

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI – Laghouat

جامعة عمار تليجي - الاغواط

Faculté des Sciences

كلية العلوم

Département de Biologie

قسم البيولوجيا



Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de master en microbiologie fondamentale et appliquée

Présenté par : Nouail Assala et Tiriri Khedidja

Thème

Étude de certaines activités enzymatiques de *Bacillus cereus* isolées à partir de quelques produits alimentaires commercialisés dans la région de Laghouat

Devant le jury

Mr MADOURI R.	MAA	Université Amar TELIDJI – Laghouat	Encadreur
Mr DJEBLI A.	MAA	Université Amar TELIDJI – Laghouat	Président
Mr ZEROUKI H.	MAA	Université Amar TELIDJI – Laghouat	Examineur

Année universitaire : 2022/ 2023

Dédicaces

Je dédie ce travail en premier lieu : à ma mère pour son soutien continu pendant

Toute ma vie car aucun mot ne pourra exprimer ma haute gratitude et profonde

Affection, à mon père Allah yarahimo. À mon frère Mohamed et À mon cher binôme Khedidja À tous mes amis, surtout mes chères amies Fatna, Meriem, Wahiba, Oum Elkhir, et à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Assala

Dédicaces

Je dédie ce travail en premier lieu : À mes très chers parents, ma mère et mon Père qui me sont très chers en témoignage à leur soutien pendant toute ma vie car aucun mot ne pourra exprimer ma haute gratitude et profonde affection.

À

Mon frère Youcef et mes soeurs Hamida et Dalala .À mon cher binôme Assala

À tous mes amis, et à toutes les personnes qui ont

Contribué à la réalisation de ce travail.

Khedidja

Remerciement

لأولئك الذين صدقوا ما عاهدوا الله عليه من شهدائنا الأبرار و مجاهدينا الأخيار لأرواح
القادة الستة مفجري الثورة التحريرية .و القادة 22 مخططي تفجير الثورة التحريرية
لأرواح ضحايا مجازر 8 مايو 1945 وضحايا التجارب النووية الفرنسية و الذين قوبلوا
بالقمع في مظاهرات نهر السين بفرنسا , لمن كتبت على شواهد قبورهم جندي مجهول
وكذا أصدقاء الثورة الجزائرية وكل من ضحى من اجل أن تحيا الجزائر

دون أن ننسى أولئك الذين مازالوا على العهد بأقين من أفراد جيشنا الوطني الشعبي
سليل جيش التحرير الوطني حامي الحمى بمختلف قواته البحرية والبرية المرابطة على
الحدود و كذا صقور الجو.

عاشت الجزائر شامخة بأبنائها , المجد و الخلود والكبرياء والعظمة لشهدائنا الأبرار.

جزيل الشكر للأستاذ مادوري رضوان على التأطير والمرافقة طوال فترة
إعداد المذكرة ، و كذلك لإعضاء لجنة المناقشة المتكونة من : الأستاذ جبلي
أحمد رئيسا و الأستاذ زروقي محمد الحسين ممتحنا ،
كما لا يفوتنا تقديم الشكر للزميلة الدكتورة يمينة رزق الله و الطبيبة البيطرية
خديجة و كذا مخبر التحاليل الطبية بحي الوئام
و كل من ساعد من قريب أو بعيد في إنجاح هذا العمل.

Table de Matière

Table de Matière	I
Liste des tableaux	IV
Liste des figures	V
Liste des abréviations	VI
Résumé	VII

INTRODUCTION GENERALE

Introduction Générale	02
-----------------------	----

PARTIE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GENERALITE SUR *BACILLUS CEREUS*

I-1- Les caractéristiques et le taxon du groupe <i>B.cereus</i>	06
I-2- <i>B.cereus</i> dans les aliments	06
I-3- Pouvoir pathogène des <i>B.cereus</i>	07
I-4- Dose infectieuse	08
I-5- Sporulation et thermo-résistance des spores de <i>B. cereus</i>	08
I-6- Les activités enzymatiques des <i>B.cereus</i>	10
I-6-1- Les enzymes	10
I-6-2- Classification des enzymes	10
I-6-3- L'activité amylolytique et leurs enzymes	10
I-6-4- L'activité protéolytique et leurs enzymes	10
I-6-5- L'activité hémolytique et les types d'hémolyse	11
I-6-6- Détermination la sensibilité de <i>B. cereus</i> aux antibiotiques	11

PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE II MATERIEL ET METHODES

II-1-Dénombrement des <i>B. cereus</i>	14
II-1-1-Echantillonnage	14
II-1-1-1-Préparation des échantillons	14
II-1-1-2-Préparation des dilutions	14
II-1-1-3-Ensemencement du milieu Mossel complet	14
II-2-Etude des activités enzymatiques	15
II-2-1 Souches utilisées	15
II-2-2-Revivification des souches	16
II-2-3-Activité amylolytique	16
II-2-4-Activité hémolytique	16
II-2-5-Activité protéolytique	16
II-3-Etude de la sensibilité des souches de <i>B. cereus</i> vis-à-vis certains ATB	16
II-3-1- Revivification des souches et réalisation d'une suspension	16
II-3-2- Ensemencement du milieu MH et application des disques	17

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III-1-Résultat de dénombrement de <i>B. cereus</i> dans les épices	20
III-2-Résultat de l'étude des activités enzymatiques des <i>B. cereus</i>	22
III-2-1-Résultat de l'activité amyliolytique	22
III-2-2-Résultat de l'activité hémolytique	22
III-2-3-Résultat de l'activité protéolytique	22
III-3-Résultat de l'étude de la sensibilité de <i>B. cereus</i> aux ATB	23

Conclusion	25
Références	26
Annexe	

Liste des tableaux :

Tableau 01	Souches de <i>B.cereus</i> utilisées et leur origine.	15
Tableau 02	Les ATB utilisés.	17
Tableau 03	Résultat d'énumération de <i>B.cereus</i> en UFC.	20
Tableau 04	Résultats de l'activité amyliolytique.	23
Tableau 05	Résultats de l'activité hémolytique.	25
Tableau 06	Résultats de l'activité protéolytique.	27
Tableau 07	Profile des souches de <i>B.cereus</i> selon les activités enzymatiques.	28
Tableau 08	Diamètres des zones d'inhibition en mm.	30
Tableau 09	Résultats de la sensibilité de <i>B.cereus</i> aux ATB.	31

Liste des Figures

Figure 01	Cellules végétatives de la souche <i>B.cereus</i> en microscope électronique à balayage.	06
Figure 02	Schéma représentant les deux types d'intoxication possibles par <i>B. cereus</i> .	07
Figure 03	Spore de <i>B. cereus</i> en microscopie électronique à transmission.	08
Figure 04	Les étapes de sporulation de <i>B. cereus</i> .	09
Figure 05	Le test de la sensibilité de <i>B.cereus</i> aux ATB avant l'incubation.	18
Figure 06	Les colonies de <i>B.cereus</i> sur le milieu mossel à partir d'un échantillon mélange de viande à dilution (10^{-4}).	21
Figure 07	Les colonies de <i>B.cereus</i> sur le milieu mossel à partir d'un échantillon gingembre à dilution (10^{-3}).	21
Figure 08	Les résultats de l'activité amylolytique avant l'ajout de lugol.	22
Figure 09	Les résultats de l'activité amylolytique après l'ajout de lugol.	22
Figure 10	Les résultats de l'activité hémolytique de type β .	24
Figure 11	Les résultats de l'activité hémolytique de type α .	24
Figure 12	Les résultats de l'activité protéolytique positive.	26
Figure 13	Les résultats de l'activité protéolytique négative.	26
Figure 14	Les résultats de la sensibilité de <i>B. cereus</i> aux ATB après l'incubation.	29
Figure 15	Milieu mossel.	
Figure 16	Milieu GN + 15% de lait UHT.	
Figure 17	Milieu GN + 1% d'amidon.	
Figure 18	Milieu GN + 5% de sang de cheval.	
Figure 19	Milieu MH.	

Liste des abréviations :

ATB	antibiotiques.
<i>B.cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i> .
D	le temps de réduction décimale.
GN	gélose nutritive.
MCF	Mcfarland.
MH	Mueller Hinton.
UCF	Unité formant colonie.
UHT	Ultra haute température.
AM	Ampicillin .
AMC	Amoxicillin – clavulanic acid .
C	Chloramphénicol.
CIP	Ciprofloxacin.
CN	Gentamicin.
DA	Clindamycin.
E	Erythromycin.
KF	Cephalothin.
TE	Tetracycline.
TEC	Teicoplanin.
P	Penicillin G.
VA	Vancomycin.

Résumé :

Bacillus cereus est l'une des espèces bactériennes les plus répandues, notamment dans les aliments, car on la trouve dans la viande, le riz, le lait et les épices. Dans cette étude, la présence de *Bacillus cereus* dans les épices sera discutée, ainsi que leur capacité à hydrolyser des substrats spécifiques ainsi que leur sensibilité vis-à-vis certains antibiotiques. Les résultats de l'activité enzymatique de 27 souches de *B. cereus* ont montré leur capacité à hydrolyser l'amidon, et une hémolyse de type β chez 81% des souches étudiées, tandis que l'hydrolyse de la caséine du lait était observée chez 16 souches. Le test de sensibilité vis à vis 12 différents antibiotiques a révélé que la totalité des souches ont été inhibé par la Ciprofloxacine et la Gentamycine mais résistantes à la pénicilline.

La croissance de *B.cereus* est liée à son activité enzymatique dans les aliments telle que l'activité amylolytique, protéolytique et l'hémolyse, avec sa capacité de résister aux d'antibiotiques.

Mots clés : *Bacillus cereus*, activité enzymatique, sensibilité, antibiotiques.

المخلص:

تعد *Bacillus cereus* من أكثر أنواع البكتيريا شيوعاً، خاصة في الغذاء، حيث توجد في اللحوم والأرز والحليب والتوابل. في هذه الدراسة، سيتم مناقشة وجود *B.cereus* في التوابل ، بالإضافة إلى قدرتها على التحلل المائي لركائز معينة بالإضافة إلى حساسيتها لبعض المضادات الحيوية. أظهرت نتائج النشاط الإنزيمي لـ 27 سلالة من بكتيريا *B. cereus* قدرتها على التحلل المائي للنشاء، وانحلال الدم من النوع في 81% من السلالات المدروسة، بينما لوحظ التحلل المائي لكازيين الحليب في 16 سلالة. أظهر اختبار الحساسية ضد 12 مضاد حيوي مختلف أن جميع السلالات مثبطة بواسطة سيبروفلوكساسين والجنتاميسين ولكنها مقاومة للبنسلين.

يرتبط نمو *B.cereus* بنشاطها الأنزيمي في الغذاء مثل نشاط انحلال النشاء، التحلل للبروتين وانحلال الدم ، مع قدرتها على مقاومة المضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية: *Bacillus cereus*، النشاط الإنزيمي ، الحساسية ، المضادات الحيوية .

Abstract:

Bacillus cereus is one of the most common bacterial species, especially in food, as it is found in meat, rice, milk and spices. In this study, the presence of *B. cereus* in spices will be discussed, as well as their ability to hydrolyze specific substrates as well as their sensitivity to certain antibiotics. The results of the enzymatic activity of 27 strains of *B. cereus* showed their ability to hydrolyze starch, and type β -hemolysis in 81% of the strains studied, while the hydrolysis of milk casein was observed in 16 strains. The sensitivity test against 12 different antibiotics revealed that all the strains were inhibited by Ciprofloxacin and Gentamycin but resistant to penicillin.

The growth of *B.cereus* is linked to its enzymatic activity in food such as amyolytic, proteolytic and hemolysis activity, with its ability to resist antibiotics.

Keywords: *Bacillus cereus*, enzymatic activity, sensitivity, antibiotic.

Introduction

Générale

Introduction Générale :

Les toxi-infections alimentaires sont des infections causées par l'ingestion d'aliments contaminés par certains agents infectieux ou par leur toxine. En (2022, l'Agence de l'Union européenne) dans l'Espace économique européen, a noté que des cas de toxi-infections alimentaires étaient causés par : 14 % *B.cereus* ; 18% *Listeria* ; 20% *Yersinia* et jusqu'à plus de 35% en *Escherichia coli*.

Les aliments de toutes sortes fournissent un environnement propice à la présence de *B. cereus*, mais spécifiquement les aliments qui possèdent une activité d'eau très faible comme les épices. Ces bactéries peuvent, en cas de mauvaises conditions extérieures pour elles, se compacter en spores, qui sont très résistantes à la chaleur (jusqu'à environ 120°C). (Abbas Z ; 2014) (Ministère Algérien de l'Agriculture ; 2011).

Les enzymes agissent comme catalyseurs de plusieurs réactions métaboliques chez les microorganismes. Les bactéries du genre *Bacillus* constituent la source majeure d'enzymes hydrolytiques utilisées surtout dans le domaine alimentaire. (Devine, 1995).

La croissance bactérienne, ainsi que son activité enzymatique, affecte les denrées alimentaires, les rendant inacceptables en termes d'apparence et donc rejetées comme aliments. Ces modifications comprennent la décomposition des glucides complexes (polysaccharides) en substances simples et en protéines. Pour de nombreux peptides et acides aminés, par exemple, la présence de protéases peut entraîner une saveur amère dans le lait et la lipase produite par *B.cereus* peut provoquer des défauts dans les produits laitiers (Klopper et al., 2004).

Afin de protéger les aliments et d'éviter les toxi-infections chez l'homme, la capacité des *B.cereus* à produire des enzymes a été discutée, ainsi que leur effet sur la qualité des aliments.

L'objectif du présent travail est d'étudier quelques activités enzymatiques des souches de *B. cereus* isolées à partir des épices commercialisées dans la région de laghouat ainsi que la sensibilité de cette bactérie vis-à-vis certain nombre d'antibiotiques.

Ce mémoire est scindé en deux parties ; La première partie concerne l'étude bibliographique qui regroupe des généralités sur le *B.cereus*. La seconde partie est

expérimental ; elle consiste en un premier chapitre qui présente la méthodologie utilisée et un second chapitre qui présente et discute l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude pour en dégager des conclusions et des perspectives.

Partie I : Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Généralité sur *Bacillus cereus*

I-1-Les caractéristiques et le taxon du groupe *B.cereus*

B.cereus est une bactérie pathogène à coloration Gram-positif, à métabolisme aéro-anaérobie facultatif et capable de produire des spores dans des conditions de croissance défavorables. C'est un micro-organisme mobile, en forme de gros bâtonnet ($>1,0 \mu\text{m}$), parfois en chaînes et avec des colonies cireuses et opaques sur milieu gélosé. C'est aussi une bactérie omniprésente que l'on trouve principalement sous forme de spores dans un grand nombre d'environnements tels que le sol. (Stenfors Arnesen et al., 2008).

Le groupe *B. cereus* appartient à l'embranchement des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Bacillales*, à la famille des *Bacillaceae* et au genre *Bacillus*. Le groupe *Bacillus cereus* (groupe *B. cereus*) est composé de huit espèces : *B. mycoïdes*, *B. pseudomycoïdes*, *B. weihenstephanensis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu stricto* (*B. cereus*), *B. cytotoxicus* et *B. toyonensis*. Les bactéries du groupe *B. cereus* sont ubiquitaires (section 13 du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, et al., 2009).



Figure 01 : cellules végétatives de la souche *B.cereus* en microscope électronique à balayage (Leclerc .H 1990).

I-2-*B.cereus* dans les aliments :

Le sol est la principale source de contamination des aliments crus par des spores de *B. cereus*. Le sol peut contenir entre 10^3 et 10^5 spores par gramme. Certains ingrédients des aliments complexes, tels que les agents de texture, les œufs liquides, les herbes et les épices, ont été identifiés comme une source importante de contamination par ces spores. Le stockage du produit transformé ou l'ajout de matières premières à des aliments complexes dans des conditions propices à ce micro-organisme (par exemple les épices dans les plats cuisinés, ou les œufs liquides dans les flans ou les crèmes caramel réfrigérés) permettent la

germination des spores et la croissance de *B.cereus* vers des concentrations potentiellement dangereuses pour les consommateurs (Efsa, 2005). D'ailleurs, la plupart des aliments très humides et non acidifiés favoriseraient sa croissance. La croissance est cependant limitée par la réfrigération : en dessous de 10°C, seule une minorité des souches de *B.cereus* présentes dans un produit alimentaire pourra se développer (Efsa, 2005).

I-3- Pouvoir pathogène des *B.cereus* :

Le groupe *B. cereus* sont impliqués dans deux pathologies d'origine alimentaire distinctes : un syndrome émétique et un syndrome diarrhéique.

La première intoxication est le syndrome diarrhéique est de type toxi-infection vont produire des toxines thermolabiles dans l'intestin grêle de leur hôte causé par l'ingestion de *B. cereus* sous forme de spores ou de cellules végétatives (Granum et al., 2005).

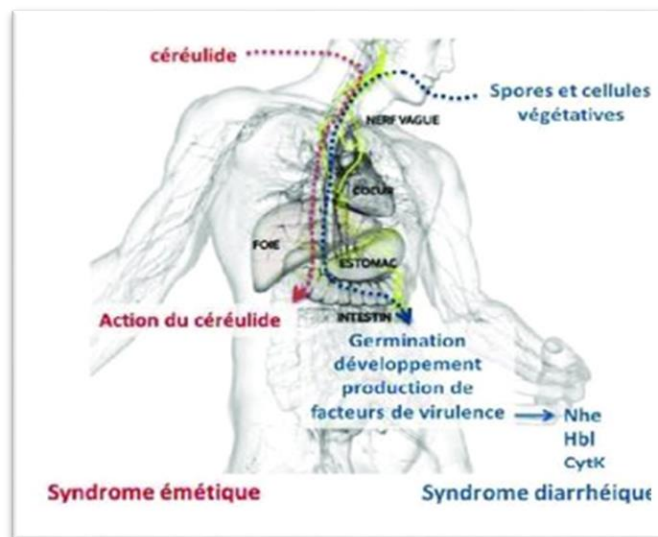


Figure 02 : Schéma représentant les deux types d'intoxication possibles par *B. cereus* (Pitchayawasin et al., 2003)

La deuxième intoxication est le syndrome émétique dont l'agent responsable est une toxine, le céréulide. Ce syndrome est caractérisé par des nausées et des vomissements qui surviennent à 6 h après l'ingestion de l'aliment contaminé, la toxine céréulide résiste à de forts traitements thermiques, à des pH acides et à la protéolyse. Le céréulide est préformé directement dans l'aliment, qui va contaminer directement l'individu au moment de l'ingestion même si la bactérie n'est plus présente (Stenfors Arnesen et al., 2008).

I-4-Dose infectieuse :

Dans le cas des toxi- infections diarrhéiques , la quantité de cellules ou spores de *B. cereus* pathogènes retrouvée dans les aliments incriminés est généralement égale ou supérieure à 10^3 par gramme ou millilitre et dans de très rares cas égale ou supérieure à 10^3 par gramme ou millilitre (**Stenfors Arnesen et al . , 2008**) . Dans le cas des intoxications émétiques , les toxines peptidiques sont très stables et peuvent persister dans l'aliment même si les bactéries ont disparu (**EFSA , 2005**) . Un minimum de 10^3 cellules de *B. cereus* par gramme ou millilitre de l'aliment à un stade de sa production est nécessaire pour produire suffisamment de toxines et provoquer une intoxication (**Kramer et Gilbert , 1989**) .

I-5- Sporulation de *B. cereus* et thermo-résistance des spores de *B. cereus* :

Les spores peuvent survivre à des étapes de traitement intenses telles que la déshydratation et ensuite contaminer différentes denrées alimentaires par l'intermédiaire des ingrédients déshydratés. Les spores des *B. cereus* peuvent provoquer une contamination supplémentaire pendant la transformation des aliments car, étant très adhérentes, elles peuvent former des biofilms et persister sur la surface des équipements de transformation .Le processus de formation des spores thermorésistantes a été largement étudié. Ce processus est initié en réponse à un nombre de signaux externes et internes tels que l'augmentation de la densité cellulaire ainsi que l'appauvrissement du milieu en nutriments et dure généralement entre 8 et 10 h (**Hoon et al., 2010**) . Les étapes morphologiques de la sporulation sont similaires chez toutes les espèces de genre *Bacillus*(**Hilbert and Piggot, 2004**) .

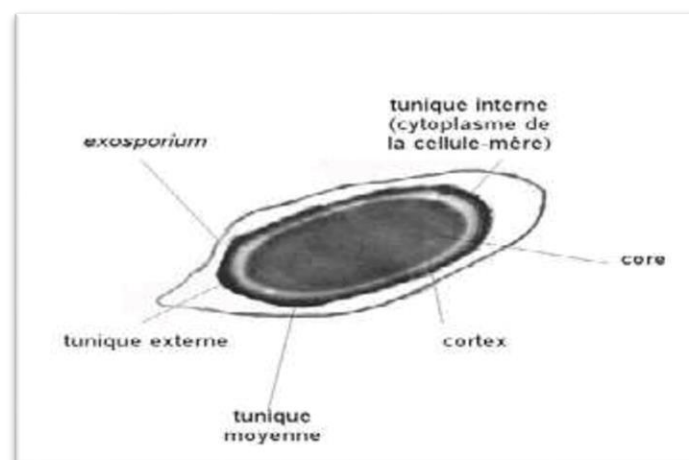


Figure 03 : Spore de *B. cereus* en microscopie électronique à transmission (**Ohye Murrell, 1997**) .

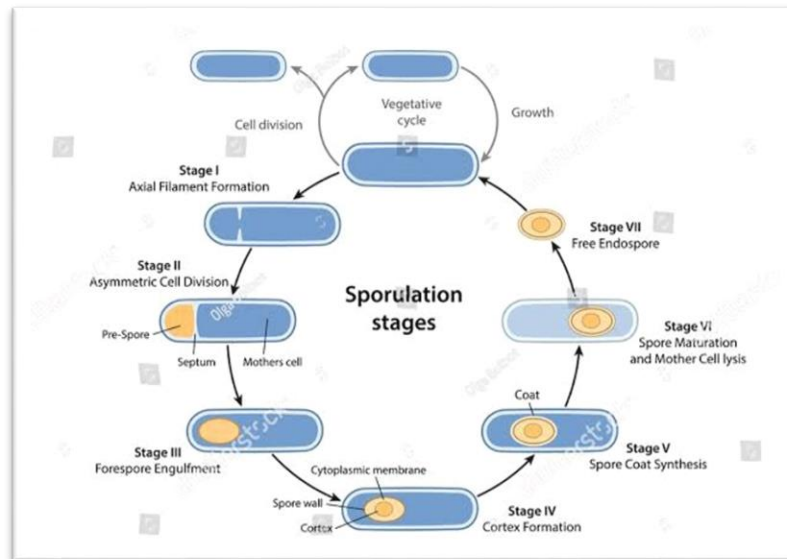


Figure 04 : les étapes de sporulation de *B.cereus*.(stephens .C, 1998)

La résistance thermique des spores varie fortement en fonction de l'espèce. Chez *Bacillus*, la résistance est liée à la température optimale de croissance de la forme végétative (Gombas, 1983). La spore de *B. cereus* résistante à la chaleur. Cette résistance est décrite par la mesure de la valeur D, ou temps (en général exprimé en minutes) nécessaire à une température donnée pour réduire la concentration du germe au 1/10e de sa valeur initiale. La valeur Z est l'élévation (ou l'abaissement) de température qui permet de réduire (ou multiplier) D au 1/10e de sa valeur initiale ' ou par 10). Cependant, la thermo résistance de *B.cereus* n'est pas très élevée, comparativement à celle de *Clostridium botulinum*, comme le soulignent Gaillard et al. et qui proposent pour cette raison une température de référence de 100 °C au lieu de 121.1 °C (Gaillard et al., 1998). Pour cette raison, beaucoup des valeurs D de *B.cereus* sont citées à une température allant de 85 °C à 100 °C, rarement au -delà. (Dromigny, 2008).

I-6-Les activités enzymatiques :**I-6-1- Les enzymes :**

Les enzymes sont des protéines (ou parfois des acides ribonucléiques) dont le rôle est de catalyser les réactions chimiques du vivant. Comme tout catalyseur, une enzyme permet d'augmenter la vitesse d'un processus sans être consommée.

(Simon et Meunier, 1970).

I-6-2- Classification des enzymes :

Toutes les enzymes sont d'abord produites à l'intérieur des cellules mais certaines sont excrétées à l'extérieur de celle-ci. De ce fait, on distingue deux types d'enzymes : les endoenzymes et les exoenzymes (Simon et Meunier, 1970).

I-6-3-L'activité amylolytique et leurs enzymes :

L'amidon est le constituant polysaccharidique majeur de certains produits agricoles comme les produits amylacés. Ce polysaccharide est une substance de réserve ayant la propriété d'être insoluble dans l'eau (Sine, 2010).

Les amylases sont des hydrolases importantes qui (Gupta et al., 2008) catalysent spécifiquement l'hydrolyse de l'amidon, divisées en 3 classes sont :

- a- Les enzymes spécifiques des liaisons α -(1,4)
- b- Les enzymes spécifiques des liaisons α -(1,6)
- c- Les enzymes spécifiques des liaisons α -(1,4) et α -(1,6)

I-6-4- L'activité protéolytique et leurs enzymes :

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques (Kumar et al., 2008), en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique (Scriban, 1999). Ces enzymes divisées en :

- a- protéases végétales.
- b- protéases animales.
- c- protéases microbiennes :

Les protéases dérivées de bactéries proviennent particulièrement des souches de *Bacillus* (Belmesikh, 2011).

I-6-5-L'activité hémolytique et les types d'hémolyse :

L'hémolyse est la dégradation des globules rouges. La capacité des colonies bactériennes à induire une hémolyse lorsqu'elles sont cultivées sur une plaque de gélose est utilisée pour classer certains micro-organismes. La substance qui provoque l'hémolyse est un hémolytique (Cannata A et al., 2020).

a- α -hémolyse :

Il s'agit d'une hémolyse partielle dans laquelle le peroxyde d'hydrogène est produit par des bactéries qui oxydent l'hémoglobine en méthémoglobine verte (Cannata A et al., 2020).

b- β -hémolyse :

β -hémolyse, parfois appelée hémolyse complète dans laquelle il y a une dégradation des globules rouges dans le milieu autour et en dessous des colonies (Cannata A et al., 2020).

c- γ -hémolyse :

Si un organisme reste sous et autour de la colonie bactérienne dans la gélose inchangée, alors l'organisme est dit non hémolytique ou présente une hémolyse de type gamma(γ). (Cannata A et al., 2020).

I-6-6-La détermination de la sensibilité de *B. cereus* aux antibiotiques :

C'est un examen de laboratoire visant à déterminer la sensibilité d'une bactérie à différents antibiotiques. En effet, de nombreuses bactéries sont devenues, avec le temps, résistantes aux antibiotiques. Il n'est donc pas toujours évident de trouver l'antibiotique qui sera efficace pour traiter une souche bactérienne donnée (Caron F.,2012)

Partie II : Etude Expérimentale

Chapitre II : Matériel et méthodes

II-1- Dénombrement des *B.cereus*:**II-1-1- Echantillonnage :**

Un groupe d'épices (12 épices) (gingembre, cumin, safran, poivre noire, poivre rouge, paprika, curcuma, rass elhanout, mélange rass elhanout, mélange de viande, mélange de poulet, carvi) a été obtenu auprès de trois marchands d'épices du quartier Al-Wiam dans la région de Laghouat. Ces épices ont été utilisées dans le but de dénombrier de *B.cereus*.

II-1-1-1 Préparation des échantillons :

Dans des conditions stériles, A l'aide d'une cuillère stérile une quantité de 10g de chaque épices sélectionnées a été pesé et mélanger avec 90ml d'eau physiologique stérile (la concentration de la solution mère 10^{-1}).

II-1-1-2- Préparation des dilutions :

Une série des dilutions décimales successives dans des tubes à essai, à l'aide de l'eau physiologique toujours (on obtient des concentration $10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$)

II-1-1-3-Ensemencement du milieu Mossel complet:

Sur le milieu de culture Mossel complet. Un volume de 0,1 ml de la dilution ($10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$) était étalé à la surface d'une boîte pétrie contenant le milieu Mossel complet.

L'incubation. a été faite -à 30°C pendant 48h.

II-2-Etude de l'activité enzymatique:**II-2-1 Souches utilisées**

Les 27 souches de *B. cereus* utilisées dans ce travail sont représenté dans le tableau suivant :

Tableau 01 : Souches de *B.cereus* utilisées.

Les souches utilisées
SE2
SE3
SE4
SE7
SE8
SE9
SE10
SE11
SE14
SE15
SL1
SL5
SL10
SL11
SL16
SL17
SL18
SL24
SL25
AM1
MLNS4G2
S3CNG4
S4CRAAD4G4
EPCS4G2CH3
G3G4LM1
Ging3S2G2
Ging-4S3G2

II-2-2-Revivification des souches:

A l'aide d'une pipette de pasteur 0,1ml de la suspension sporale (conservées dans des tubes eppendorf à 4 °C) ont été prélevés et déposée dans des tubes à essai contenant (5ml) de bouillon nutritive, puis incubé à 35°C pendant 24h .

II-2-3- L'activité amylolytique:

1% d'amidon a été ajouté au milieu GN (à 50 ° C), puis le milieu a été versé dans les boîtes, puis une pipette Pasteur a été utilisée pour prélever 0,1 ml dans les tubes contenant l'inoculum. Par la technique d'ensemencement en surface en réalisant des lignes le long des boîtes. Les boîtes ont été placées dans l'incubateur à 37 °C pendant 24 h. Après 24 heures, les colonies ont été traitées au Lugol.

II-2-4- L'activité hémolytique :

Dans des conditions stériles, 5% de sang de cheval a été ajouté au milieu GN (à 50 ° C). Le mélange a été versé dans des boîtes de Pétri et enfin ensemercer la surface des boîtes. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 h.

II-2-5 -L'activité protéolytique :

Le milieu de culture est majoritairement GN additionné de 10 à 15 % de lait (UHT).L'ensemencement se fait en surface du milieu. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h.

II-3-Etude de la sensibilité de *B. cereus* vis-à-vis certains ATB :**II-3-1-Revivification des souches et réalisation d'une suspension :**

A l'aide d'une pipette de pasteur 0,1ml de suspension sporale (conservées dans des tubes eppendorf à 4 °C) ont été prélevées et déposée dans des tubes à essai contenant (5ml) de bouillon nutritif, puis ont été incubés à 35°C pendant 18h.

- Après 18 h d'incubation, la dilution a été faite pour obtenir une suspension moins opaque, le degré d'opacité de la suspension diluée a été mesuré par un spectrophotomètre à 600 nm pour obtenir (0,5 MCF).
- Si la suspension est trop trouble, une série de dilutions est effectuée pour obtenir le résultat souhaité.

II-3-2- Ensemencement du milieu MH et application des disques :

Le milieu de culture (MH) a été versé dans des boîtes de Pétri et laissé sécher. Dans les 15 minutes suivant le réglage de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, un écouvillon a été trempé dans la suspension et l'ensemencement a été effectué sur toute la surface de la boîte.

Les disques d'ATB ont été placés sur des boîtes de Pétri individuellement avec des pinces stériles (pas plus de 6 disques doivent être placés sur une boîte pour éviter le chevauchement des zones d'inhibition et une éventuelle erreur de mesure).

Tableau 02 : Les ATB utilisés

Les ATB utilisés
Ampicillin
Amoxicillin – clavulanic acid
Penicillin G
Erythromycin
Vancomycin
Ciprofloxacin
Clindamycin
Teicoplanin
Tetracycline
Gentamicin
Chloramphénicol
Ciprofloxacin

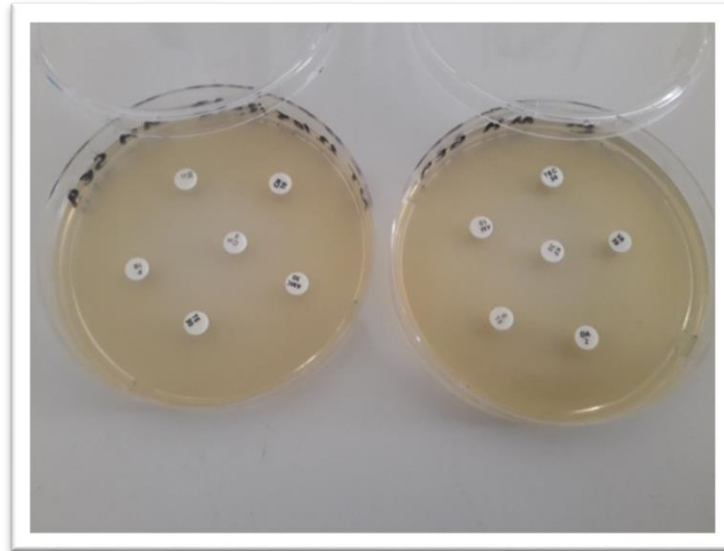


Figure 05 : le test de la sensibilité de *B.cereus* aux ATB avant l'incubation.

Après 24 h d'incubation à 37 C, le diamètre de chaque zone d'inhibition pour chaque disque d'ATB (diamètre du disque compris) a été mesuré en mm, Les zones d'inhibition ont été comparées au tableau d'interprétation de la taille des zones (CLSI) et classées selon les catégories suivantes : sensible (S), modérément sensible (MS), résistance (R).

Chapitre III : Résultats et Discussion

III-1-Résultat de dénombrement de *B. cereus* dans les épices :

B.cereus présomptif sont les colonies dans l'aspect macroscopique correspondent aux critères recommandés par la norme **ISO 7932 (2005)**.

Tableau 03 : résultat d'énumération de *B.cereus* en UFC/g.

Les échantillons des épices	Enumération en UFC/g
Mélange de viande	4.1*10⁴
Rass –elhanout	2.8*10²
Cumin	3.36*10³
Poivre rouge doux	9*10³
Gingembre	4.7*10³
Mélange poulet	2.6*10²
Safran	2*10²
Carvi	1.8*10²
Curcuma	0.5*10²
Poivre noire	0.6*10²
Paprika	6*10³
Rass –elhanout mélange	9*10²

Dans ces résultats, Il a été noté que l'énumération des souches *B.cereus* est différents comme suit: Un nombre de cellules est apparu dans le mélange de viande estimé à $4,1 * 10^4$ UFC/g, alors qu'on a trouvé dans le gingembre $4,7 * 10^3$ UFC/g, tandis que $3,36 * 10^3$ UFC/g ont été comptées dans le cumin, respectivement. Pour l'échantillon de curcuma avait le plus petit nombre estimé à $0,5 * 10^3$ UFC/g et il en était de même pour le poivre noir et le safran.

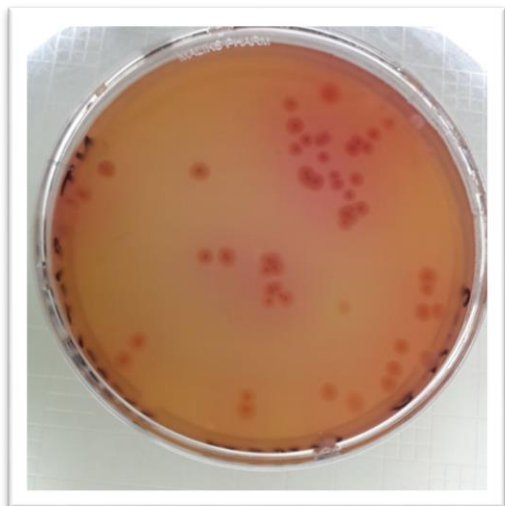


Figure 06 : les colonies de *B.cereus* sur le milieu mossel à partir d'un échantillon de mélange de viande.

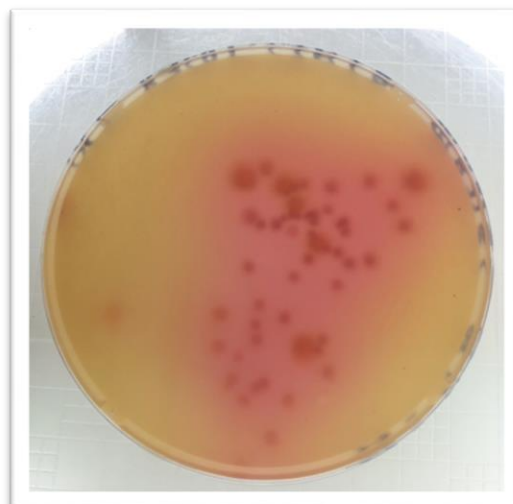


Figure 07 : les colonies de *B.cereus* sur le milieu mossel à partir d'un échantillon de gingembre.

Sur des cultures contenant du milieu mossel complet L'aspect observé est des colonies roses (mannitol négatif) et presque toujours entourées d'un halo de précipité, indiquant la production de lécithinase (hydrolyse de jaune d'œuf).

B. cereus a été trouvé dans toutes les épices, ce qui est un résultat plus élevé que celui enregistré dans l'étude de (Berthold-pluta.A et al ; 2016), le pourcentage d'échantillons positifs étant de 63,3 % et le nombre de *B. cereus* dans ces produits variait de 1,0 à environ 3,0 log UFC /g. Alors l'étude de (Banerjee , M ; Sarkar , P.K ,2003) sur les herbes et épices séchées, montre que la prévalence de *B. cereus* était de 13,5 à 85 % et les numérations variaient de 2,0 à 6,0 log UFC/g.

III-2-Résultat de l'étude de certaines activités enzymatiques :

III-2-1-Résultat de l'activité amyliolytique

Les résultats sont 100% positifs. Après l'incubation et l'ajout de lugol, une couleur bleu-violet a été observée sur toute la surface à l'exception des zones d'ensemencement, une zone claire autour de la culture indique une hydrolyse de l'amidon.

Les résultats positifs se sont traduits par la capacité de *B.cereus* à hydrolyser l'amidon, tandis que les études de (Berthold-pluta.A et al ; 2016) que les différences dans cette capacité ont été trouvées entre les isolats de *B. cereus* provenant d'herbes, d'épices, dont la capacité à hydrolyser l'amidon a été confirmée (82,6 %).

III-2-2-Résultat de l'activité hémolytique

Après l'incubation, 5 souches dont la gélose sous la culture était de couleur vert foncé. C'est ce qu'on appelle "l'hémolyse verte", en raison de la décoloration de la gélose. L'hémolyse α est une hémolyse partielle causée par le peroxyde d'hydrogène produit par *B.cereus* qui oxyde l'hémoglobine en méthémoglobine verte. Tandis que 22 souches dont l'agar sous la culture est jaune clair et transparent, l'hémolyse de type β est une hémolyse complète causée par la capacité de *B.cereus* à produire des enzymes extracellulaires qui détruisent la paroi cellulaire des globules rouges et libèrent de l'hémoglobine.

Nos résultats ont montré la capacité de toutes les souches à avoir une hémolyse, soit de type α ou de type β . Par contre dans l'étude de (Arslan.S et al ; 2014). Vingt-neuf souches ont été testées pour l'activité hémolytique sur une gélose au sang de mouton à 5 %. La grande majorité des souches avec 82,8 % étaient des β - hémolytiques.

III-2-3-Résultats de l'activité protéolytique :

Nous avons enregistré les résultats suivants après incubation pour l'activité protéolytique, qui étaient les suivants : l'apparence d'une légère zone autour des colonies des 16 souches de *B. cereus* (59.25%) ce qui signifie qu'elles possèdent l'enzyme caséinase (l'hydrolyse de protéine caséine).

Nos résultats positifs, estimés à (59,25%), ont été comparés avec l'étude de (Bouhmed.M et al ; 2020) aux tests effectués sur le lait en poudre irlandais où les résultats d'activité protéolytique ont montré que 84% des isolats étaient positifs pour l'activité. Dans une autre étude de (Berthold-pluta.A et al ; 2016) les activités protéolytiques de la caséine provenant de souches isolées d'herbes et d'épices ont été trouvées (62,9%).

III-3-Résultats de l'étude de la sensibilité de *B. cereus* aux ATB :

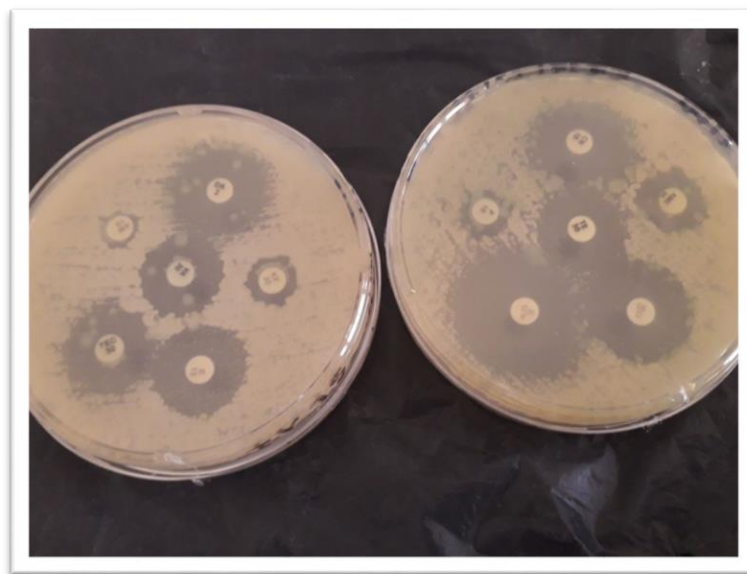


Figure 14 : résultats de la sensibilité de *B.cereus* aux ATB après l'incubation.

Lors l'observation des résultats de test de sensibilité aux ATB on obtient : des diamètres - d'inhibition de la croissance bactérienne - différents autour des disques des ATB, ou le CIP et CN sont actifs sur tous les souches, par contre sont acquies une résistance relative aux ATB (P, KF, AM), et sont répondu à des degrés divers aux ATB (AMC, C, TE, DA, E, TEC, VA).

Les résultats liés à la résistance à la pénicilline et à l'ampicilline dans cette étude étaient en bon accord avec les études précédentes de (Arslan .S et al ; 2014) car il a montré une résistance élevée où la plupart des souches de bacille (26/29) sont résistantes à la pénicilline, et il s'est également avéré résistant à tétracycline, puisque 26 souches exposées à la tétracycline sont résistantes à un taux de 89,7 %. En revanche, la résistance aux céphalosporines du groupe *B. cereus* dans notre étude était cohérente avec les résultats d'autres (Al-khatib MS et al ;2007) (Ankolekar Cet al ;2009).

Conclusion

Conclusion :

La présence de bactéries dans les aliments affecte généralement leur qualité en plus de provoquer des intoxications chez le consommateur.

Durant cette étude sur l'activité enzymatique de *B.cereus* isolé à partir des épices commercialisés dans la région de Laghouat, le premier objectif sur l'étude de la présence des enzymes d'hydrolyse chez les *B.cereus*. Et le deuxième objectif fut à sur leur sensibilité aux ATB.

La recherche de la présence de *B.cereusa* été basée sur les tests de l'utilisation du mannitol et de la lécithinase, les résultats confirmés la présence de *B.cereus* dans tous les échantillons de 12 épices étudiés.

27 souches appartenant au genre *B.cereus* ont été soumises à des tests liés aux activités enzymatiques de certaines substances. Les résultats de cette étude a montré leurs capacité à hydrolyser d'amidon en plus de l'hémolyse par 18, 51% d'hémolyse de type α , et 81,48% d'hémolyse de type β , en plus de la capacité de 59,25% d'entre eux à la lyse de protéine de caséine présente dans le lait. Les mêmes souches ont été soumises à un test de sensibilité vis-à-vis de 12 types d'antibiotiques, car elles présentaient un comportement résistant vis-à-vis de l'ampicilline, le céphalophiné et la pénicilline G (92.59%, 96.29%, 100%) respectivement. En revanche, elles ont montré une grande sensibilité vis-à-vis du CIP et du CN à 100%. Et sont répondu à des degrés divers pour les restes ATB (Amoxicillin-clavulanic acid, chloromphénicol, tetracycline, clindamycin, teicoplanine, erytromycin, vancomycin).

Enfin, il vaudrait mieux à la future mener d'autres tests sur d'autres activités pour découvrir les capacités de *B. cereus*. En plus d'aborder les moyens de réduire l'effet des enzymes que possèdent les cellules cérébelleuses sur la qualité des aliments destinés à la consommation, les limites de l'étude actuelle ouvrent des voies pour de futures recherches.

Références :

1. BERTHOLD, A.; MOLSKA, I. WYSTĘPOWANIE *BACILLUS CEREUS* W ŚRODOWISKU POZYSKIWANIA MLEKA. *MED. WETER.* 2004, 60, 42–45.
2. CHAVES, J.Q.; CAVADOS, C.F.G.; VIVONI, A.M. MOLECULAR AND TOXIGENIC CHARACTERIZATION OF *BACILLUS CEREUS* AND *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAINS ISOLATED FROM COMMERCIAL GROUND ROASTED COFFEE. *J. FOOD PROTECT.* 2012, 75, 518–522.
3. LUND, T.; DE BUYSER, M.L.; GRANUM, P.E. A NEW CYTOTOXIN FROM *BACILLUS CEREUS* THAT MAY CAUSE NECROTIC ENTERITIS. *MOL. MICROBIOL.* 2000, 38, 254–261.
4. DROMIGNY. 2008. « *BACILLUS CEREUS*. » MONOGRAPHIES DE MICROBIOLOGIE, EDN TEC & DOC, LAVOISIER, PARIS
5. CARLIN F. et NGUYEN-THE C. (1998) *Bacillus cereus*. In Manuel de bactériologie alimentaire. Paris : Polytechnica, 1998, 53-80.
6. EFSA J. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. **2005**: 175,1-48.
7. Agata, N., Ohta, M., Mori, M. et Isobe, M. (1995). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters*, 129(1): 17–19
8. Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A. et Granum, P. E. (2008). From soil to gut : *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS microbiology reviews*, 32(4):579–606.
9. Granum, P. E., Doyle, M., Beuchat, L. et Montville, T. (2005). *Bacillus cereus*. *Foodborne pathogens : microbiology and molecular biology*, pages 409–419.
10. John .m ,karmar et richard .j ,gilbert 1989 .food hygiene laboratory , general public health laboratory london .
11. Lund, T., Granum, P.E., 1997. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology-Uk* 143, 3329-3336.

12. Pitchayawasin, S., Kuse, M., Koga, K., Isobe, M., Agata, N., Ohta, M., 2003. Complexation of cyclic dodecadepsipeptide, Cereulide with ammonium salts. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 3507-3512.
13. Granum, P. E. 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 76:615-665.
14. Cannata A, Cantoni S, Sciortino A, Bruschi G, Russo CF, Mechanical hemolysis complicating transcatheter interventions for valvular heart disease: JACC State-of-the-Art Review , 2020.
15. Hasselgren P.O., Hall-Angerås M. et Angerås U. Cytokines et régulation de la protéolyse musculaire au cours des états septiques, *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 1990
16. Seydina M. Diene. Détermination de la sensibilité et de la résistance des bactéries aux agents antimicrobiens. AEMIP 2016.
17. Ronald Bentley et J.W. Bennett, « *What Is an Antibiotic? Revisited* », *Advances in Applied Microbiology*, vol. 52, 2003, p. 303-331
18. Caron F. L'antibiogramme : un quadruple outil pour le clinicien. *Journal des Antimicrobiens* (2012) 14, 168—174
19. SCRIBAN R. (1999) . *Biotechnologie. Technique et Documentation*, 5ème édition, Lavoisier, Paris .
20. KUMAR A.G. , NAGESH N. , PRABHAKAR T.G. et SEKARAN G. (2008) . Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp . Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresources of Technology*, 99 , 2364 2372 .

21. BENSMAIL S. (2012) . Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide purification et caractérisation. Diplôme de Magister, Université M'Hamed BOUGARA, Boumerdès , Algérie .
22. PELMONT J. (1995) . Enzymes : catalyseurs du monde vivant . Presse Universitaire de Grenoble, 621 , 652-654.
23. Leclerc Henri (1990) Biologie appliquée (9) ISBN: 978-2-7040-0070-8 .
24. GUPTA A. , GUPTA V - K . , MODI D - R . et YADAVA L - P . (2008) . Production and characterization of α - amylase from *Aspergillus niger* . *Biotechnology* , 7 (3) , 551-556 .
25. SINE J - P . (2010) . Enzymologie et applications . Ellipses Edition marketing S.A. Paris .
26. SIMON P. et MEUNIER R. (1970) . Microbiologie industrielle et génie biochimique . Masson et Cie , Paris .
27. J.-C. Chottard, J.-C. Depezay, J.-P. Leroux, Hermann, Chimie fondamentale III. Réactions organiques et enzymatiques, 1982 (Niveau L).
28. J. Pelmont, EDP Sciences, Enzymes, catalyseurs du monde vivant, 1995 (Niveau M1).
29. A. Cornish-Bowden, M. Jamin, V. Saks, EDP Sciences, Cinétique Enzymatique, 2005 (Niveau M1).
30. Moklesur .R S, Islam . K, Hasniza Z.H, Imam .H, Studies of the Impact of Occupational Exposure of Pharmaceutical Workers on the Development of Antimicrobial Drug Resistance; 2014.
31. Delmas G et coll., Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005.

32. Abbas Z ; Identification des facteurs et leur impact sur la formation des employés et la performance organisationnelle au Pakistan. Khadim Ali Shah Bukhari Institute of Technology (KASBIT), KASBIT Business Journals, 7, 93-109; 2014.
33. Ministère de l'Agriculture ; <https://agriculture.gouv.fr> › les-bacillus-cereus 2011.
34. Devine, K. M., (1995). The Bacillus subtilis genome project: aims and progress. Tibtechnology; 13:210-216.
35. Al - Khatib MS , Khyami - Horani H , Badran E , Shehabi AA . Incidence and characterization of diarrheal enterotoxins of fecal Bacillus cereus isolates associated with diarrheal . Diagn Microboil Infect Dis 2007;59:383-7.
36. Ankolekar C , Rahmati T , Labbe RG . Detection of toxigenic Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis spores in U.S. rice . Int J Food Microbiol 2009 ; 128 : 460-6.
37. Banerjee , M .; Sarkar , P.K. Microbiological quality of some retail spices in India . Food Res . Int . 2003 , 36 , 469-474.
38. Kloepper , JW . , Ryn , C.M. et Zhang , S. (2004) . Induced systemic resistance and promotion of plant growth by Bacillus sp . Phytopathol . , 94 : 1259-1266 .
39. L'Agence de l'Union Européenne ;(2023).
40. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Annexes :

Milieu Mossel :

Peptone	10,0 g
Extrait de viande	1,0 g
Mannitol.....	10,0 g
Jaune d'œuf.....	20 %
Sulfate de Polymyxine B.....	0,01 g
Rouge de phénol.....	0,025 g
Chlorure de sodium	10,0 g
Agar	14,0 g
pH=7,2	



Figure15 : Milieu mossel

Milieu GN+ lait UHT :

GN.....	28g
L'eau distillée.....	1l
Lait UHT.....	10%



Figure16 : Milieu GN + 15% de lait UHT

Milieu GN + l'amidon :

GN.....	28g
L'eau distillée.....	1l
L'amidon.....	1%

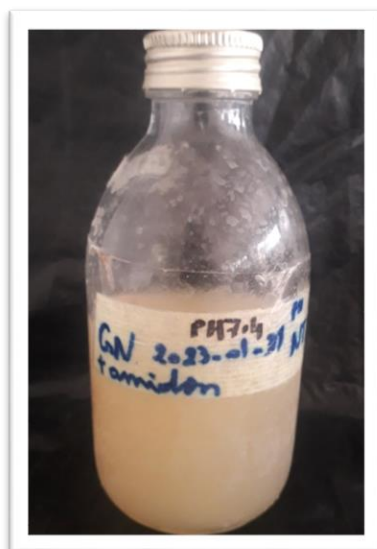


Figure 17 : Milieu de GN + 1% d'amidon

Milieu GN + le sang :

GN.....	28g
L'eau distillée	1l
Le sang.....	5%

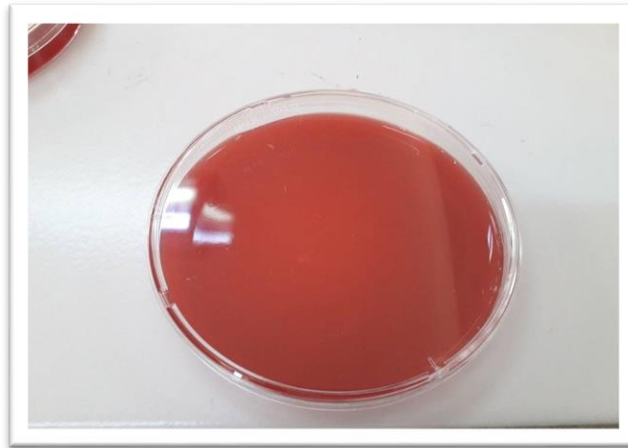


Figure18 : Milieu GN + 5% de sang de cheval

Milieu MH :

MH broth.....	38g
Agar	17g
L'eau distillée	1l



Figure 19 : Milieu de MH

L'eau physiologique :

NACL..... 9g

L'eau distillé.....11