2 La morphologie des colonies et des cellules	25
II.1.2.2 Etude microscopique	26
II.1.2.2.1 Coloration au bleu de méthylène	26
II.1.2.2.2 Coloration de gramme	26
II.1.2.2.3.Coloration des spores par le vert de malachite	26
II.1.2.3 Etude biochimiques (les tests d'orientation)	26
II.1.2.3.1Test de catalase	26
II.1.2.3.2 Test de Mannitol mobilité	26
II.1.2.3.3 Recherche de lécithinase	26
II.1.3 Préparation de stock de spores	27
II.1.4 Etude de l'influence des conditions de milieu sur la croissance de <i>Bacillus cereus</i>	28
II.1.4.1 Effet de pH sur la croissance de <i>Bacillus cereus</i>	28
II.1.4.2 Effet de l'activité d'eau	29
Chapitre II.2 : Résultats et discussion	
II.2.1 Isolement et identification de souches de <i>B. cereus</i>	31
II.2.1.2 Tests de confirmation de l'appartenance au groupe de <i>B.cereus sensu lato</i>	31
II.2.1.2.1.Aspect macroscopique	32
II.2.1.2Aspect microscopique	32
II.2.1.2 1 La coloration au bleu de méthylène	32
II.2.1.2.2 Coloration de Gram	33
II.2.1.2.2.3 Coloration des spores	33
II.2.2.1 La prévalence de <i>B.cereus sensu lato</i> dans les échantillons analysés	34
II.2.2.2 Le Dénombrement de <i>B. cereus sensu lato</i> dans les échantillons analysés	35
II.2.3 Caractéristiques biochimiques des isolats	36
II.2.3.1 Identification biochimique	36
II.2.4 Résultats de l'influence des facteurs environnementaux sur la croissance des <i>B. cereus sensu lato</i>	36
Conclusion générale	39
Bibliographie	
Annexes	

Liste des abréviations

Log	Logarithme
UFC	unité formant colonie
GN	gélose nutritive
AW	Activité d'eau
TIAC	Toxi- Infection Alimentaire Collective
MYP	mannitol, eggolk, polymyxin
EPT	L'eau peptonée tamponnée (EPT)
BHIB	Milieu Brain Heart Infusion
°C	degré Celsius
V/V	Volume à volume

Liste des figures

Figure 1	Schéma représentant les deux types d'intoxication possibles par <i>B. cereus</i>
Figure 2	carte géographique de la wilaya de laghouat
Figure 3	Epices vendu en vrac
Figure 4	Echantillonnage et Préparation des dilutions décimales
Figure 5	Préparation de stock de spores
Figure 6	l'isolat de <i>B. cereus sensu lato</i> sur Milieu Mossel obtenu à partir de mélange et gingembre prélevé de wiaam
Figure 7	l'isolat de <i>B. cereus sensu lato</i> sur Milieu Mossel obtenu à partir de mélange et gingembre prélevé de wiaam
Figure 8	Résultats d'observations microscopiques après la coloration de bleu de méthylène (Observation par microscope optique G×100 a immersion).
Figure 9	Résultats d'observations microscopiques après la coloration de Gram (Observation par microscope optique G×100 a immersion
Figure 10	Résultats d'observations microscopiques après la coloration au vert de malachite (Observation par microscope optique G×100 a immersion
Figure 11	prévalence des spores de <i>B cereus</i> dans les différentes épices
Figure 12	Les concentrations des bacillus cereus dans les épices ufc/g

Liste des Tableaux

Tableau 1	Exemples d'épices et propriétés
Tableau 2	Classification des épices sur le degré de goût.
Tableau 3	Effets biologiques des épices et des herbes aromatiques
Tableau 4	Groupes phylogénétiques des Espèces ; Gamme de températures de croissance (°C) et Toxicité.
Tableau 5	Poste et nombre de prélèvement des épices au niveau herboristes de la commune de Laghouat.
Tableau 6	Les valeurs de pH
Tableau 7	Les valeurs d'activité d'eau
Tableau 8	Résultats et interprétation des tests biochimiques
Tableau 9	l'effet de PH sur la croissance des souches.
Tableau 10	l'effet de Aw sur la croissance des souches.

Résumé :

Les épices sont utilisées partout dans le monde pour préparer des aliments principalement en raison de leurs propriétés aromatisantes. Cependant, ces dernières sont cultivées et récoltées dans des zones chaudes et humides qui favorisent la croissance d'une grande variété de micro-organismes. notamment les *Bacillus cereus*

Bacillus cereus est une bactérie pathogène sporulée capable de se développer dans des conditions variables comme le froid, l'absence d'oxygène, des bas pH ainsi que des matrices alimentaires diverses. Elle est l'une des principales causes de Toxi- Infection Alimentaire Collective (TIAC).. Ce travail vise à définir les paramètres environnementaux qui commandent le développement des spores de *B. cereus* dans les épices, et cela par dénombrement, isolement et identification de ces cellules à partir des épices commercialisés dans la région de laghouat .

Les résultats ont montré que sur les 30 échantillons analysés, 76.6% ont été contaminé par des spores de *B. cereus* avec un taux de contamination qui peut atteindre 6.96 log (ufc/g) dans le cas de carvi tandis que le gingembre a présenté les concentrations les plus faibles

L'étude de la croissance des souches isolées dans différents conditions de pH et A_w a enregistré que ces spores peuvent pousser dans des valeurs de pH proches de la neutralité (5.5) et des A_w supérieurs à 0,962 .

Mots clés : épices ; Spores , *B. cereus*, les paramètres environnementaux TIAC

Abstract:

Spices are used all over the world to prepare foods mainly because of their flavouring properties. However, the latter are grown and harvested in hot, humid areas that promote the growth of a wide variety of microorganisms especially *Bacillus cereus*

Bacillus cereus is a spore-forming pathogenic bacterium capable of developing under variable conditions such as cold, lack of oxygen, low pH as well as various food matrices. It is one of the main causes of Toxi- Collective Food Infection (TIAC), This work aims to define the environmental parameters that control the development of B spores. *Cereus* in spices, by counting, isolation and identification of these cells from spices marketed in the laghouat region. The results showed that of the 30 samples analysed, 76.6% were contaminated with B spores. *Cereus* with a contamination rate of up to 6.96 log (cfu/g) in the case of the caraway while the ginger had the lowest concentrations The study of growth of isolated strains under different pH conditions and A_w recorded that these spores can grow in pH values close to neutrality(5.5) and A_w greater than 0.962 .

Key words: *B. cereus*, spices growth parameter. spore

المخلص:

تستخدم التوابل في جميع أنحاء العالم لتحضير الأطعمة بشكل أساسي بسبب خصائصها المنكهة. كما انها تنمو وتُحصَد في المناطق الحارة الرطبة التي تعزز نمو مجموعة واسعة من الكائنات الحية الدقيقة. خصوصا

Bacillus cereus

Bacillus cereus بكتيريا مرضية قادرة على النمو في ظل ظروف متغيرة مثل البرد ونقص الأكسجين وانخفاض الرقم الهيدروجيني (pH) بالإضافة إلى مصفوفات غذائية مختلفة. وهو أحد الأسباب الرئيسية للإصابة بالتسمم الغذائي الجماعي

كان الهدف من هذا الموضوع هو تعريفها تعدادها و انتشارها مع تحديد عوامل نموها في التوابل. وكجزء من هذا الموضوع، قمنا أولاً بتحديد 30 عينة من التوابل المستوردة والمسوقة في ولاية الاغواط بحيث درسنا عوامل نموها، حيث تظهر النتائج أن البكتيريا موجودة في (23) 76.6% من العينات بأعلى نسبة مقدره ب $6.96 \log (ufc/g)$ موجودة بلكرأويه اما الزنجبيل فقد سجل ادنى نسبة تركيز. كماظهرت النتائج ان الابواغ يمكنها النمو في الاوساط مختلفه ال pH وال A_w كما قد سجل نموها في اوساط قريبه من القاعديه 5.5 و A_w اعلى من 0.962

كلمات مفتاحية: التوابل *Bacillus cereus* ; التسمم الغذائي الجماعي الابواغ

INTRODUCTION

Introduction

Dans la cuisine traditionnelle, les épices représentent l'un des ingrédients incontournables, particulièrement dans les plats traditionnels algériens. Cependant, de nombreuses études ont rapportées que les épices pouvaient être contaminées par des micro-organismes, notamment par des germes pathogènes, à l'origine de toxi-infections alimentaires graves. Les bactérie sporulées occupent une place de premier plan parmi les microorganismes préjudiciables particulièrement à la conserve alimentaire en raison de leur ubiquité et de leur capacité à produire des spores thermorésistantes qui les rendent particulièrement adaptées aux aliments traités thermiquement le danger engendré par ce groupe de bactéries est leur capacité de produire des enzymes ainsi des toxines susceptibles d'altérer la qualité des produits et d'engendrer des possibilités d'intoxications alimentaires (**Garnum et al, 1996**).

Les épices sont la principale source de formation des spores bactériennes dans de grands volumes d'aliments, comme les soupes, les ragoûts et les sauces préparés dans les établissements de restauration ; dans des conditions favorables, elles germent et se multiplient jusqu'à des niveaux infectieux et toxiques (**Pafumi, 1986**). Des études antérieures sur la microbiologie des épices ont montrés la présence de micro-organismes tels que *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella* et des champignons toxinogènes (**Powers et al., 1975; Powers et al., 1976; Baxter et Holzappel, 1982; Schwab et al., 1982**).

En Algérie le *Bacillus cereus* n'est pas recherché dans les aliments suspecte comme d'autre pathogène d'autant plus que les symptômes de toxi-infections alimentaires diarrhéique et émétiques à *Bacillus cereus* sont très proches de ceux provoqués respectivement par *clostridium perfringens* et *staphylococcus aureus* (**Green et al., 2009**).

Bacillus cereuse est la 3eme cause de toxi-infection alimentaire collective. Les cellules végétatives de *B. cereus* forment des spores lorsqu'elles se trouvent en conditions environnementales défavorables. Ces spores peuvent rester à l'état latent pendant de nombreuses années voire des milliers d'années, attendant ainsi le retour des conditions favorables (**Abbas, 2014**).

Ce travail vise à rechercher et dénombrer le groupe de *B. cereus* dans les épices les plus utilisées dans la région de Laghouat ainsi que leur paramètres de croissances

Introduction

Pour atteindre nos objectifs, nous avons partagé notre travail en trois parties:

La première partie est consacré à l'étude bibliographique synthétise des généralités sur les épices et le groupe de *B. cereus*. Elle est consacré à l'étude bibliographique, dans cette dernière nous avons fait une identification général sur les épices, nous avons présenté en outre brièvement la microbiologie des épices.

Dans la deuxième partie expérimentale nous présentons les différents matériels et méthodes utilisées pour la réalisation de ce travail: échantillonnages et prélèvement des épices de différent endroit.

Dans la troisième partie on a discuté les résultats obtenus, nous avons montré l'identification biochimique et l'isolement des souches de *Bacillus cereus*. Et enfin une conclusion et perspectives.

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur les épices

I.1. Histoire d'épices

L'histoire des épices a débuté 4000 ans avant notre ère au sud-ouest de l'Inde. Le premier homme qui cueillit du poivre pour parfumer son riz fut à l'origine d'une course folle de nouvelles saveurs permettant d'agrémenter la nourriture de base. Ces épices, dont la plupart sont exotiques sont parmi les produits commerciaux les plus coûteux durant l'Antiquité et le Moyen-âge (**Heers, 2008**).

Le commerce des épices se poursuit en Asie et au Moyen-Orient, mais déperit, puis disparaît en Occident.

Au XII^e siècle, les croisés rapportent de Palestine épices et plantes rares, favorisant un nouvel essor du commerce de l'Europe avec les autres pays du monde (**Décobert, 1998**).

Pendant la renaissance italienne, le commerce est à la base de la richesse des grandes cités italiennes comme Venise et Gênes. A cette époque, la cuisine se caractérise par sa recherche et son originalité, et bien que les épices coûtent très cher, les plats sont relevés et colorés grâce à des plantes aromatiques. Un cheval se négocie au même prix que 500g de safran, tandis qu'un mouton est échangé contre autant de gingembre et une vache contre un kilo de macis.

I.2. Définition des épices

Le mot épice vient de «spices» qui signifie denrée en-bas-latin. Les épices sont des parties de plantes aromatiques à la saveur et odeur plus ou moins fortes ou piquantes. Elles contiennent des substances organiques volatiles, souvent appelées arômes. Ces substances organiques appartiennent à des groupes chimiques tels que les alcools ou les aldéhydes et stimulent les perceptions olfactives et gustatives (**Bernard, 2012**).



Elles sont pour une bonne part, responsables des plaisirs de la table.

Les épices sont utilisées en petite quantité en cuisine comme conservateur, assaisonnement ou comme colorant.

Un grand nombre d'épices étaient employées autre fois en médecine (**Walker, 1994; Heers, 2008; Figueredo, 2012**).

Les épices peuvent provenir de différentes parties de la plante: l'écorce, exemple de la cannelle, des grains comme pour le fenouil, la coriandre et la cardamome, des feuilles, la mélisse et le laurier, des fleurs, le safran et le clou de girofle, de rhizome comme le curcuma et le gingembre ou de fruits comme pour le piment, le fenouil, l'aneth et la moutarde (**Farrell, 1990; Droniou, 2012**).

Des exemples

Epices	Propriétés
<p data-bbox="427 645 523 676">Cumin</p> 	<p data-bbox="778 819 1358 963">Plante herbacée de 50 cm à 1 m de haut. Leur Saveur forte, chaude, lourde et poivrée, légèrement amère (Institut Klorane, 1994).</p>
<p data-bbox="435 1178 515 1209">Carvi</p> 	<p data-bbox="738 1384 1401 1527">Une épice aux huiles essentielles précieuses. est une plante herbacée bisannuelle. qui ont une odeur agréable et aromatique (Mark Farayet, 2016).</p>

Gingembre



Ce sont des plantes herbacées, vivaces par leur rhizome qui ressemble au roseau. Le gingembre est légèrement sucré, citronné, piquant au goût et très aromatique (**Institut Klorane, 1994**).

Curcuma



Le curcuma est une herbe vivace à grandes feuilles engainantes et elliptiques. Le curcuma est connu pour ses propriétés anti-inflammatoires, Il est utilisé comme colorant des aliments et des textiles (**Institut Klorane, 1994**).

Cannelle



Le cannelier est un arbre tropical de 10 à 15 m de haut, Elles dégagent une forte odeur de girofle si on les froisse (**Institut Klorane, 1994**).
La cannelle a une odeur très aromatique, elle a une saveur chaude et sucrée, (**Institut Klorane, 1994**).

<p style="text-align: center;">Poivre noire</p> 	<p>Le poivrier est une liane vivace pouvant atteindre 10 m de long. Les feuilles sont ovales (Institut Klorane, 1994).</p>
<p style="text-align: center;">Les Piments et le Paprika</p> 	<p>Paprika est une plante herbacée a été introduit en Europe après la découverte de l'Amérique (Institut Klorane, 1994).</p>

Tableau.1. Exemples d'épices et propriétés

I.3. Production d'épices

Les épices sont produites à partir d'une grande variété de parties de plantes telles que les rhizomes, les écorces, les feuilles, les fruits, les graines, etc. En raison de l'hétérogénéité prononcée de la matière première, les méthodes de traitement diffèrent dans une certaine mesure et nécessitent une expertise individuelle dans de nombreuses opérations. Cependant, il existe certaines opérations d'unité de base qui sont couramment appliquées à la majorité des épices (**U. Schweiggert et al., 2007**).

- Après la production d'épices, suivi de plusieurs étapes se résument comme suit:

I.3.1. Transport

La matière végétale brute récoltée de la récolte d'épices doit être transportée rapidement dans des conditions sèches. La récolte peut être placée dans des paniers propres, des sacs secs, des remorques, des trémies ou d'autres conteneurs bien aérés et transportés vers un point central pour être transportés vers la transformation d'établissement (UNIDO et FAO, 2005).

I.3.2. Battage

Le battage est le processus d'élimination et de séparation du fruit ou de la graine du fruit indésirable tiges de fleurs ou tiges de plantes et enlèvement du matériel endommagé ou immature. Ce processus peut être entrepris à la main, assisté par des tamis et des écrans, par l'utilisation de vannage ou par des secoueurs et des trieurs mécaniques (UNIDO et FAO, 2005).

I.3.3. Séchage

C'est le processus le plus critique dans la production d'herbes et d'épices séchées. Le but du séchage vise à réduire la teneur en humidité du produit d'une croissance active sur le terrain à un niveau qui empêche la détérioration du produit et permet un stockage dans un état stable. Le séchage est un processus en deux étapes: tout d'abord le transfert de chaleur vers le produit humide à vaporiser l'eau dans le produit et d'autre part le transfert de masse d'humidité de l'intérieur vers le surface du produit où il s'évapore (UNIDO et FAO, 2005).

I.3.4. Nettoyage

Le nettoyage de l'épice avant l'emballage et la vente, est de s'assurer que l'épice est de la plus haute qualité et obtiendra le prix le plus élevé. Le nettoyage doit éliminer toutes les matières étrangères diminue la qualité et met en danger la vente (UNIDO et FAO, 2005).

I.3.5. Emballage

Les matières végétales transformées doivent être emballées le plus rapidement possible pour éviter détérioration du produit et comme protection contre l'exposition aux attaques de ravageurs et autres sources de contamination (UNIDO et FAO, 2005).

I.3.6. Espace de rangement

Il y a un besoin de stockage de qualité à la ferme et hors ferme avec des magasins frais et des installations de logement liées à la gestion des cultures après récolte. Les épices se détériorent rapidement dans des conditions défavorables et doivent être stockés dans un stockage bien préparé et entretenu (UNIDO et FAO, 2005).

I.4. Classification des épices

Il est difficile de sélectionner des critères de classification des épices. Celles-ci appartiennent à différentes familles végétales, et aussi de ces familles, différentes parties des plantes. Quant à la classification sensorielle des épices, elles sont classées en fonction de leurs caractéristiques aromatiques et de leur goût (Jessica et al., 2015).

Classification des épices sur le degré de goût
• épices chaudes.
• épices douces.
• épices et herbes aromatiques

Tableau.2. Classification des épices sur le degré de goût.

Le pouvoir brulant et piquant (chaud) des épices est mesuré d'une manière sensorielle.

I.5. Utilisations des épices

I.5.1. Utilisation nutritionnelle

Les épices apportent de la variété et du goût aux denrées de base et aux sauces, ce qui stimule l'appétit et permet de manger plus (Redhead, 1990). Les épices étant utilisées en petite quantité, elles ne contribuent pas, d'un point de vue nutritionnel, au régime alimentaire mais elles contiennent souvent des composés phénols qui permettent de protéger les denrées contre la dégradation microbienne. Toutefois, des épices séchées de manière incorrecte ou entreposées dans de mauvaises conditions peuvent elles même être contaminées par des champignons ou des aflatoxines (Redhead, 1990).

On utilise les épices comme aromates pour l'assaisonnement, la coloration et la conservation des aliments ou des boissons. Certaines épices sont aussi utilisées comme

suppléments diététiques comme le curcuma « safran de l'Inde », riche en curcumine (colorant atoxique), stable à la chaleur et peu sensible aux variations de pH, d'où leur large utilisation comme colorant alimentaire autorisé (E100) (Wichtl et Anton, 2003). Certaines épices doivent être ajoutées en début de cuisson, d'autres ne doivent pas cuire sous peine de perdre toutes leurs qualités. En règle générale, il faut ajouter les épices aux trois quarts de la cuisson pour préserver leurs propriétés nutritionnelles et gustatives (Sophie, 2006).

I.5.2. Utilisation médicinale

La plupart des plantes aromatiques et épices possèdent des vertus médicinales. En effet, beaucoup sont riches en éléments minéraux et en vitamines, notamment en vitamine C. Autre fois très employées en médecine, les plantes entrent moins souvent dans la composition des médicaments modernes. Cependant, elles sont encore très utilisées dans certains pays ou dans les médecines douces (Sophie, 2006).

De nombreuses épices possèdent des activités antimicrobiennes et antioxydantes, et sont utilisées comme antiseptiques, analgésiques et anti-inflammatoires. Elles sont également indiquées pour lutter contre les maladies du stress (Mohammedi, 2006).

Le Tableau montre quelques effets biologiques de quelques épices:

Effets biologiques	Epices et herbes aromatiques
Anti-oxydant	Toutes les épices, mais plus particulièrement cannelle, clou de girofle, ail, gingembre, citronnelle, mélisse, origan, menthe poivrée, sauge, thym
Anti-cancer (prévention)	Anis, basilic, poivre noir, carvi, agrumes, clou de girofle, fenouil, ail, gingembre, thé vert, moutarde, romarin, soja, curcuma
Fluidifiant sanguin	Câpre, cannelle, coriandre, fenugrec, ail, gingembre
Contrôle de la glycémie	Cannelle, gingembre, oignon, origan, romarin, thym
Anti-inflammatoire	Feuille de laurier, poivre noir, ail, gingembre, thé vert, origan, romarin, thym, curcuma

Anti-bactérien	Toutes les épices, mais plus particulièrement anis, basilic, feuille de laurier, poivre noir, piment doux, cardamome, céleri, cannelle, clou de girofle, coriandre, cumin, aneth, fenouil, ail, gingembre, mélisse, marjolaine, menthe, moutarde, noix de muscade, oignon, origan, persil, romarin, sauge, estragon, thym
Immunomodulation	Poivre noir, ail
Neutralisation de toxines	Carvi, agrumes, coriandre, ail, thé vert, moutarde, romarin, curcuma
Contrôle des lipides sanguins	Câpre, cannelle, agrumes, coriandre, fenugrec, ail, gingembre, origan, romarin, soja, anis étoilé, thym

Tableau.3. Effets biologiques des épices et des herbes aromatiques (Keith 2006)

I.5.3. Utilisation en cosmétique

Un grand nombre d'épices et leurs constituants sont utilisés dans l'élaboration des parfums, produits de beauté et produits de toilette. Ces essences servent à préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique tout en leur assurant une odeur agréable. Les huiles essentielles de la cannelle et du clou de girofle rentrent largement dans la fabrication des dentifrices (Sophie, 2006).

I.6. Propriétés des épices

I.6.1. Activité antimicrobienne des épices

Les agents antimicrobiens dérivés de sources telles que les huiles végétales sont utilisés depuis des siècles pour la conservation des aliments. L'industrie alimentaire utilise les épices comme agents naturels pour prolonger la durée de conservation des aliments. Des variétés d'herbes et d'épices sont utilisés comme antimicrobiens pour réduire ou éliminer les bactéries pathogènes. Les antimicrobiens d'origine végétale sont obtenus de différentes manières à partir d'huiles aromatiques liquides extraites de différentes parties de la plante (Tajkarimi et al., 2010).

I.6.2. Activité antioxydante des épices

Les épices ou les produits végétaux aromatiques sont utilisés dans les aliments et les sauces cuits ou semi-cuits. Les principes des épices tels que la curcumine et la cassinine inhibent l'oxydation des huiles et des graisses. Les principes efficaces des épices tels que l'eugénol (clou de girofle), le linalinol (coriandre), la biparine (poivre noir), le zinger (gingembre) (**Shobana et Naidu, 2000**) et le quinaldéhyde (cumin) ont été rapportés pour inhiber la peroxydation des lipides (**Shobana et Naidu, 2000**).

I.6.3. Toxicité des épices

Les épices et les herbes aromatiques ne posent aucun problème de toxicité lorsqu'ils sont utilisés en l'état de préparations culinaires, leur puissance aromatique limitant naturellement leur dose d'emploi bien en-deçà des risques de toxicité (**Kneifel et Berger, 1993**).

Par contre, il est soupçonné que les épices et leurs huiles essentielles jouent un rôle dans l'induction du cancer plusieurs fois. Cette incertitude dépend en partie du grand nombre de composés "exotiques" présents dans les épices et les arômes (**Buchanan, 1979**). Les composés à base de plantes et les épices sont bien connus, les composés présents naturellement dans les épices et les doses d'utilisation les plus toxiques sont également limitées (**Kneifel et Berger, 1993**).

I.7. Contamination des épices

Les épices comptent parmi les produits de la chaîne alimentaire les plus contaminés. La contamination des épices est tributaire d'un bon nombre de facteurs dont, l'origine des plantes, l'écologie du milieu, les conditions de transport (hygrométrie et température), ainsi que le mode de récolte, de collecte, de préparation, du séchage, du stockage, et du conditionnement. Parmi les contaminants identifiés dans les épices, on relève: des bactéries, des mycotoxines (aflatoxine, ochratoxine), des pesticides, des solvants et des métaux lourds (**Chirane et al., 2008**).

Parmi les bactéries identifiées dans les épices, on distingue, le *Bacillus cereus*, le *Bacillus subtilis*, l'*E. coli*, le *Staphylococcus aureus*, la *Shigella*, la *Salmonella*, le *Vibrio*, le *Clostridium perfringens* et la *Yersinia enterocolitica* (**Chirane et al., 2008**).

II. Généralités sur le *Bacillus cereus*

II.1. Taxonomie et Phylogénie du groupe *Bacillus cereus*

B. cereus est une bactérie correspondant à des bacilles à coloration Gram positive. Ces bacilles sont assez volumineux, mesurant 1 à 1,8 µm de diamètre par 4 à 8 µm de long et forment habituellement de courtes chaînettes, Les colonies peuvent avoir des formes très variables, mais néanmoins distinctives, ce qui permet de les reconnaître facilement. (De Vos et al., 2009).

Cette bactérie est dite ubiquitaire (Guinebretière et al., 2008) ce qui explique donc que nous la retrouvons dans l'environnement et notamment dans les sols où elle semble pouvoir faire des cycles complets de germination, croissance et sporulation (Margulis et al., 1998). Ceci explique pourquoi elle est retrouvée sur les matières premières utilisées en agro-alimentaire. *B. cereus* est une bactérie capable de produire des spores, lui permettant notamment de résister aux traitements thermiques.

B. cereus aussi appelé *B. cereus* sensu stricto, fait partie d'un ensemble d'espèces apparentées et regroupées sous le nom de *B. cereus* sensu lato (De Vos et al., 2009).

Ce groupe comprend 7 espèces génétiquement proches qui se différencient principalement par leurs caractères physiologiques, morphologiques ou de virulence.

Groupes phylogénétiques	Espèces	Gamme de températures de croissance (°C)	Toxicité
I-1 I-2	<i>B.pseudomycooides</i>	10-43	ND
II	<i>B. cereus</i> , <i>B.thuringiensis</i>	7-40	Modérée
III-1 III-2 III-3 III-4	<i>B. cereus</i> , <i>B.thuringiensis</i> , <i>B.anthraxis</i>	15-45	Élevée
IV-1 IV-2 IV-3	<i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i>	10-45	Modérée/élevée
V	<i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i>	8-40	Modérée

VI-1 VI-2	<i>B.mycoides</i> ,, <i>B.thuringiensis</i> <i>B.weihenstephanensis</i>	5-37	Faible
VII	<i>B.cytotoxicus</i>	20-50	Élevée

Tableau.4. Groupes phylogénétiques, Espèces ; Gamme de températures de croissance (°C) et Toxicité (Guinebretiere et al., 2010)

II.3. Caractéristiques de *Bacillus cereus*

II.3.1. *Bacillus cereus* dans les aliments

Comme vu précédemment, *B. cereus* est une bactérie ubiquitaire que l'on retrouve principalement dans les sols. De ce fait, *B. cereus* est retrouvé dans des aliments très variés et représente donc un problème pour l'industrie agro-alimentaire. Les produits céréaliers comme le riz (Lee et al., 1995; Melling et al., 1976; Mortimer and McCann, 1974) ainsi que les fruits et légumes (Stenfors Arnesen et al., 2008) sont fréquemment mis en cause lors d'intoxications alimentaires dues à *B. cereus*.

B. cereus est plus souvent retrouvé dans des produits d'origine végétale contrairement à *Clostridium perfringens* qui lui est surtout retrouvé dans des produits carnés (EFSA, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2015b).

B. cereus était présent sur 14 % des échantillons d'oignons et de courgettes, sur 33 % des concombres, 43 % des carottes, 90 % des tomates et 100 % des échantillons de poivre (Valero et al., 2002).

De plus, *B. cereus* est également retrouvé dans des produits laitiers, comme des crèmes et des crèmes glacées, dans des poudres de lait ou encore dans du lait fermenté ou pasteurisé (EFSA, 2016; Hauge, 1950; Wong et al., 1988).

II.3.2. Thermo-résistance de *Bacillus cereus*

B. cereus peut être retrouvé sous deux formes bien distinctes, sous forme de spores ou de cellules végétatives dans différents milieux comme des milieux de laboratoire ou des aliments.

Les spores de *B. cereus* sont résistantes à la chaleur et peuvent donc résister à des processus de décontamination des produits alimentaires comme l'étape de pasteurisation. Plusieurs études ont caractérisé la thermo-résistance des spores en déterminant plusieurs paramètres (Afchain *et al.*, 2008; Carlin *et al.*, 2006; Choma *et al.*, 2000; Luu-Thi *et al.*, 2014).

La thermo-résistance des spores de *B. cereus* varie en fonction des souches (Wells-Bennik *et al.*, 2016).

Toutefois, la thermo-résistance des spores de *B. cereus* varie en fonction du groupe phylogénétique (Luu-Thi *et al.*, 2014; Wells-Bennik *et al.*, 2016).

En particulier, les souches mésophiles du groupe III productrices de toxine émétique sont plus résistantes que les souches diarrhéiques (Carlin *et al.*, 2006).

II.3.3. *Bacillus cereus*, agent de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC)

Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est définie comme l'apparition chez au moins deux cas groupés, d'une symptomatologie similaire, le plus souvent de type gastro-intestinal dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire. De multiples micro-organismes (bactéries, virus, parasites) ou leurs toxines sont susceptibles de contaminer les denrées alimentaires et d'engendrer diverses pathologies (INVS, 2009).

L'incidence réelle de *B. cereus* en tant que pathogène alimentaire est difficile à évaluer pour plusieurs raisons. D'une part, les toxi-infections à *B. cereus* ne sont pas à déclaration obligatoire: elles sont donc probablement sous-estimées dans les listes officielles. D'autres parts, la courte durée et la bénignité des symptômes ne motivent pas le patient à consulter un médecin. Enfin, les cas de TIAC à *B. cereus* ne sont pas toujours attribués à cette bactérie car le symptôme émétique ressemble à une toxi-infection à *Staphylococcus aureus* et le symptôme diarrhéique peut être associé à une toxi-infection à *Clostridium perfringens*. C'est dans ce contexte que l'Institut National de Veille Sanitaire

(INVS) a classé *B. cereus* comme étant la quatrième cause de TIAC en France (INVS, 2009).

II.3.3.1 Pouvoir pathogène

Il existe deux types de syndromes causés par *B. cereus*, certains sont décrits comme diarrhéiques et d'autres comme émétiques. Les souches à l'origine de ces syndromes sont souvent dénommées « souches diarrhéiques » et « souches émétiques ».

Le syndrome diarrhéique est causé par l'ingestion de *B. cereus* sous forme de spores ou de cellules végétatives (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

Une concentration de 10^5 UFC par gramme d'aliment peut provoquer ce type de syndrome (Granum *et al.*, 1995).

Les symptômes sont dus à des toxines diarrhéiques produites au niveau intestinal. Ces toxines ne résistent pas aux traitements thermiques ni au pH acide lors du passage dans l'estomac (Dromigny, 2008).

Ceci signifie que le syndrome diarrhéique nécessite que les spores et/ou cellules végétatives survivent au passage dans l'estomac pour pouvoir produire ces toxines par la suite, dans l'intestin. Le transit des cellules dans l'estomac dure au minimum 6 h et 4 h dans l'intestin grêle (Dromigny, 2008; Granum *et al.*, 1995) (Fig 1).

Les symptômes liés à ces entérotoxines surviennent après minimum 6 h suite à l'ingestion du produit alimentaire et durent au maximum une journée (Granum *et al.*, 1993).

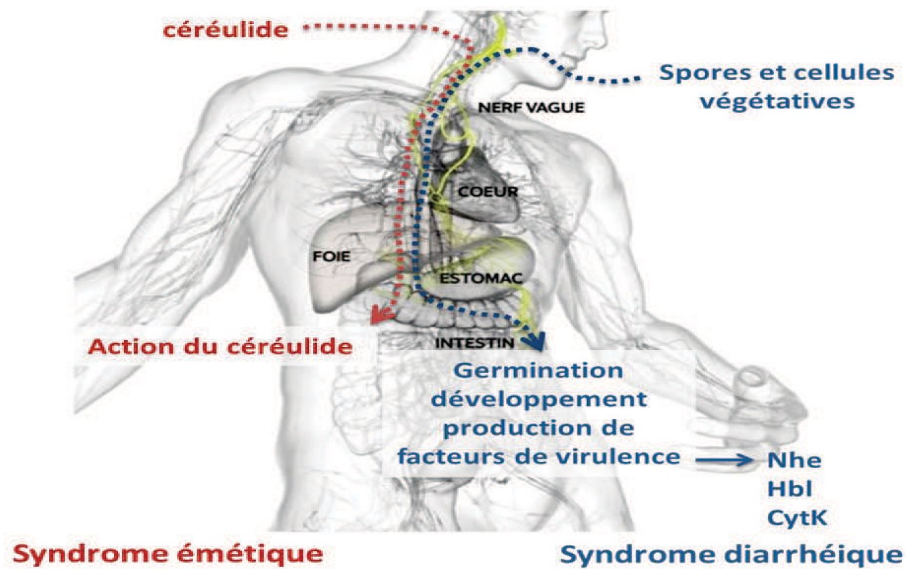


Figure 1 : Schéma représentant les deux types d'intoxication possibles par *B. cereus*

II.3.3.2 Caractéristiques des spores

II.3.3.2.1 Généralités

Les spores de bactéries ont été étudiées pour la première fois par Cohn et Koch en 1876 (Gould, 2006). Elles font partie des formes les plus résistantes des organismes vivants (Carlin, 2011).

La formation des spores permet à la bactérie de survivre et résister à différents stress environnementaux tels que la chaleur, la dessiccation, les UV et les radiations, la digestion enzymatique ou encore les produits chimiques (Nicholson et al., 2002; Setlow, 2006).

De plus, les spores peuvent survivre pendant de très longues périodes dans des environnements pauvres en nutriments. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté que les spores du groupe *Bacillus* pouvaient survivre plusieurs millions d'années dans des niches écologiques spécifiques (Cano and Borucki, 1995; Vreeland et al., 2000).

En raison de la persistance des spores et de l'ubiquité des microorganismes formant des spores, les spores sont des contaminants fréquents de denrées alimentaires (Vreeland et al., 2000; de Clerck et al., 2004a; de Clerck et al., 2004b; Scott et al., 2007). Les mécanismes de sporulation, germination et résistance sont beaucoup étudiés chez *Bacillus* avec comme modèle *B. subtilis*.

II.3.3.2.2. Les spores de *Bacillus cereus* dans les aliments

Les spores de *B. cereus* sont présentes dans quasiment toutes les catégories d'aliment. Des produits secs ou déshydratés, tels que les épices, les herbes aromatiques, certains légumes, les céréales et les farines, sont fréquemment contaminés à des niveaux variables par *B. cereus*. Ces matières premières entrant dans la composition d'un produit fini, sont des sources potentielles de contamination. Par ailleurs, les spores de *B. cereus* possèdent de fortes capacités d'adhésion aux surfaces en acier inoxydable et peuvent s'accumuler dans les équipements de transformation qui peuvent alors devenir des réservoirs de spores (ANSES, 2011).

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. Les aliments associés à des toxi-infections à *B. cereus* sont fréquemment, mais pas exclusivement, traités thermiquement et/ou ne sont pas refroidis de manière adéquate après leur préparation et avant la consommation. Plusieurs intoxications avec symptômes émétiques ont été causées par des produits amylicés (plats à base de riz ou de pâtes). Sans être limitatif, les plats cuisinés, les produits agrémentés d'épices, d'herbes ou d'aromates, les aliments déshydratés reconstitués par addition d'eau chaude (potages en poudre, purées de pommes de terre préparées à partir de flocons, lait en poudre, etc.) ou cuits à l'eau (pâtes, riz, semoule) conservés à une température permettant la croissance de *B. cereus* (températures comprises entre 4 °C et 55 °C), et avec une consommation différée, figurent parmi les aliments à risque, au regard du danger *B. cereus* (ANSES, 2011).

II.1.1 Généralités :

La partie pratique a été réalisée au niveau du laboratoire pédagogique de biologie à l'université de laghouat elle comporte :

- Réalisation d'une enquête descriptive sur un échantillon de 100 personnes questionnées.
- Prélèvement des échantillons d'épices à analyser
- Isolement et dénombrement des spores de *B. cereus* dans les épices prélevées
- Etude de l'influence du pH et de Aw de milieu sur la croissance des souches isolées.

II.1.1.1 Présentation de la zone d'étude

Située au cœur du pays à 400 km au sud de la capitale Alger, la wilaya s'étend sur une superficie de 25 000 km². Région pastorale de l'Algérie, elle possède également le plus grand gisement de gaz naturel d'Afrique avec une réserve estimée à plusieurs milliards de mètres cubes.

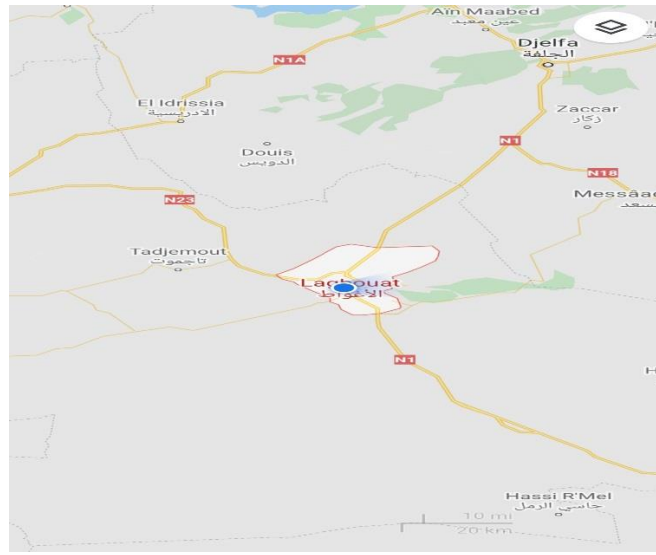


Figure 2 : carte géographique de la wilaya de Laghouat .

II. 1.2 Techniques d'Enquête et collecte de l'information

Afin de rechercher la fréquence, l'intérêt, le mode d'utilisation des épices , nous avons proposés à travers notre étude d'effectuer une enquête qui touche les opérateurs qui utilisent ces condiments restauration établissement femme au foyer..... de la région de Laghouat. Des fiches d'enquêtes comportant toutes ces informations sont distribuées à 100 personnes dont la majorité sont des femmes au foyer.

II.1.2.1 Investigation au niveau des herboristes

Sur la base des investigations effectuées, notre choix s'est porté sur les épices citées par les personnes questionnées et procurés au niveau des différents herboristes.

Le choix des épices pour l'étude est basé également sur une investigation effectuée au niveau de quatre herboristes dans la région de Laghouat.



Figure 03 : Epices vendu en vrac

II.1.2 Echantillonnage et prélèvement des épices

Les échantillons ont été prélevés directement auprès des foyers de différents endroits de la région de Laghouat.

_L'échantillonnage a été réalisé seulement à partir des épices broyées .

_4 Endroits ont été sélectionnés d'une manière aléatoire.

_Les épices ayant servi à cette étude étaient conditionnées dans leurs emballages en plastique ou dans des pots stériles.

_Les échantillons ont été transportés au laboratoire en vue d'être analysés le jour même.

Endroits / Epices	Centre Ville	Wiam	Maamoura	11 Decembre	Nombre de prélèvement
Poivron noir.	*	*	*	*	4
Gingembre.	*	*	*	*	4
Cumin.	*	*	*	*	4
Cannelle.	*	*	*	*	4
Curcuma.	*	*	*	*	4
Carvi.	/	*	*	*	3
Poivron R.	/	*	*	*	3
Mélange.	*	*	*	*	4

Tableau 5 : Poste et nombre de prélèvement des épices au niveau herboristes de la commune de Laghouat.

II.1.3 Isolement et de dénombrement de spores de *Bacillus cereus*

L'isolement et l'énumération à partir d'échantillons des épices ont été réalisés en utilisant des milieux de cultures sélectifs conventionnels (**Fricker et al., 2008**).

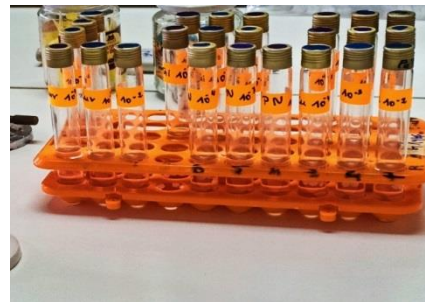
II.1.3.1 Évaluation de la charge initiale en *B. cereus* dans les épices

Une série de dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-5} est réalisée à partir des épices broyées et ses dilutions seront étalées sur de la gélose MYP (*Annexe 02*) ; grâce à des étaleurs stériles. La première dilution est homogénéisée pendant 10 min et les tubes à essai sont homogénéisés pendant 30 secs à l'aide d'un vortex.

Cette étape consiste à prendre 10g d'épices préalablement mélangé avec une cuillère stérile et de les placer dans un flacon qui contient 90 ml d'EPT (*Annexe 02*) Le tout est homogénéisé pendant 10 min qui est en suite traité thermiquement à 80°C pendant 10 min. À partir des huit solutions mères, des séries de dilutions sont réalisées et étalées sur des boites de Pétri contenant de gélose MYP (*Annexe 02*), ensuite incubées à 30°C pendant 24h_48h.



a



b



d



c

Figure 04 : Echantillonnage et Préparation des dilutions décimales

La détermination du nombre de *B. cereus* sur les boîtes de Pétri se fait après 48h passée à l'incubateur. Le dénombrement se fait par un appareil de compteur colonies et les colonies de *B. cereus* ayant une couleur rose caractéristique et éventuellement entourée d'un halo blanc sur le gélose MYP.

II.1.3.2 Dénombrement de *Bacillus cereus*

Après l'incubation, on retient les boîtes contenant moins de 150 colonies, et si possible, sur deux dilutions successives. Compter sur chaque boîte les colonies présumées de *Bacillus cereus*. Celles-ci sont de couleur rose (mannitol-négatif) et presque toujours entourées d'un halo de précipité, indiquant la production de lécithinase.

La charge en microorganismes était déterminée suivant la formule de la norme AFNOR (1994) :

$$N = \Sigma C / V (n_1 + 0,1n_2) d$$

Où :

n_1 : Nombre de boîtes de la toute première dilution à laquelle les colonies ont pu être comptées.

n_2 : Nombre de boîtes de la dilution qui précède la toute première dilution à laquelle les colonies ont pu être comptées.

d : taux de dilution de la première dilution à laquelle les colonies ont pu être comptées.

N : est le dénombrement moyen du groupe *B. cereus* en UFC/g ou UFC/mL.

ΣC est la somme des colonies dans toutes les boîtes retenues.

Les souches de *Bacillus cereus* sont vérifiées par la coloration de Gram et par la formation de l'endospore. La catalase positive, la mobilité à l'état vital, la réaction positive à la coloration de Gram et la visualisation de l'endospore (*Annexe 03*) par observation microscopique, sont les quatre critères recherchés, ils sont suffisants pour affirmer

l'appartenance au genre *Bacillus cereus* selon (Gordon *et al.*, 1973) et (Clauset Barkely, 1986)

II.1.3.3 Conservation des souches :

Pour déterminer les micro-organismes prédominants dans chaque échantillon, des colonies avec une morphologie distincte représentant les différents types obtenus sur boîte de pétri, sont transférées dans des tubes de géloses nutritives inclinées et incubées pendant 24h à 37°C. Les souches sont ensuite conservées au réfrigérateur à une température de 4°C.

II.1.2 L'identification des souches isolées

L'identification est basée sur la détermination des caractères morphologiques et biochimiques (Lamouliatte *et al.*, 1992). Sur chacune des boîtes servant aux dénombrements, nous avons classé les colonies en plusieurs catégories selon leur aspect macroscopique. Dans chaque catégorie, une colonie a été choisie aléatoirement pour réaliser les premiers tests d'orientation. Chaque colonie sélectionnée est purifiée sur milieu gélosé nutritive. Pour une identification préliminaire de ces bactéries, nous sommes basés sur des études :

Morphologique (les formes caractéristiques des colonies, leurs arrangement, la présence ou non de spores et leur coloration de Gram, coloration des spores).

Etude biochimiques (test de mobilité, test de catalase, test de type respiratoire)

II.1.2.1 Etude macroscopique

II.1.2.1.1 Caractérisation phénotypique

II.1.2.1.2 La morphologie des colonies et des cellules

L'étude macroscopique permet de déterminer la morphologie des colonies obtenues sur des milieux de cultures (taille, la forme des colonies,.....). L'observation microscopique est nécessaire pour définir la forme des cellules bactériennes (coques ou bacilles). La coloration de Gram des isolats après 24 heures de culture sur GN permet de déceler les formes morphologiques de différentes cellules bactériennes. (carr *et al.*, 2002).

II.1.2.2 Etude microscopique :

II.1.2.2.1 Coloration au bleu de méthylène :

Les bactéries sont colorées en bleu sombre. Cette coloration est intéressante pour l'observation rapide des frottis mais elle permet seulement l'étude de la morphologie des bactéries.

II.1.2.2.2 Coloration de Gram :

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour distinguer et classer les bactéries. (*Annexe 03*)

II.1.2.2.3 Coloration des spores par le vert de malachite :

La spore bactérienne est organe facultatif. On la rencontre seulement chez certaines espèces bactériennes (généralement Gram positif: *Bacillus*). (*Annexe 03*)

II.1.2.3 Etude biochimiques (les tests d'orientation)

II.1.2.3.1 Test de catalase

La catalase est une enzyme respiratoire capable de dégrader l'eau oxygénée (H₂O₂) en eau et O₂ (*Annexe 04*).

II.1.2.3.2 Test de Mannitol mobilité :

Le milieu mannitol mobilité nitrate est un milieu permettant de mettre en évidence: utilisation de mannitol ; la réduction des nitrates ; la mise en évidence de la mobilité bactérienne ; Ensemencement en pique centrale (*Annexe 04*).

II.1.2.3.3 Recherche de lécithinase :

Ce test a été réalisé par l'ensemencement des souches sur une gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile. Après 24 à 72 heures d'incubation à 37°C, l'apparition de zone claire autour de la culture prouve que la souche possède la lécithinase (*De Vos et al., 2009*).

II.1.3. 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) en suivant les étapes décrites ci-dessous:

- Un volume de 0,5 mL de la pré-culture était étalé sur la surface du milieu nutritif gélosé en boîtes de Pétri supplémenté par 40 mg/l de MnSO₄ et 100mg/l de CaCl₂.
- Les boîtesensemencées ont été incubées à 30°C pendant (5 à 7) jours un temps nécessaire à la sporulation de la population bactérienne après d'incubation.
- Les spores de *Bacillus* spp ont été alors récoltées à l'aide d'une spatule stérile en raclant la surface de la gélose.
- Les spores récupérées ont été mises en suspension dans un volume de 20mL d'eau distillée stérile à l'aide d'une pipette pasteur stérile.
- La suspension de spores préparée était centrifugée à 10000 g pendant 15 min.
- Le culot était récupéré et remis dans 20 mL d'eau distillée stérile. Cette opération était renouvelée deux fois.
- Le culot obtenu était repris par un mélange eau/éthanol (V/V).
- Le mélange était placé à 4° C pendant 12h afin d'éliminer le reste des formes végétatives.
- Le mélange était centrifugé à 10000g pendant 15min.
- Les culots traités subissaient une nouvelle fois trois cycles de lavage toujours à l'eau distillée dans les mêmes conditions de la centrifugation. Tous les manipulations d'agitation ont été effectuées manuellement avec retournement doux afin d'éviter la formation des floccs.
- Les culots récupérés précédemment ont été ensuite re-suspendus dans un volume minimum d'eau distillée stérile de façon à avoir une forte concentration en spores (environ 1010 spores/mL).
- La concentration en spores était estimée par dénombrement en masse en milieu nutritif gélosé.
- Le stock de spores de *Bacillus* spp obtenu était conservé à 4°C dans de l'eau stérile pour une éventuelle identification moléculaire ou des études approfondies des isolats.



Figure 5 : Préparation de stock de spores.

II.1.4. Etude de l'influence des conditions de milieu sur la croissance de *Bacillus cereus* :

Les souches de *Bacillus cereus* utilisées a été réalisé à partir d'un isolement sur des tubes de géloses nutritives inclinées. Une colonie est inoculée dans un tube de 5 ml de bouillon cœur-cerveille qui est incubé 24 heures à 30_C.

Chaque facteur sera étudié indépendamment des autres.

II.1.4.1 Effet de pH sur la croissance des souches de *Bacillus cereus*

L'étude de ce paramètre vise à tester son influence sur la croissance de *Bacillus cereus* isolées à partir des épices..

Pour déterminer les conditions de culture les souches ont été cultivées à différents pH sur le milieu BHIB

pH	4,3	4,8	5,5	6	9
-----------	------------	------------	------------	----------	----------

Tableau.10 Les valeurs du pH

Pour déterminer Le pH de milieu en plongeant directement l'électrode d'un pH-mètre dans un tube de BHIB.

La valeur du pH a été lue sur l'écran du pH-mètre. Le pH a permis de définir la nature de milieu.

Les ajustements de pH ont été réalisés grâce à des solutions standards de (NaOH) et (HCl) avant autoclavage.

Après préparation du milieu de culture à différents pH et à partir des souches isolées conservées sur GN inclinées on procède à l'ensemencement des différents tubes à essai. Puis le tout est incubé pendant 24 h à 37°C. (Bégot et al., 1997).

II.1.4.2. Effet de l'activité d'eau

Avec un repiquage Les souches qui sont récupérées sont placées dans des tubes qui contiennent le milieu BHIB à différentes concentrations de NaCl en donnant une gamme ascendante d'Aw. (Bégot et al., 1997).

AW	0,983	0,971	0,962	0,951	0,931
-----------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------

Tableau11 Les valeurs de l'activité d'eau

Résultats Discussion

II.2.1 Isolement et identification de souches de *B. cereus* :

30 échantillons d'épices ont été analysés par ensemencement en surface du milieu Mossel complet. L'identification des souches isolées a été confirmée par observation macroscopique, microscopiques ainsi que la réalisation de certains tests biochimiques

II.2.1.2 Tests de confirmation de l'appartenance au groupe de *B.cereus* .

II.2.1.2.1 Aspect macroscopique :

Les souches ayant un phénotype caractéristique de *B. cereus sensu lato*, c'est-à-dire des colonies plates à bordure lisse ou irrégulière, de couleur rose attestant qu'elles ne fermentent pas le mannitol étaient entourées d'un halo plus ou moins grand, indiquant la capacité des souches à dégrader la lécithine présente dans le milieu MYP



Figure 6: Colonies caractéristiques des espèces de *B. cereus sensu lato* sur Milieu Mossel

Après incubation à 30°C pendant 72 heures avec une lecture toutes les 24h, certaines colonies obtenues sur gélose nutritive. Elles sont blanches cassées, une forme irrégulière avec des bords ondulés, ils ont des textures mates avec des colonies lisses et humides. Cet aspect est caractéristique de certaines espèces du groupe *B.cereus*

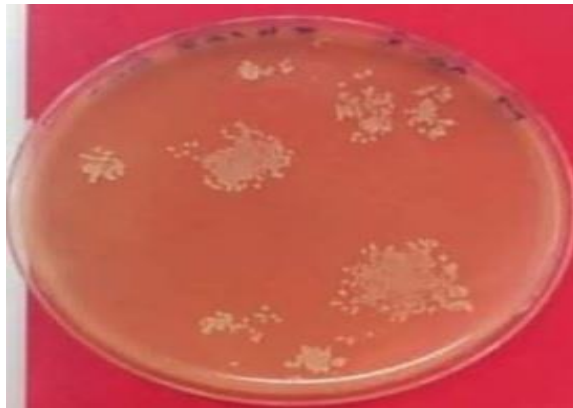


Figure 7: souche isolée et repiquée sur milieu GN

II.2.1.2 Aspect microscopique:

II.2.1.2.2.1. La coloration au bleu de méthylène :

La coloration au bleu de méthylène des isolats montre qu'il se présente sous forme bacillaire mobile .

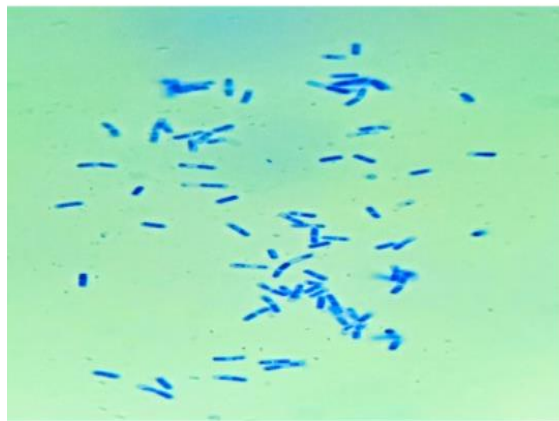


Figure 8: Résultats d'observations microscopiques après la coloration de bleu de méthylène (Observation par microscope optique G×100 a immersion).

II.2.1.2.2. Coloration de Gram :

La coloration de Gram d'une culture jeune a révélé que l'isolat est Gram positif aux extrémités arrondies et souvent disposés en chaînettes.

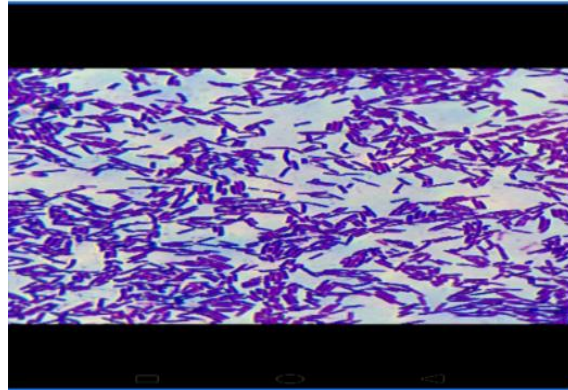


Figure 9: Résultats d'observations microscopiques après la coloration de Gram (Observation par microscope optique G×100 a immersion)

II.2.1.2.3 Coloration des spores :

La coloration au vert de malachite des isolats montre la présence et la position des spores dont ces dernières sont colorées en vert et les formes végétatives en violet

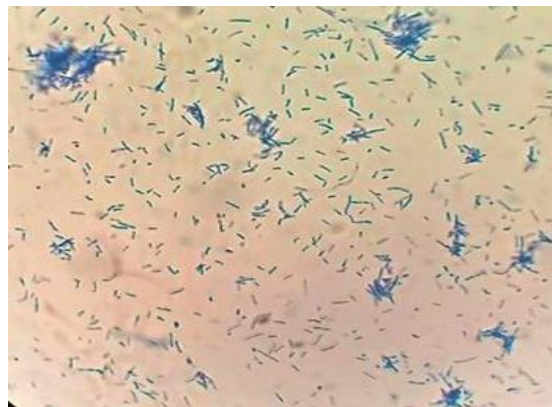


Figure 10: Résultats d'observations microscopiques après la coloration au vert de malachite (Observation par microscope optique G×100 a immersion)

II.2.2.1 la Prévalence de *B. cereus* sensu lato dans les échantillons analysés:

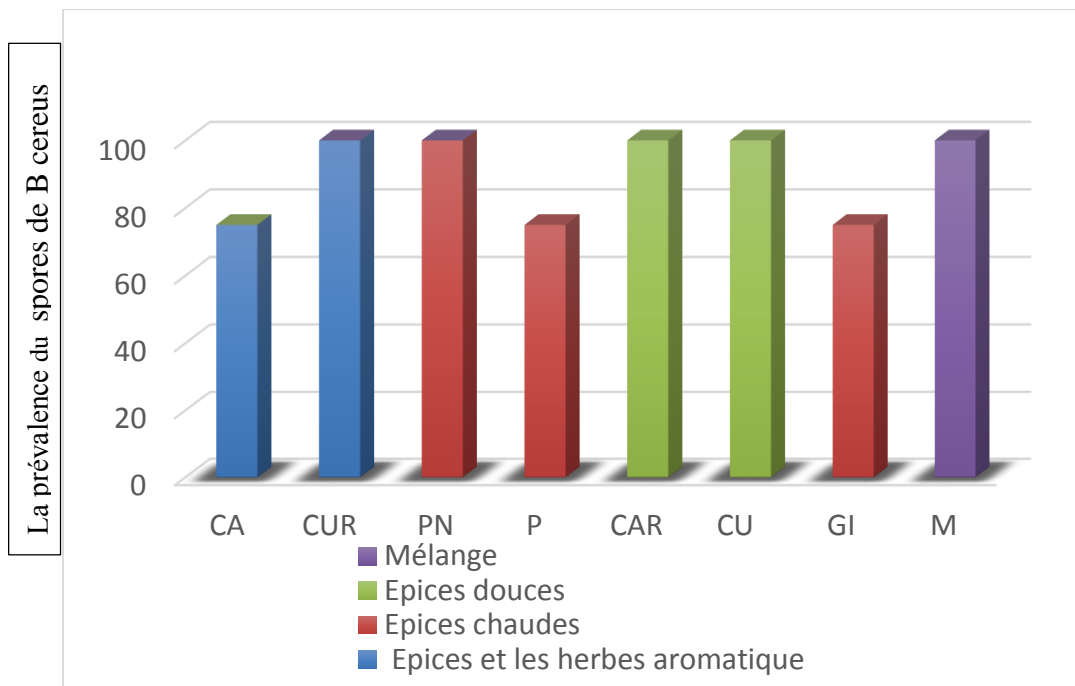


Figure 11:prévalence des spores de *B cereus* dans les différentes épices

Une collection de 30 épices a été analysée pour étudier la prévalence le dénombrement des spores du groupe *B.cereus* .

Au total, la présence de *B. cereus* a été suspectée dans 23 échantillons d'épices 76.6% par culture sur la gélose MYP.

La prévalence de *B. cereus* sensu lato est dépend de l'épice ;les épices chaudes sont les moins contaminés par rapport aux autres épices analysé

D'après les travaux de **Sucheela (2007)** La composition chimique de l'épice joue un rôle dans son activité antimicrobienne. En effet, les épices chaudes tel que le gingembre et le poivron rouge présentent une forte activité antimicrobienne qui est probablement à l'origine de cette variabilité de prévalence.

II.2.2.2 Dénombrement de *B. cereus* sensu lato dans les échantillons analysés

Sur le total des échantillons analysés 8.92 % Ont enregistré des concentrations inférieure à 3log UFC/ g. Tandis que 17,39% ont montré une contamination en spores de *B cereus* qui varie entre 3 et 4 log UFC/ g.

Nos résultats montraient aussi que 50.29%des échantillons analysés ont une concentration supérieur à la norme 5 log ufc /g seuil inacceptable par la réglementation, algérienne.

La croissance était faible inférieures à 4 log UFC/ g pour le paprika et le Gingembre.

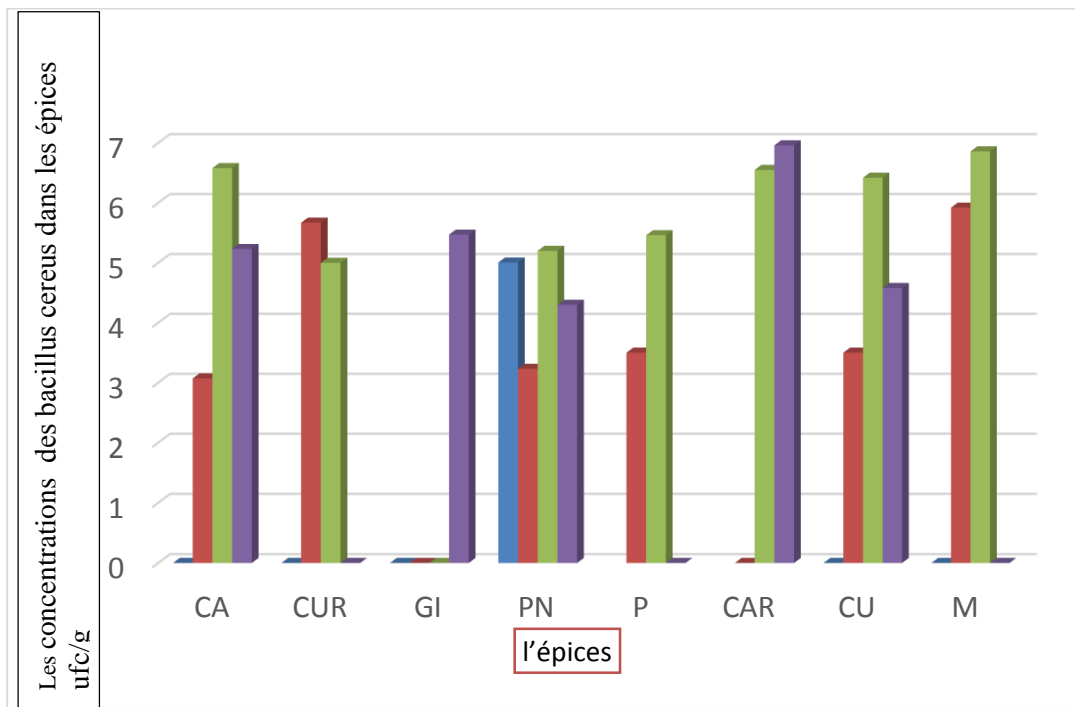


Figure 12 :Les concentrations des bacillus cereus dans les épices ufc/g

Ces variations des résultats ont été attribuées probablement à la composition chimique des épices (facteurs antimicrobiens) et conditions environnementales de stockage (Meckee, 1994).

II.2.3 Caractéristiques biochimiques des isolats :

II.2.3.1 Identification biochimique :

La mise en évidence des enzymes respiratoire (catalase) et les activités hydrolytiques extracellulaires (lécithinase) a révélé que celles-ci sont présentes chez les souches testées. Ces activités sont variables et reflètent les potentialités propres à chaque souche.

Test	Résultat	interprétation
Catalase.	Apparition de bulles de gaz	Le teste de catalase était positive
Mannitol	Le tube Apparaître rouge partout	Indiquant que les bactéries sont mobiles
Test lécithinase.	l'apparition de zone claire autour de la culture	la souche possède la lécithinase

Tableau 8: Résultats et interprétation des tests biochimiques

II.2.4. Résultats de l'influence des facteurs environnementaux sur la croissance des *B. cereus sensu lato* :

PH	GI	M	P	CU	PN
4,3	-	-	-	-	-
4,8	-	-	-	-	-
5,5	+	+	+	-	+
6	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+

Tableau 12: Effet du pH sur la croissance des souches isolées.

Les résultats obtenus montrent que les souches présumées *B. cereus* se développent le plus souvent dans des milieux neutres ou légèrement alcalins par contre la diminution du pH qui peut atteindre 4.3 4.8 est souvent responsable de l'arrêt total de la croissance. Ces résultats sont en concordance avec les résultats de (Carlin et al., 2013).

B. cereus ne semble pas particulièrement résistant au pH, et seulement quelques souches peuvent croître à pH4,3 ;Le pH minimal de croissance varie selon le groupe génétique .
(Carlin et al., 2013).

Les souches psychrotrophiques du groupe VI sont les plus sensibles au pH ; certaines souches de ce groupe ne pouvant croître à un pH de 4.8 contrairement à toutes les souches des autres groupes (Carlin et al., 2013).

Aw	GI	M	P	CU	PN
0,983	+	+	+	+	+
0,971	+	+	+	+	+
0,962	+	+	+	+	-
0,951	-	-	-	-	-
0,931	-	-	-	-	-

Tableau 13:l'effet de Aw sur la croissance des souches.

L'activité de l'eau (Aw) est inversement proportionnelle à la pression osmotique d'un composé.

Les résultats obtenus montrent que la diminution de Aw (0,951-0,931) est responsable de l'arrêt total de la croissance des souches.

Touts les souches testées ont pu pousser à une Aw qui varie entre (0,983_0,962)Ces résultats sont en concordance avec les résultats de **Kramer et Gilbert (1989)**

Ce qui confirme que Aw est un facteur limitant du développement microbien dans les aliments.

Les limites de croissance Aw sont également sujettes à variation selon le groupe génétique Les quelques souches qui ont pu se développer dans une BHI avec 10% de Nacl comme humectant donnant une Aw de 0.929 appartenaient aux groupes VII, IIet IV, alors qu'aucune des souches du groupe qui ont pu se développer dans BHI avec 6%de Nacl (aw = 0,960).

En termes généraux la gamme relativement large de limites inférieures de la croissance cellulaire végétative a été signalée par **Kramer et Gilbert (1989)** (limites supérieures à pH 4,35-4,90 et aw minimale à 0,912_0,950) reflète généralement la diversité génétique au sein du groupe *B. cereus*.

Conclusion

Les épices pouvaient être contaminées par différents microorganismes notamment des germes pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires comme *B. cereus*

Les objectifs de cette étude étaient de rechercher et dénombrer les spores de *B. cereus* sensu lato dans les épices utilisées dans la région de laghouat ainsi que les facteurs environnementaux qui commandent leurs développements

Les résultats de cette recherche montraient que 76.6% des échantillons analysés étaient contaminés par des spores de *B. cereus* sensu lato .

L'ensemble des échantillons contaminés par *B. cereus* sensu lato ont des concentrations comprises entre 1 à 6.96 log (ufc/g).

L'étude biochimique des souches a été basée sur la recherche de catalase, l'utilisation du mannitol et de l'hydrolyse de la lécithine. Les souches isolées ont été tous catalase positive. , capables d'hydrolyser la lécithine et incapable d'utiliser le mannitol ,chose qui peut confirmer l'appartenance de ces isolats au groupe de *B.cereus* sensu lato

La majorité des souches testées ont la capacité de se développer dans des pH neutres ou alcalins et seulement quelques souches peuvent croître à un pH acide 4,3

La diminution de A_w (0,951-0,931) est responsable de l'arrêt total de la croissance des souches.

Selon la gamme relativement large de limites inférieures et supérieurs du pH et A_w qui favorisent la croissance des cellules de *B . cereus* Ph : 5.5 -9 / a_w ,0,983_0,962) reflète généralement la diversité des espèces isolées appartenant au .groupe *B. cereus*.

Cette étude ouvre la voie à d'autres travaux qui peuvent toucher :

- * L'identification moléculaire des isolats obtenus (séquençage de gène panC)
- * Élargir la zone d'études et le nombre des échantillons analysés
- * Etudier la thermorésistance et la croissance de *B.cereus* dans une matrice alimentaire
- * Etude d'autres facteurs environnementaux tels que : Température ,besoins nutritifs ...

Bibliographie

Abbas A.A. (2014). Effet de l'absence d'oxygène sur la capacité de sporulation et les propriétés de spores des *B. cereus*. Thèse de doctorat, Université d'Avignon et les pays de Vaucluse. P 12-29.

Abou Donia, M. A. (2008). Microbiological quality and aflatoxinogenesis of Egyptian

Afchain, A.L., Carlin, F., Nguyen-the, C and Albert, I. (2008). Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurised and chilled foods. *Int. J. Food Microbiol.* V128, P165-173. and herbs retailed on the Austrian market. *Journal of Food Protection*, 57, and its food poisoning toxins. *Fems Microbiol. Rev.* 32, 579-606.

ANSES. (2011). *Bacillus cereus* : Famille des Bacillaceae, Genre Bacillus, Bactérie. *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non gastrointestinal infections. *Int. J. Food Microbiol.* 17, 269-279.

Banerjee, M., & Sarkar, P. K. (2003). Microbiological quality of some retail spices

Baxter, R., & Holzappel, W. H. (1982). A microbial investigation of selected spices, herbs, and additives in South Africa. *Journal of Food Science*, P570–578.

Bernard, A. (2012). Les épices c'est malin, cannelle clou de girofle, poivre, leurs biens faits et toutes leurs utilisations méconnues pour la santé. *La beauté et la maison*, P 16.

Bhat, R., Geeta, H., & Kulkarni, P. R. (1987). Microbial profile of cumin seeds and chili black pepper and turmeric powder sold in retail shops in Bombay. *Journal of Food*

Buchanan, R. (1979). Toxicity of Spices Containing Methylene dioxybenzene Derivatives. *Journal of Food Safety* V1. P275-293.

Cano, R.J., Borucki, M.K. (1995). Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40- million-year-old Dominican amber. *Science* V268, P1060-1064.

Carlin, F. (2011). Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology* V28, P177-182.

Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., Salkinoja Salonen, M., Svensson, B., Nguyen-the, C and Ehling-Schulz, M. (2006). Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Food Microbiol.* V109, P132-138.

Choma, C., Guinebretière, M.H., Carlin, F., Schmitt, P., Velge, P., Granum, P.E and Nguyen-The, C. (2000). Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *J. Appl. Microbiol.* V88, P617-625.

Christensen, C. M., Fansh, H. A., Nelson, G. H., Bates, F., & Mirocha, C. J. (1967).

De Boer, E., Spiegelberg, W. M., & Janssen, F.W. (1985). Microbiology of spices

De Buyser, M.L., Guinebretiere, M.H., Aujames, M., Schiaulini, M.A., Théry-Chamard, B.,

De Clerck, E., Devos, J and de Vos, P. (2004a). Molecular characterisation of bacterial contamination in semi-final gelatine extracts, using denaturing gradient gel electrophoresis. *Systematic and Applied Microbiology* V27, P612-619.

De Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Forsyth, G., Lebbe, L., Logan, N.A and DeVos, P. (2004b). Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. *Systematic and Applied Microbiology* V27, P50-60.

De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H and Whitman, W.B., (2009). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology - second edition.* Bergey's manual trust 3.

Decobert, C. (1998). *Alexandrie au Treizième siècle une nouvelle topographie.* Edition in AlexeMed V1, P 71-100.

Delarras C. 2007. *Microbiologie pratique pour le laboratoire.* Paris : Editions TEC & DOC

Dorner, W. (1926). Un procédé simple pour la coloration des spores. Avec une planche en couleurs. *Le lait*, 6 (51), 8-12.

Droniou. C. (2012). Les épices. Les symposiarques, P1-6.

EFSA, (2012). Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA J.* V10, P2597.

EFSA, (2013). Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA J.* V11, P3129.

EFSA, (2014). Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA J.* V12, P3547.

EFSA, (2015). Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.* V13, P3991.

EFSA, (2015b). Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA J.* V13, P4329.

EFSA, (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA J.* V14, P4524.

FARAYET, M. (2016). *La nature au service de votre corps : Les Epices,* P19-22.

Farrell, K. (1990). *Spices, Condiments, and Seasonings.* Edition Springer United States, P88.

Food Protection, 50(5), 401e403.

Fricker M., Reissbrodt R and Ehling-Schulz M., (2008). Evaluation of standard and new chromogenic selective plating media for isolation and identification of *Bacillus cereus*, International Journal of Food Microbiology, 121(1), P27-34

Gaillard S., Leguérinel I and Mafart P., (1998). Modelling combined effect of the temperature and pH on the heat resistance of spores of *Bacillus cereus*, Food Microbiology, V15: P625-630

Gaillard S., Leguerinel I. and Mafart P. (1998). Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *J. Food Science.* 63, 887-889.

Garcia, S., Iracheta, F., Galvan, F., & Heredia, N. (2001). Microbiological survey

Geeta, H., & Kulkarni, P. R. (1987). Survey of the microbiological quality of whole,

Gordon R. E., Haynes W. C and Pang, H. N., (1973). The genus *Bacillus*, Agriculture Handbook No. 427, U.S.D.A., Washington D.C

Gould, G.W. (2006). History of science--spores. Journal of Applied Microbiology V101, P507-513.

Granum, P. E., Lindbäck T.(2012). *Bacillus cereus*. In Food microbiology: fundamentals and frontiers.

Granum, P.E., Brynestad, S., Kramer, J.M., 1993. Analysis of enterotoxin production by

Granum, P.E., Tomas, J.M., Alouf, J.E., 1995. A survey of bacterial toxins involved in food

Green H., Furuno J., Horneman A and Morris J. G. (2009). Bacterial Foodborne Disease, In Evans A.S., Brachman P.S. (Eds.), Bacterial Infections of Humans, Springer, P121-158.

Guinebrière, M-H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., EhlingSchulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M and De Vos, P., (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Env. Microbiol.* V10, P851-865.

Heers, J. (2008). Rôle historique des épices et des aromates. Terre et vie. P96. herbs, and additives in South Africa. *Journal of Food Science*, 47(2), 570e574. herbs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 51(4), 435e438. herbs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 51(4), 435e438. import. *Journal of Milk and Food Technology*, 37(8), 414e419. India. *Food Research International*, 36(5), 469e474.

Institut Klorane. (1994). Guide des épices et aromates, P16 ; 26-30; 36-38

Jessica, E., Fatma, G., Anne, P., Satinder, K and Khaled, B. (2015). Spice Use in Food: Properties and Benefits. Critical Reviews in Food Science and Nutrition.

Julseth, R. M., & Deibel, R. H. (1974). Microbial profile of selected spices and herbs at

Keith, S. (2006). Propriétés des principales épices. Nutrition Journal, P11.

Kneifel, W and Berger, E. (1993). Microbiological Criteria of Random Samples of Spices.

Kneifel,W., & Berger, E. (1994). Microbiological criteria of random samples of spices

Lamouliatte, H., Mégrand F., et Cayla R., (1992). Helicobacterpylori et pathologie gastroduodénale. Encyclopédie Médico-chirurgicale. Editions techniques. EMC.

Langlois, R., Galita, C., Pariente Khayat, A., Dao, T.T., 2008. Investigation d'une TIAC en maison de retraite : un cocktail de *Bacillus cereus*. ANSES-Bulletin Epidémiologique.

Lee, P.K., Buswell, J.A., Shinagawa, K., (1995). Distribution of toxigenic *Bacillus cereus* in rice samples marketed in Hong-kong. World J. Microbiol. Biotech. V11, P696-698.

Luu-Thi, H., Khadka, D.B and Michiels, C.W. (2014). Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. Int. J. Food Microbiol. V189, P183-188.

Marchal, N ; et Bourdon, J. L ; (1982). Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin, Paris.

Margulis, L., Jorgensen, J.Z., Dolan, S., Kolchinsky, R., Rainey, F.A., Lo, S.C., (1998). The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America V95, P1236-1241.

Melling, J., Capel, B.J., Turnbull, P.C.B., Gilbert, R.J., (1976). Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*. J. Clin. Pathol. V29, P938- 940.

Microflora of black and red pepper. Applied and Environmental Microbiology, 15

Mohammedi, Z. (2006). Etudes du pouvoir antimicrobien et antioxydant de quelques plantes de la région de Tlemcen. produits naturels, activité biologique, P59.

Moreira, P. L., Lourencao, T. B., Pinto, J. P., & Rall, V. L. (2009). Microbiological quality

Mortimer, P.R and McCann, G. (1974). Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. Lancet V1, P1043-1045.

Mossel, D. A. A., Koopman, M. J and Jongerius, E. (1967). Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. Appl. Microbiol., V15(3), P650-653.

Nicholson, W., Fajardo-Cavazos, P., Rebeil, R., Slieman, T., Riesenman, P., Law, J and Xue, Y. (2002). Bacterial endospores and their significance in stress resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* V81, P27-32.

NVS, (2009). Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives : Données de la déclaration obligatoire, Institut National de Veille Sanitaire : Données relatives aux toxi-infections alimentaires collectives en France en 2008.

of spices marketed in the city of Botucatu, Sao Paulo, Brazil. *Journal of Food*

Pafumi, J. (1986). Assessment of the microbiological quality of spices and herbs. *Journal of Food Protection*, P49-963. poisoning: a suggestion for bacterial food poisoning toxin nomenclature. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 129-144.

Redhead, J. (1990). Utilisation des aliments tropicaux: sucres, épices et stimulants. Organisations des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, P 19-23 retail herbs and spices from Mexican markets. *Journal of Food Protection*, 64,

Scott, S.A., Brooks, J.D., Rakonjac, J., Walker, K.M.R and Flint, S.H. (2007). The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International Journal of Dairy Technology* V60, P109-117.

Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* V101, P514-525.

Shobana, S., Akhilender, N.K. (2000). Antioxidant activity of selected Indian spices. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. V62(2). P107– 110.

Sophie, J. (2006). La culture des plantes aromatiques, P91-92. spices and medicinal plants. *Global Veterinaria*, 2(4), 175e181.

Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A and Granum, P.E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *Fems Microbiol. Rev.* V32, P579-606.

Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E., 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus*

Tajkarimi, M., Ibrahim, S and Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *food control.* V21. P199–218

Tortora. G..J ; B.R. Funk ; C.L. Case. (2003). Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. Pp. 945.

UNIDO and FAO. (2005). Herbs, spices and essential oils: Post-harvest operations in developing countries, P12-26.

Ute Schweiggert., Reinhold, C and Andreas, Sch. (2007). Trends in Food Science & Technology V18, P260-268.

Valero, M., Hernandez-Herrero, L.A., Fernandez, P.S and Salmeron, M.C. (2002). Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. Food Microbiology V19, P491-499.

Vreeland, R.H., Rosenzweig, W.D and Powers, D.W. (2000). Isolation of a 250 million-yearold halotolerant bacterium from a primary salt crystal. Nature V407, P897-900.

Walker, J. (1994). Antimicrobial compounds in food plants. Natural Antimicrobial Systems and food Perservation, P 181-204.

Wells-Bennik, M.H.J., Eijlander, R.T., den Besten, H.M.W., Berendsen, E.M., Warda, A.K., Krawczyk, A.O., Groot, M.N.N., Xiao, Y.H., Zwietering, M.H., Kuipers, O.P and Abee, T. (2016). Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth, in: Doyle, M.P., Klaenhammer, T.R. (Eds.), Annual Review of Food Science and Technology. Annual Reviews, Palo Alto Vol 7, P457-482.

Wichtl, M., Anton, R. (2003). Plantes thérapeutiques. Deuxième édition, paris, P692.

Wong, H.C., Chang, M.H and Fan, J.Y. (1988). Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy-products. Appl. Environ. Microbiol. V54, P699-702.

Annexe 01

Fiche d'enquête descriptive sur l'utilisation des épices dans la région de Laghouat

Questions	Réponses proposées		Réponses choisis
1-Identification de l'opérateur	Préparation ménagère		
	Restaurant		
	cité universitaire		
	salle des fêtes		
	autres		
2-Nombre de consommateurs	Par famille /par établissement		
3 Nombre de préparation par mois	Soupe		
	Sauces		
4- Les épices et les herbes séchés les plus utilisés	1-	4-	7-
	2-	5-	8-
	3-	6-	9-
5-Originé et structure des épices	Endroit		
	Structure		broyés
			Non broyés
6-Durée de stockage chez le consommateur avant utilisation	Cuisine		1 mois
			2 mois
			3 mois ou plus
7- Le conditionnement :	Sous emballage		Type emballage
	En vrac		Poids
8--Concentration de l'épice	quantité de l'épice		
	type de récipient		Cocotte
	volume de récipient		Marmite
9- La fréquence d'utilisation	Tous les jours		
	2/3 fois par semaine		
	Chaque semaine		
10- Le mode d'utilisation :	Avant cuisson		
	Durant cuisson		
	Après cuisson		
11- La durée de cuisson après l'ajout de l'épice	05 min		
	10 min		
	15 min		
	30 min ou plus		
12-Température de cuisson	70°C/80°C/95°C/120°C		
13-Durée de Stockage de l'aliment après cuisson	Après cuisson		
	après 1ere prise		

	Après 2eme prise		
14-Condition de stockage de l'aliment après 1ere prise.	Réfrigérateur		
	Congélateur		
	Température ambiante		
15- Les cas d'intoxications	Oui/non /nombre de cas		

Annexe 02 : les milieux de culture

1. Milieu MOSSEL :

Le milieu «mannitol, eggolk, polymyxin» (MYP) (tableau 7) est une gélose sélective pour *B. cereus* conçue par Mossel (Mossel et al., 1967). Il est employé pour détecter et dénombrer les cellules végétatives et les spores de *B. cereus* dans les produits alimentaires et son utilisation est recommandée par la norme ISO 7932:2004.

Son fonctionnement est basé sur l'absence de fermentation du mannitol par *B. cereus* et sur la capacité de certaines souches à produire de la lécithinase.

Mossel de base :

Etrait de viande.....	1 g/l
Peptone.....	10g/l
Sodium chloride	1 Og/l
- D-mannitol	1Og/l
Rouge de phénole	0.025g
Aar-agar	9-1 g/l
ED	900ml

Mossel complet :

Milieu Mossel de base	90ml
Solution de polymixines B	1ml
Émulsion de jaune d'oeuf	10ml

Le rouge de phénol, présent comme indicateur coloré ajoutés 25 ml d'une émulsion stérile de jaune d'œufs avec polymyxine B.

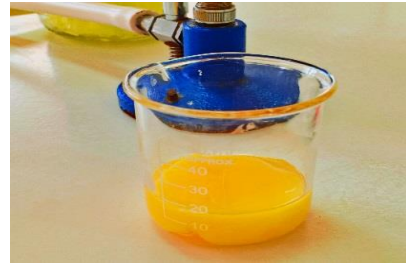
L'homogénéisation' effectue en agitant le flacon et la solution est ensuite coulée dans des boîtes de Pétri (Sarstedt).

La gélose ainsi obtenue est supposée être élective grâce à l'ajout de polymyxine B qui inhibe la flore secondaire et à laquelle *B. cereus* est résistante.

L'identification des colonies présumées de *B. cereus* se réalise grâce au halo opaque qui les entoure, formé suite à la dégradation de la lécithine du jaune d'œuf en produits insolubles, ainsi que grâce à leur couleur rose, signe que l'indicateur coloré n'a pas viré au jaune et que le mannitol n'a donc pas été fermenté.



a



d



c



b

Planche 01 Préparation des milieux de culture MYP

2. Milieu GN :

Peptone.....	10g/l
Extrait de viande	15g/l
Extrait de levure	2g/l
Sodium chloride	5g/l
Aar-agar	15g/l
ED.....	1L

GN de sporulation :

GN.....	1L
Cacl ₂	100mg/l
Mnso ₄	40mg/l

3. Milieu EPT:

L'eau peptonée tamponnée (EPT) est un milieu liquide jaune clair (tableau 8), non-sélectif, utilisé pour le pré-enrichissement des bactéries présentes dans les denrées alimentaires.

Eau peptonée tamponnée est plus riche en nutriments, et permet de revivifier des bactéries stressées et d'activer leur croissance. Après sa préparation, l'EPT est conservé au réfrigérateur à 4°C avant son utilisation.

Composants :

Digestat enzymatique de caséine	10,0
Chlorure de sodium	5,0
Hydrogène phosphate disodique anhydre	3,5
Dihydro génophosphate de potassium	1,5
PH	7±0,2

Riche en nutriments, il permet de revivifier des bactéries stressées et d'activer leur croissance.

4. Milieu (BHI) :

Les croissances à basse températures ainsi que l'étude de la thermo-résistance des cellules végétative de *B. cereus* et la majorité des pré-cultures ont été réalisées en Brain Heart Infusion (BHI).

Composants :

Extrait de levure	17,5
Peptone pancréatique déglatée	10
Chlorure de sodium (NaCl)	5
Phosphate disodique (NaH ₂ PO ₄)	2,5
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆).	2
pH	7±0,2

Les ajustements de pH ont été réalisés grâce à de NaOH ou (HCl) avant autoclavage.

Tous les milieux de cultures et solutions préparés sont stérilisés dans un autoclave, pendant 20 min à une température de 121°C.

Après autoclavage, les milieux de cultures solides alors contenus dans des flacons sont coulés dans des boîtes de Pétri stériles de 92 mm de diamètre et de 16 mm de hauteur et laissés à refroidir et à sécher à température ambiante pendant 24 heures avant d'être placés au réfrigérateur à 4°C.

Annexe 03 : Techniques utilisées

1. Coloration de gram :

Les réponses à la coloration de Gram jouent un rôle primordial dans la classification qui distingue les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif.

Technique :

Une colonie isolée, prélevée sur milieu solide après 24h de culture à 37°C, est étalée dans une gouttelette d'eau sur la lame de verre à l'aide d'une anse bactérienne stérilisée à la flamme du bec. Après séchage de la lame à l'air, le frottis est fixé par la flamme du bec bunsen sur le dos de la lame en verre. Après refroidissement, les micro-organismes sont colorés en violet de gentiane pendant 1 min. après lavage à l'eau, le frottis est mis en contact pendant 1 min avec la solution de lugol. L'iode libéré va fixer le colorant précédent. Le frottis est mis en contact pendant 1 min avec safranine qui agit comme colorant de contraste : les bactéries ayant une réaction négative à la coloration de Gram apparaissent roses, les bactéries ayant une réaction positive à la coloration de Gram qui n'ont pas été décolorées restent violettes. Le frottis est lavé à l'eau distillée et séché soigneusement. L'observation du frottis est réalisée en microscopie optique (objectif à immersion x100).

2. Coloration de vert de malachite :

La spore bactérienne est organe facultatif. On la rencontre seulement chez certaines espèces bactérienne (généralement Gram positif: Bacillus). elle représente une forme de résistance de la bactérie aux conditions défavorable de vie (chaleur, dessiccation).

Technique :

Après avoir réalisé un frottis bactérien comme précédemment, il est d'une solution aqueuse de vert de malachite 5 % et chauffe pendant 10 minutes. Après le lavage à l'eau du frottis, la solution aqueuse de fuchsine basique à 5% est ajoutée et laissée pendant 1 minute. Le frottis est lavé à l'eau distillée et séché soigneusement (**Dorner, 1926**). L'observation du frottis est réalisée en microscopie optique (objectif à immersion x 100). Les spores apparaissent vertes dans des corps bactériens roses. La position dans la cellule, la déformation du bacille et la forme de la spore sont des renseignements taxonomiques intéressants et importants.

Annexe 04 : les tests d'orientation

1. Test de catalase :

La catalase est une enzyme respiratoire capable de dégrader l'eau oxygénée (H₂O₂) en eau et O₂ selon la réaction suivante :



Sur une lame et à l'aide d'une pipette pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée H₂O₂. La présence d'une catalase est révélée par l'apparition immédiate de bulle de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé (**Tortora et al., 2003**).

2. Test de Mannitol mobilité :

Le milieu mannitol mobilité nitrate est un milieu permettant de mettre en évidence: utilisation de mannitol ; la réduction des nitrates ; la mise en évidence de la mobilité bactérienne ; Ensemencement en pique centrale.

Lecture :

Test positif le tube va apparaître rouge partout indiquant que les bactéries sont mobile ; Test négatif l'apparence d'une ligne rouge au centre du tube au site ou l'inoculum a été percé les bactéries ne sont pas mobiles (**Marchal et Bourdon, 1982**).