

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

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

THEME

**Isolement, dénombrement des spores du groupe
B.cereus et étude de leurs thermorésistance.**

Présenté par :

KOUIDRI Amel.

RAI Nala.

Proposé par :

Mr.MADOURI Redouane.

Soutenu publiquement le 30/06/2021 devant le jury composé de :

Président:Mr.Rahmani Mohamed Mokhtar.

Examineur :Mr. Djebli Ahmed.

Rapporteur :Mr. Madouri Redouane.

Co-Rapporteur :Mme. Bouabdeli Khadidja.

Année universitaire :2020/ 2021.

Remerciements

Nous remercions Allah de nous avoir donné le savoir et la faculté de pouvoir poursuivre nos études, la patience durant ces années d'étude.

*Nous voudrions présenter nos remerciements à notre encadreur **Mr.MADOURI Redouane** Pour l'intérêt qu'il a accordé au sujet proposé, ses conseils et ses encouragements, nous voudrions également lui témoigner notre gratitude pour sa patience et son soutien qui nous a été précieux afin de mener notre travail à bon port.*

*Nous tenons à remercier notre co-encadreur **Mme. Bouabdeli Khadidja** de nous avoir aidé à réaliser ce travail.*

*Nous tenons à remercier **Mr. Rahmani Mohamed Mokhtar** d'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance.*

*Nos remerciements vont également à **Mr. Djebli Ahmed** qui nous a fait l'honneur d'examiner ce travail.*

Nous remercions sincères à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leur compétence nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Aux personnels du laboratoire de l'université de Laghouat pour leur aide.

Aux personnels du Centre Algérien de Contrôle de Qualité et de l'emballage de Ghardaïa de nous avoir aidé et nous donné l'accès au laboratoire.

Dédicace

Je dédie affectueusement ce modeste travail à :

Mes très chers parents avec toute ma reconnaissance, mon affection, et mon amour,

Ma chère maman, qui n'a jamais cessé de m'encourager et me soutenir pour que j'atteigne ce niveau,

*La mémoire de mon défunt cher frère Aymen que son âme repose en paix
Inch'Allah,*

Mon cher frère Toufik, pour son encouragement constant, et son soutien moral,

Mon adorable nièce Lyna,

Tata Fouzia, Noura, Souhila et Asma,

Mon cher binôme Amel,

*Toutes mes amies, particulièrement :Hadjer, Seria, Hounaida, Yasmine,
Amina et Nahla,*

Tous mes amis qui m'ont encourager pour réaliser cemémoire,

Tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

Nala

Dédicace

Je dédie humblement ce travail avec amour et affection À la reine de ma vie, la source de mon bonheur et de mon soutien infini, à qui je suis vraiment reconnaissante, ma mère bien-aimée.

À l'homme qui a sacrifié sa vie pour en tirer le meilleur parti de moi, à mon cher père.

À mes chères sœurs, et mes précieux frères pour leur amour, leur soutien et leur aide constants.

*À tous les membres de ma famille et toute personne qui porte le nom
KOUIDRI.*

À mon binôme Nala.

Enfin à toutes les personnes qui comptent pour moi

À tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin et qui m'ont accompagné et m'ont donné la force à continuer.

Amel

Liste des abréviations

AFNOR : Association française de normalisation.

AW : L'activité de l'eau.

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

CytK : cytolysine K.

CytK : La cytotoxine K.

D : Durée de réduction décimale.

DPA : L'acide dipicolinique.

EntFM : Entérotoxine FM.

HBL : Hémolysine BL.

MnSO₄ : Sulfate monohydrate de manganèse.

MYP : Mannitol egg yolk polymyxin.

NHE : Entérotoxine non hémolytique.

P : Paramètre de distribution.

TIAC : Toxi-infections alimentaires collectives

SASP : Small acide soluble spore proteins.

TSE : Tryptone sel eau.

UFC : Unités Formatrices de Colonie.

Z : Sensibilité au traitement thermique.

Liste des figures

Figure 01: La structure des spores de <i>Bacillus cereus</i> au microscopie électronique à transmission.....	15
Figure 2: Les étapes de la sporulation	17
Figure 03 : Exemple de courbes de réduction obtenues lors d'un traitement thermique. ..	21
Figure 04 : Des échantillons d'épices sous emballage et en vrac.....	27
Figure 05 : La réalisation des dilutions décimales et ensemencement sur le milieu Mossel complet.	28
Figure 06: Les colonies de <i>B. cereus</i> Présomptif sur le milieu MYP (curcuma)	33
Figure 07 : Les colonies de <i>B. cereus</i> Présomptif sur le milieu MYP (mélange).	33
Figure 08: La prévalence de <i>B.cereus</i> dans les épices collectées.....	35
Figure 09 : Diagramme de niveau de contamination par région	36
Figure 10 : Résultat au traitement thermique à 85°C sur GN (souche1).....	37
Figure 11 : Résultat au traitement Thermique à 95°C sur GN (souche3).....	37
Figure 12: Cinétique de destruction de la souche 1, A(95°C), B(100°C), C(110°C).	38
Figure 13: Cinétique de destruction de souche 8 à 95°C.....	40
Figure 14 : Cinétique de destruction de la souche 9, A(95°C), B(100°C), C(110°C).....	41
Figure 15 : Sensibilité de souche 1	42
Figure 16 : Sensibilité de la souche 3.	43
Figure 17 : Sensibilité de la souche 8.	43
Figure 18 : Sensibilité de la souche 9	44

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification phénétique du genre Bacillus.	6
Tableau 02 :Caractéristiques des sept groupes génétiques chez Bacillus cereus sensu lato.	8
Tableau 03 :Principaux caractères communs et distinctifs des espèces du groupe B.cereus sensu lato.	9
Tableau 04 : Niveaux de thermorésistance de spores bactériennes.....	20
Tableau 05 :Nombre et répartition des échantillons par ville.....	25
Tableau 06 : Liste des épices utilisées de différentes Wilayas.....	26
Tableau07 :Les tests de confirmation.	30
Tableau 08 : L'origine d'épices et leurs codes.....	32
Tableau 09 : Barème du traitement thermique	31
Tableau 10 : La prévalence de B .cereus dans les épices collectées	34
Tableau 11 : Paramètre de la thermorésistance DT et ZT des 4 souches.	Erreur ! Signet non défini.

Résumé

De nombreux plats cuisinés sont préparés à base d'épices et herbes séchées, ces derniers peuvent être contaminés par plusieurs types de microorganismes y compris les bactéries sporulées aérobies. *Bacillus cereus* est un groupe de bactéries caractérisé par la présence de spores thermorésistantes incriminées dans les TIAC.

Ce travail vise à évaluer le niveau de contamination de différentes épices par les spores de *B.cereus* ainsi d'étudier la thermorésistance de ces derniers.

Les résultats ont montrés que parmi les 35 échantillons analysés 14% ont été contaminés avec un taux maximal de 7.3×10^2 (ufc /g) dans le Paprika prélevé de la wilaya de Laghouat.

Concernant l'étude de la thermorésistance dans une matrice alimentaire, des valeurs du D95 allant de 6.7 à 33.5 min pour l'isolat du poivre noir et du D110 de 1.5min à 3.2 min pour le mélange.

La sensibilité au traitement thermique a montré que la souche 01 a été la plus thermorésistante avec un Zt de 40.6°C. En revanche la souche 09 était la plus sensible avec un Zt égale à 15.2°C.

Ces résultats peuvent être utiles pour simuler le développement des spores de *B.cereus* des épices dans les préparations culinaires qui subissent un traitement thermique.

Mots clés : Epice, *B. cereus*, Spore, Thermorésistance, valeur D, Valeur Z

Abstract

Many cooked dishes are prepared with dried spices and herbs, which can be contaminated with several types of microorganisms including aerobic spore bacteria. *Bacillus cereus* is a group of bacteria characterized by the presence of thermoresistant spores incriminated in TIAC.

This work aims to assess the level of contamination of different spices by *B.cereus* spores and to study their thermoresistance.

Results showed that of the 35 samples analyzed, 14% were contaminated with a maximum rate of 7.3×10^2 (ufc/g) in Paprika collected from Laghouat wilaya. For the study of thermoresistance in a food matrix, values of D95 ranging from 6.7 to 33.5 min for black pepper isolate and D110 from 1.5min to 3.2 min for blend.

Heat treatment sensitivity showed that strain 01 was the most thermoresistant with a Zt of 40.6°C. In contrast, strain 09 was the most sensitive with a Zt equal to 15.2°C. These results may be useful in simulating the development of *B. cereus* spores of spices in culinary preparations undergoing heat treatment.

Keywords: Spice, *B. cereus*, Spore, Thermoresistance, ValueD, Value Z.

الملخص

يتم إعداد العديد من الأطباق بالتوابل و الأعشاب المجففة و يكمن تلوثها من قبل عدة أنواع من الكائنات الحية الدقيقة بما في ذلك البكتريا الهوائية ذات الابواغ.

B. cereus هي مجموعة من البكتريا التي تتميز بوجود ابواغ مقاومة للحرارة التي تتسبب في تسمم غذائي جماعي .

يهدف هذا العمل إلى تقييم مستوى تلوث التوابل المختلفة بواسطة دراسة مقاومة الحرارة الخاصة بهم, أظهرت نتائج الدراسة ان النسبة المئوية للعينات الموجبة الملوثة قدرت ب 14% من بين 35 عينة بمقدار للفلفل الأحمر 7.3×10^2 (ufc/غ) في منطقة الاغواط.

بالنسبة لنتائج دراسة مقاومة حرارة الابواغ في مادة غذائية فان قيم D95 تتراوح ما بين 6,7 إلى 33,5 دقيقة بالنسبة لعينة الفلفل الأسود . فيما يخص D110 تتراوح ما بين 1,5 إلى 3,5 دقيقة بالنسبة لرأس الحانوت (خليط التوابل). درجة حرارة Z 40.6 و بينت نتائج دراسة مدى تأثير درجة الحرارة ان العينة 1 هي الأكثر مقاومة للحرارة ساليوس مع حساسية تقدر ب 15.2 درجة حرارة ساليوس بالنسبة للعينة 9. هذه النتائج يمكن استعمالها في التنبؤ بتطور ابواغ *B. cereus* في التوابل أثناء إعداد الأطباق التي تخضع إلى تعد بواسطة الحرارة.

الكلمات الدالة: التوابل ،، ابواغ ، مقاومة الحرارة، D-قيمة ، Z-قيمة.

Table des matières

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

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur le groupe *B. cereus*

I. Généralités sur le groupe <i>Bacillus cereus</i> sensu lato	5
I.1. Classification	5
I.1.1. Phénétique	6
I.1.2. Phylogénétique	7
I.2. Caractéristiques de <i>Bacillus cereus</i> sensu lato	7
I.2.1. Caractéristiques physiologiques	7
I.2.2. Caractéristiques biochimiques	8
I.4. L'affection du groupe de <i>B. cereus</i> sur les produits alimentaires	10
I.4.1. Microbiologie des épices	10
I.4.2. L'influence de l'agent pathogène de <i>Bacillus cereus</i> sur les épices.....	11
I.5. <i>B. cereus</i> et l'intoxication alimentaire.....	11
I.5.1. Pourvoir toxique de <i>B. cereus</i>	11
I.5.2. Atteintes gastro-intestinale	12
I.5.2.1. Syndrome diarrhéique	12
I.5.2.2. Syndrome émétique.....	12

Chapitre II : La thermorésistance des spores de *B. cereus*

II .1. Généralité sur les spores de <i>Bacillus cereus</i>	15
II.2. Structure et composants des spores <i>B. cereus</i>	15
II.2.1. Exosporium	16
II.2.2. Tuniques de spores	16

II.2.3. Membrane externe.....	16
II.2.4. Cortex.....	16
II.2.5. Membrane interne.....	16
II.2.6. Cœur.....	16
II.3. La sporulation chez les <i>Bacillus cereus</i>	17
II.4. La thermorésistance des spores de <i>B. cereus</i>	17
II.5. L'origine de la thermorésistance des spores.....	18
II.6. Les facteurs influençant sur la thermorésistance.....	18
II.6.1. L'effet de la température.....	18
II.6.2. L'effet du pH.....	19
II.6.3.L'effet d'activité d'eau.....	19

Partie 2: Etude Expérimentale

Chapitre III:Matériel et méthodes

III. Introduction.....	24
III.1. Description de la région d'étude.....	24
III.1.1. La wilaya de Laghouat.....	24
III.1.2. La Wilaya de Ghardaïa.....	24
III.1.3. La Wilaya de Tlemcen.....	24
III.2. Recherche des spores de <i>B. cereus</i> dans les épices et les herbes séchées.....	24
III.2.1. Prélèvement et transport des échantillons d'épices et herbes séchées.....	25
III.2.2. Isolement et dénombrement des spores de <i>B. cereus sensu lato</i>	27
III.2.2.1. Milieu de culture.....	27
III.2.2.2. Préparation des échantillons et leurs dilutions.....	27
III.2.2.3. Dénombrement des <i>Bacillus cereus sensu lato</i>	28
III.2.3. La confirmation de l'appartenance des souches au groupe <i>B. cereus</i>	29
III.2.4. Production et conservation des spores de <i>Bacillus cereus sensu lato</i>	30
III.2.4.1. Préparation de pré-cultures.....	30
III.2.4.2. Préparation de la suspension sporale.....	30
III.2.4.3. Récupération et lavage du culot des spores de <i>B. cereus sensu lato</i>	30
III.3. Étude de la thermorésistance des spores de <i>B. cereus</i>	31
III.3.1. Préparation de la matrice alimentaire.....	31
III.3.2. Traitement thermique et ensemencement.....	31
III.3.3. Dénombrement des cellules survivantes.....	32
III.4. Détermination des paramètres de la thermorésistance.....	32

III.4.1. La mesure de la durée de réduction décimale DT°C	32
III.4.2. La mesure de valeur Zt	32

Chapitre IV : Résultats et Discussion

Résultats et discussion	33
IV.1. Résultats de la recherche des spores de <i>B. cereus</i>	33
IV.1.1. La prévalence des spores de <i>B. cereus</i> sensu lato dans les épices.....	33
IV.2. Niveau de contamination.....	36
IV. Etude de la thermorésistance des spores de <i>B. cereus</i>	37
IV.2.1. Cinétique de destruction DT	41
IV.2.2. Sensibilité au traitement thermique Zt	Erreur ! Signet non défini.

Conclusion

Références bibliographiques.....	43
Annexes	41

Introduction

Générale

Introduction générale

De nombreuses épices et herbes aromatiques, sont des produits fréquemment utilisés pour la préparation des aliments dans la cuisine tels que les sauces, les soupes et les formes fraîches en purée ou en pâte. Ces produits d'origine végétale ont des saveurs intenses sont généralement utilisées dans la cuisine familiale et autres (Susheela.,2007).

Les épices et les herbes sont dérivés de diverses parties anatomiques des plantes, telles que les feuilles, les rhizomes, les tiges, les fleurs, les fruits, les graines, les bulbes et l'écorce. Malgré leur faible valeur nutritionnelle, ils possèdent une bonne valeur sensorielle et ont une profonde influence sur le système digestif (Garbowska et al.,2015). La plupart de ces produits sont stockés dans des conditions sèches après la récolte; cependant, le contact avec l'air et l'augmentation de l'humidité affecte la qualité des épices en augmentant la probabilité de contamination microbienne (Kim et al .,2012).

Les condiments peuvent contenir divers micro-organismes, y compris des bactéries sporulées et des moisissures qui peuvent survivre dans des conditions d'activité d'eau. Parmi les micro-organismes les plus résistants à la dessiccation figurent les bactéries *Bacillus cereus* formant des spores, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* et les moisissures, telles que *Aspergillus spp.* qui sont des producteurs potentiels d'une variété de toxines (Witkowska et al ., 2011).

B. cereus forment des endospores et survivent dans diverses conditions de stress. De plus, l'élimination de *B. cereus* est difficile pendant la pasteurisation (Hertwig .,2015). *B. cereus* est un pathogène humain producteur de toxine responsable de deux types d'intoxications alimentaires d'origine émétique par une toxine thermostable céréulide ou diarrhéique (Sastalla et al., 2013).

D'autre part, l'incidence réelle de *B. cereus* comme un pathogène alimentaire est encore mal connue pour un certain nombre de raisons y compris diagnostic erroné de la maladie, qui peut être symptomatiquement semblable à d'autres types d'intoxication alimentaire et déficiences diagnostiques à l'égard de cet agent pathogène d'origine alimentaire (Fricker et al.,2008).

La préparation des plats cuisinés se fait à des hautes températures et à un moment qui peut être début, mi ou fin de cuisson ne laissent survivre que les microorganismes thermorésistants et principalement les spores microbiennes, ces microorganismes sont issus principalement d'épices utilisées.

En Algérie, peu d'études sur la caractérisation des espèces de *B.cereus* isolés à partir d'un produit alimentaire ont été réalisées. Au niveau de la wilaya de LAGHOUAT aucune étude n'a été faite sur la thermorésistance des spores de ces espèces contenues dans les épices et herbes séchées.

Notre travail vise à :

- (i) Etudier le niveau de contamination des épices commercialisées dans la région de Laghouat, Ghardaïa et Maghnia par les spores du groupe *B. cereus*;
- (ii) Isoler et préparer des stocks de spores qui peuvent être utilisés ultérieurement pour une éventuelle d'identification moléculaire ;
- (iii) Etudier la thermorésistance des spores du groupe *B. cereus* isolées à partir des épices de la région de Laghouat.

Notre travail s'organise comme suit:

- ❖ Une synthèse bibliographique englobe deux chapitres :
 - Premier Chapitre expose des généralités sur le groupe *Bacillus cereus sensu lato*.
 - Deuxième chapitre traite des généralités sur la thermorésistance des spores de *Bacillus cereus*
- ❖ Une Partie pratique englobe deux chapitres:
 - Le troisième chapitre décrit la méthodologie et les techniques utilisés dans l'isolement et dénombrement des spores de *B. cereus sensu lato*, la production et la conservation de ces spores et l'étude de la thermorésistance des stocks de spores.
 - Le quatrième chapitre montre les résultats obtenus avec leurs discussions
- ❖ Et enfin une conclusion générale.

*Partie 1 : Synthèse
bibliographique*

Chapitre I :
Généralités sur le
groupe B. cereus

I. Généralités sur le groupe *Bacillus cereus* sensu lato

Le groupe *Bacillus cereus*, aussi connu sous le nom de *B. cereus* sensu lato, représente un groupe de bactéries à Gram positif (Fayad et al., 2019), comprenant sept espèces : *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* et *Bacillus weihenstephanensis* (Frankland. and Frankland, 1887), ainsi que la nouvelle espèce *Bacillus cytotoxicus* (Fagerlund et al., 2008).

D'autres espèces de ce groupe ont été récemment découvertes qui sont les suivants : *Bacillus gaemokensis*, *Bacillus manliponensis*, *Bacillus bingmayongensis* et *Bacillus wiedmannii* (Fayad et al., 2019).

Les espèces de ce groupe sont écologiquement diverses cependant phylogénétiquement proche (Fayad et al., 2019). Cette diversité s'explique par la présence de ce groupe de bactéries dans le sol, surfaces végétales, l'eau contaminée (Berthold-Pluta et al., 2019) et différentes catégories de produits alimentaires tels que : la pomme de terre, les produits laitiers séchés, les pâtes, produits carnés, café, pousses de légumes et épices (Carter et al., 2018).

Ces espèces sont caractérisées par la formation des endospores (Hariram and Labbé, 2016) résistantes aux conditions défavorables (Fogele et al., 2018) pouvant avoir un effet négatif sur la qualité et la sécurité du produit (Lücking et al., 2013). Ceci peut avoir un effet néfaste sur la santé de l'Homme.

I.1. Classification

Les bactéries du genre *Bacillus* font partie du domaine des eubactéries (ou Eubacteria), du phylum (ou division) des firmicutes, Class des Bacilli, Ordre des Bacillales et Famille des Bacillaceae ; a été créé par Ferdinand Cohn en 1872 et comprend des Gram positifs. Elles sont dénommées bactéries à bas G+C % et à coloration de Gram positive (Dromigny., 2009).

La classification des *Bacillus* fait apparaître des groupes taxonomiques importants, cependant il n'est pas possible de mettre en évidence une véritable classification

dichotomique. Toutefois, certains groupes reposent sur les plans phénétique et phylogénétique. (Dromigny., 2009).

I.1.1. Phénétique

Selon Drobniowski. (1993) le genre *Bacillus* est réparti en trois grands groupes selon la morphologie de la spore et du sporange tableau 01.

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

Classification	Les caractérisations	
Groupe I	<p>Sous-groupe A</p> <ul style="list-style-type: none"> • Des cellules végétatives en forme de bacilles de Gram positif • Largeur des cellules supérieure ou égale 1 µm • Production de spores ellipsoïdes ou cylindriques • Spore centrale ou terminale • Spore qui ne dilate pas les sporanges • Des inclusions protoplasmiques de poly-bêta-hydroxybutyrate (<i>B.anthraxis</i>, <i>B.cereus</i>, <i>B.mycoïdes</i>, <i>B.megaterium</i>, <i>B.thuringiensis</i>, <i>B.pseudomycoïdes</i> et <i>B.stephanensis</i>.) 	<p>Sous-groupe B</p> <ul style="list-style-type: none"> • Des bactéries à petites cellules (diamètre inférieur à 1µm). • Dépourvues d'inclusions protoplasmiques de poly-bêta-hydroxybutyrate (<i>B.subtilis</i>, <i>B.licheniformis</i>, <i>B.firmus</i> ...).
Groupe II	<ul style="list-style-type: none"> • Bacilles sont à coloration de Gram variable • Des sporanges gonflés avec des spores ellipsoïdes centrales ou terminales (<i>B.alvei</i>, <i>B.brevis</i>, <i>B.circulans</i>...) 	
Groupe III	<ul style="list-style-type: none"> • (<i>B.sphaericus</i>, <i>B.globisporus</i>, <i>B.insolitus</i>) • Hétérogènes à coloration de Gram variable • Des sporanges gonflés, avec des spores sphériques terminales ou sub-terminales 	

I.1.2. Phylogénétique

Le groupe phylogénétique I inclut l'espèce *B. pseudomycoïdes*. Les groupes II, III, IV, V contiennent les espèces *B. cereus* et *B. thuringiensis*. *B. anthracis* (Guinebretière et al., 2013). Le groupe VI contient les souches psychrotrophes de *B. weihenstephanensis* et *B. mycoïdes* (Stenfors and Granum, 2001). Le groupe VII contient une espèce nouvellement décrite : *B. cytotoxicus* (Guinebretière et al., 2013).

D'autres espèces se distinguent par des schémas de croissance rhizoïdes, thermotolérance et cytotoxicité, psychrotolérance et une capacité à altérer les aliments et leurs utilité comme probiotique en nutrition animale (Bazinet, 2017).

I.2. Caractéristiques de *Bacillus cereus* sensu lato

I.2.1. Caractéristiques physiologiques

Les espèces du groupe *Bacillus cereus* sensu lato ont été classées physiologiquement selon leurs capacités de croître à des valeurs extrêmes de pH, concentration de sel, d'activité d'eau et de température.

Selon la variabilité de la température il existe des souches mésophiles dont la température optimale de croissance est comprise entre 25 et 35°C, et d'autres souches psychrotolérante dont la température optimale de la croissance est comprise entre 25 et 35°C et qui sont en outre capables de croître à 7°C (Dromigny., 2009). S'ajoute la présence de souches thermophiles (Lücking et al., 2013) résistant à 80°C pendant 10 min (Glasset., 2016). D'autres part il existe des souches acidophiles, alcalophiles, halotolérantes ou halophiles (Dromigny., 2009).

Tableau 02 :Caractéristiques des sept groupes génétiques chez *Bacillus cereus* sensu lato(**Guinebretière et al., 2008**).

Groupes	Température de croissance
I	10 – 43°C
VI	5 – 37°C
II	7 – 40°C
V	10 - 40 °C
IV	10 - 45°C
III	15 - 45°C
VII	20 - 50°C

I.2.2. Caractéristiques biochimiques

Le groupe bactérien *Bacillus cereus* sensu lato est caractérisé par la production d'enzymes extracellulaire (**Dromigny., 2009**) tels que (protéases, lipases et phospholipase) induisant un changement de texture, structure et une altération de l'aliment, aussi la production de l'enzyme de lécithinase et des substances cytotoxique ont été mise en évidence dans les isolats de ce groupe(**Lücking et al., 2013**). Ces bacilles sont des nitrifiants, dénitrifiants et fixateurs d'azote(**Dromigny., 2009**).

Tableau03 :Principaux caractères communs et distinctifs des espèces du groupe *B.cereus* sensu lato(**Guinebretiere and Borja, 2003**).

Caractères	<i>B.cereus</i>	<i>B.thuringiensis</i>	<i>B.mycoides</i>	<i>b.anthraxis</i>	<i>B.weihinstephanesis</i>	<i>B.pseudomycoloides</i>
Lécithinase	+	+	+	+	+	+
Utilisation de mannitol	-	-	-	-	-	-
Résidence aux lysosomes	+	+	+	+	+	+
Réaction VP	+	+	+	+	+	+
Réduction du nitrate	+	+/-	+	+	+	?
Fermentation de glucose	+	+	+	+	+	+
Mobilité	+/-	+/-	-	-	+/-	-
Hémolyse (sang di mouton)	+	+	(+)	-	+	?
Cristal parasporal (endotoxine pathogène des insectes)	-	+	-	-	-	-
Lyse par phage gamma	-	-	-	+	-	?
Sensibilité à pénicilline	-	-	-	+	-	?
Toxine impliqué dans la maladie de charbon	-	-	-	+	-	-
Entérotoxines	+	+	+	?	+	+ ?

+ : >85% de souches positives ; +/- : 50 à 84% positives ; (+) : positives faibles ; ? : absence de données suffisantes.

I.3. Morphologie et structure cellulaire de *Bacillus cereus*

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes à extrémités angle droit ou arrondies, assez volumineux mesurant de 1 à 1,2 µm de diamètre par 3 à 5 µm de long (**Dromigny., 2009**).

Ce sont des Gram positifs ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que pour les très jeunes cultures), aérobies et anaérobies facultatives, formants des spores, sont en règle générale encapsulés (la capsule apparait d'une coloration à l'encre de chine (**Dromigny., 2009**).

Généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche (*B. anthracis* et *mycoides* sont immobiles)(**Drobniewski., 1993**), le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase, Sur le milieu de culture, les chaînes sont souvent très longues, avec un aspect que l'on qualifié généralement de « tige de bambou »(**Dromigny., 2009**).

I.4. L'affection du groupe de *B.cereus* sur les produits alimentaires

Les spores de *B. cereus* se trouvent pratiquement dans divers sortes d'aliments tels que les produits secs ou déshydratés, certains légumes, céréales, farines, épices et herbes aromatiques. Ces matières premières entrant dans la composition d'un produit fini, ils sont des sources potentielles de contamination (**Anses., 2011**) par la présence des spores très résistantes aux conditions environnementaux extrêmes(**Andersson et al., 1995**). Ils influencent sur le produit final et sa détérioration et l'échec de la conservation des aliments, malgré la technologie alimentaire moderne et les techniques de stérilisation(**Lücking et al., 2013**).

I.4.1. Microbiologie des épices

Les épices et les herbes sont principalement cultivés et récoltés dans des régions au climat chaud et humide. La plupart des épices sont stockées dans des conditions sèches, cependant, le contact avec l'air et l'augmentation de l'humidité affectent la qualité des épices en augmentant la probabilité d'altération microbienne ; ne doivent être stockées que

dans des emballages fermés pour éviter le développement de moisissures productrices de mycotoxines(Fogele et al., 2018).

Le Code d'usages du Codex en matière d'hygiène stipule que les épices et les herbes ne devraient pas contenir de microorganismes produisant des toxines en quantités qui augmente les risques pour la santé (Fogele et al., 2018).Le nombre de bactéries retrouvés dans les aliments était en moyenne de 105 Unités Formatrices de Colonie (UFC) par gramme(Stenfors Arnesen et al., 2008).

I.4.2.L'influence de l'agent pathogène de *Bacillus cereus* sur les épices

Les épices ont récemment retenu l'attention en raison de cas de maladies d'origine alimentaire, contiennent naturellement des niveaux élevés de micro-organismes(Hariram and Labbé, 2016), ces microorganismes font partie de la microflore permanente de diverses matières premières et denrées alimentaires (Berthold-Pluta et al., 2019). Ces épices contiennent généralement un grand nombre de formateurs de spores bactériennes aérobies, y compris *B. cereus*(Hariram and Labbé, 2016).

Les spores survivent aux températures de cuisson et, en raison de mauvaises conditions de rétention, germent et se multiplient pour causer des maladies qui sont d'origine alimentaire (Hariram and Labbé, 2016). Selon Fogele et al. (2018),les épices les plus contaminées étaient les poivrons noirs moulus,ainsi que d'autres épices et herbes, y compris le piment, la coriandre, le curcuma, le curry avec des concentrations élevées de *B. cereus*.Tandis que La cannelle, le cumin, les clous de girofle, le romarin et le thym avaient une concentration relativement faible de *B. cereus*, la cannelle peut inhiber la croissance de *B. cereus*, le cumin et les clous de girofle contiennent des huiles essentielles importantes qui peuvent réduire considérablement la contamination microbiologique(Fogele et al., 2018).

I.5.*B.cereus* et l'intoxication alimentaire

I.5.1. Pourvoir toxique de *B.cereus*

Le groupe *B. cereus* produit différents facteurs de virulence potentiels pouvant agir demanière synergique au sein de l'hôte. Plusieurs entérotoxines : l'entérotoxine tripartite

HBL hémolysine BL (HBL), l'entérotoxine non hémolytique (NHE), une seule protéine entérotoxine cytotoxine K (CytK) et l'entérotoxine FM (entFM) (Carter et al., 2018). Les toxines insecticides de *B. thuringiensis*, également appelées δ -endotoxines, forment un cristal parasporal, libéré dans l'environnement à la fin de la phase de sporulation (Fayad et al., 2019) et la toxine émétique (céréulide) ont été associées à des infections par *B. cereus*, ces infections qui sont à l'origine de toxico-infections alimentaires (Didelot et al., 2009).

La prévalence de ces gènes de toxines varie selon les différentes souches de *B. cereus* (Carter et al., 2018). En fonction du type de toxine produite on distingue deux syndromes un syndrome diarrhéique et un syndrome émétique.

I.5.2. Atteintes gastro-intestinale

I.5.2.1. Syndrome diarrhéique

Le syndrome diarrhéique est une toxi-infection induite par les trois entérotoxines poreformatrices cytolysine K (CytK), entérotoxine non hémolytique (Nhe) et l'hémolysine BL (Hbl) produite par les cellules végétatives de l'intestin grêle caractérisé par des douleurs abdominales et une diarrhée aqueuse apparaissant 8 à 16 h après l'ingestion d'aliments contenant des cellules végétatives ou des spores de souches pathogènes de *B. cereus* (Berthold-Pluta et al., 2019).

Le nombre estimé de cellules végétatives ou de spores de *B. cereus* qui cause une intoxication alimentaire de type diarrhéique est d'environ 5 à 8 log UFC (Berthold-Pluta et al., 2019). Le type diarrhéique est associé à la viande, aux sauces, au pudding, aux légumes et aux produits laitiers (Hariram and Labbé, 2016).

I.5.2.2. Syndrome émétique

La maladie de type émétique est causée par la toxine émétique céréulide thermostable (Lücking et al., 2013), qui est produite dans les aliments déjà contaminés avant son ingestion ; Les souches de toxine émétique ne peuvent pas produire de toxine Hbl et ne contiennent pas de gènes hbl, et seules quelques-unes ont le gène cytK (Fogele et al., 2018). Les premiers symptômes d'intoxication alimentaire de type émétique (nausées, vomissements, maux de tête) surviennent déjà 1 à 5 h après la consommation d'aliments

contenant du céréulide-aleurone et peptide résistant à l'acide gastrique(**Berthold-Pluta et al., 2019**).

Ce type d'intoxication alimentaire est le plus souvent associé à l'ingestion de produits céréaliers, notamment de riz(**Berthold-Pluta et al., 2019**)et les produits farineux(**Hariram and Labbé, 2016**). la toxine émétique céréulide est de plus en plus liée à des manifestations cliniques sévères, y compris des insuffisances hépatiques aiguës, et a également été rapportée comme agent causal de l'encéphalopathie aiguë (**Ehling-Schulz et al., 2015**).

Des résultats récents d'essais in vitro ont montré un effet néfaste de céréulide sur les cellules bêta pancréatiques, même à de faibles concentrations. Étant donné que le dysfonctionnement des cellules bêta et la mort cellulaire jouent un rôle clé dans la physiopathologie du diabète, ces résultats rendent possible qu'une consommation à long terme d'aliments contaminés au céréulide puisse avoir des implications dans le diabète (**Ehling-Schulz et al., 2015**).

Chapitre II :

La thermorésistance des spores de *B.cereus*

II .1. Généralité sur les spores de *Bacillus cereus*

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

Les spores de *B.cereus* sont non déformantes et situées en position centrale à subterminale . La forme et les dimensions sporale de *B.cereus* sont généralement une forme ovale à sphérique voire cylindrique, mesurant en moyenne 1µm par 1 à 2 µm semblables de celles du genre *Bacillus*(Dromigny.,2008).

Les bactéries appartenant aux genres *Bacillus* sont capables de former des spores qui peuvent rester à l'état latent pendant de nombreuses années et lorsque les conditions seront favorables se germine(Abbas.,2014) .

II.2. Structure et composants des spores *B. cereus*

La spore se compose de l'extérieur vers l'intérieur d'un:exosporium, des tuniques internes, externes , d'une membrane externe, d'un cortex, d'une membrane interne et d'un cœur(Abbas;2014).Chez *Bacillus cereus*, on trouve une structure additionnelle: l'exosporium(Dromigny.,2008).(voir la figure 01)

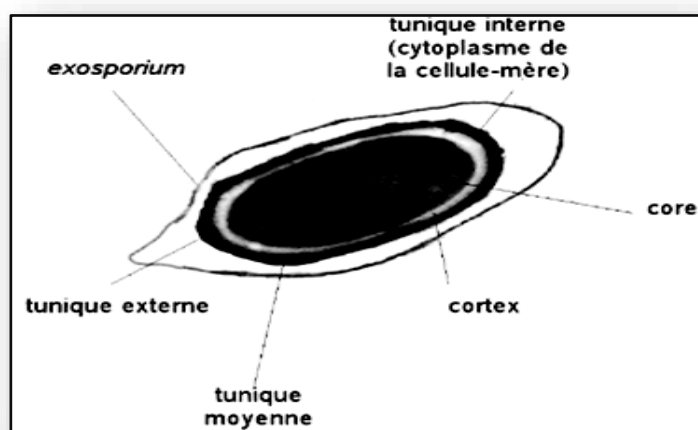


Figure 01:La structure des spores de *Bacillus cereus* au microscopie électronique à transmission(Dromigny.,2008).

II.2.1. Exosporium

Est observable autour des spores de *B. cereus* sensu lato mais n'a jamais été observé autour des spores de *B. subtilis* et *B. licheniformis*(**Faille et al.,2010**), est composée de protéines et de glucides n'est pas essentielle à la survie de la spore(**Stlew.,2005**).

II.2.2. Tuniques de spores

Est une structure complexe sous-jacente à l'exosporium(**Kimet al.,2006**)composée de deux couches:tunique interne et la tunique externe(**Leggett et al.,2012**), sont composées majoritairement de protéines (50 à 80 %)(**Plomp et al.,2014**).

II.2.3. Membrane externe

Se trouve sous les tuniques de la spore ,est une structure essentielle lors de la formation de cortex est perméable, leur fonctionnalité n'est pas connue(**Setlow., 2003;Setlow., 2007**).

II.2.4.Cortex

Est composé d'une forme de peptidoglycane(**Popham.,2002**),maintient le protoplaste à l'état déshydraté qu'est un facteur principale dans la résistance des spores à la chaleur humide(**Setlow.,2006**),Le cortex est autolysé pendant la germination(**Setlow.,2003**).

II.2.5. Membrane interne

Le protoplaste est entouré de la membrane interne(**Setlow.,2007**), La faible perméabilité de cette dernière confert une résistance des spores face à des produits chimiques qui endommagent l'ADN(**Paredes-Sabja et al.,2011**).

II.2.6.Cœur

La structure centrale de la spore appelée protoplaste, est assez déshydraté renferme l'ADN, l'ARN, les ribosomes et la majorité des enzymes sporales,contient également de

dipicolinate de calcium (Ca-DPA) constitue de 15 % du poids sec de la spore est synthétisée uniquement lors de la sporulation(Setlow.,2006).

II.3. Lasporulation chez les *Bacillus cereus*

La sporulation ne commence qu'après une réplication de l'ADN a été achevée, afin d'assurer que deux chromosomes sont disponibles dans la cellule pré divisionnelle(Veeningetal.,2009).La sporulationChez les Bacilli se met en place à la fin de la phase exponentielle(Al-Hinai et al.,2015),ce processus a été déclenché d'après des signaux en réponse des changement environnementaux tels que l'augmentation de la densité cellulaire des *B. cereus* ainsi que la disponibilité des nutrimentsdans le milieu(Stragier.,2002). Le processus de sporulation se déroule en 6 stades(voir figure 02).

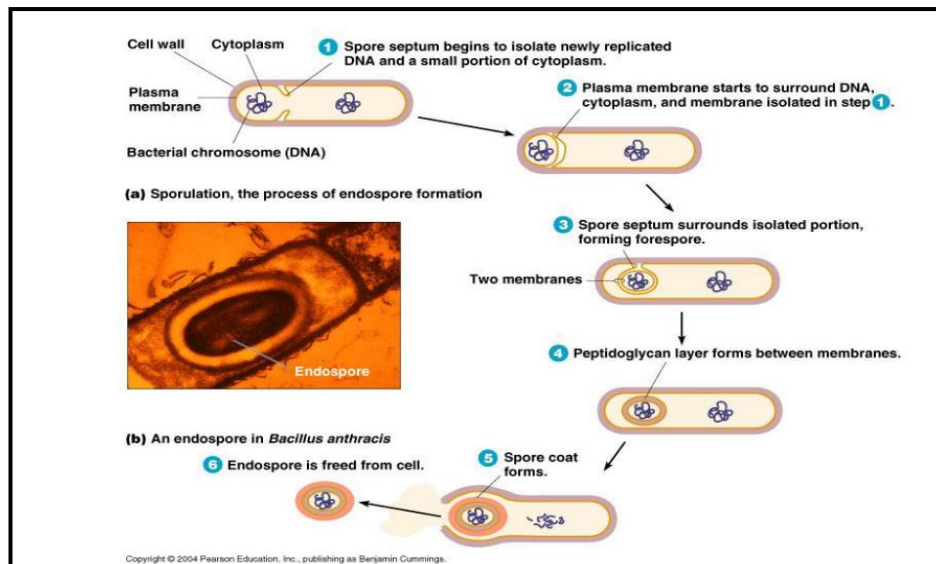


Figure 02: Les étapes de la sporulation(Qiu.,2004).

II.4. La thermorésistance des spores de *B.cereus*

La plus part des enzymes sporales sont stables à des températures 38°C au-dessus de celle de la destruction des cellules végétatives à 44°C. Chez *Bacillus cereus*, le milieu intérieur des spores protège les enzymes sporales qui confèrent aux spores une thermo résistance à des températures plus hausses par rapport à la cellule végétative dont les enzymes sont détruites à température plus basse(Warth.,1980).Cependant, la thermorésistance de *Bacillus cereus* n'est pas très élevée à celle de *Clostridium botulinum*.

II.5. L'origine de la thermorésistance des spores

Le facteur principale qui assure la résistance thermique des spores est la déshydratation du protoplaste, qu'est due à la fois par la minéralisation et l'adaptation thermique (Cazemieret al., 2001). La thermo résistance des spores est élevée dans les produits à faible activité d'eau (aw) et aussi au procédé de stérilisation à la chaleur sèche qu'à la chaleur humide (Jenson et Moir., 2003).

Le DPA ainsi que les SASP de type- α/β sont impliqués dans la résistance de la spore contre la chaleur et les traitements chimiques mais sont principalement impliqués dans la protection de l'ADN contre les radiations UV (Setlow., 2006), l'acide dipicolinique se trouve en association avec les ions calcium. Il est responsable de la stabilité des composés comme l'ADN attribuer dans la thermorésistance (Prescott et al., 2006). La déshydratation des spores au cours de maturation et la production de l'acide N-succinyl-glutamique dès les premiers stades de la sporulation sont des critères majeurs assurant la thermorésistance (Meyer et al., 2004).

II.6. Les facteurs influençant sur la thermorésistance

Divers facteurs peuvent fortement influencer la thermo-résistance des spores, les conditions de température et l'activité de l'eau, le pH du milieu pendant la sporulation, la composition du milieu pendant ou après traitement, les caractéristiques du traitement et l'espèce microbienne, seule la température était prise en compte dans le calcul des barèmes de pasteurisation et de stérilisation (Merzougui et al., 2013).

II.6.1. L'effet de la température

Les spores de *Bacillus cereus* à 48°C ont montrées une résistance beaucoup plus un traitement thermique que celles produites à 22°C (Melly et al., 2002). Cette caractéristique est corrélée à l'hydratation du cœur s'élevant à 39% dans les spores obtenues à 22°C, contre 34,25% dans celles obtenues à 48°C. Similairement, (Minh et al., 2011) ont montré une meilleure résistance à la chaleur des spores de *B. subtilis* produites à 45°C plutôt qu'à 22°C.

II.6.2. L'effet du pH

Le pH initial du milieu de sporulation peut avoir un effet positif ou négatif sur la thermorésistance (Mazas et al., 1997). Le pH est connu pour avoir une forte influence sur la résistance thermique des micro-organismes. Un pH acide (pH = 4) du milieu lors du traitement peut provoquer une résistance thermique plus faible de spores, comparé à un pH neutre. Les spores de *B. Cereus* ATCC 4342 ont montré une résistance plus faible lorsque le pH de sporulation était de 5.5, par rapport à un pH égal à 7 (Merzougui et al., 2013).

II.6.3. L'effet d'activité d'eau

L'activité de l'eau (a_w) et le pH sont des éléments essentiels dans la détermination de la thermo-résistance des microorganismes, une faible a_w lors du traitement provoquera une augmentation de la résistance à la chaleur. En revanche, une faible activité de l'eau (<0.98) du milieu de récupération a montré une inhibition de la germination et de la croissance de spores de *B. cereus* (Martinez et al.; 2007).

II.7. Paramètres de thermorésistance des spores *B. cereus*

Les spores de *B.cereus* résistantes au processus de décontamination comme l'étape de pasteurisation, d'après nombreuses études, la thermorésistance des spores est décrite par plusieurs paramètres (Luu-Thi et al., 2014).

La destruction thermique des spores en fonction de la durée de traitement à une température donnée peut être modélisée (Katzin et al., 1943). La mesure de la durée de réduction décimale est symbolisée par D, correspond au temps nécessaire (en minutes) pour réduire la population bactérienne initiale d'un facteur 10, à une température donnée (Alizée., 2016).

La cinétique de destruction des microorganismes est décrite par l'équation 01 suivante :

$$\text{Équation 01: } \log N = \log N_0 - \frac{t}{D}$$

avec t: le temps de traitement, N_0 la population initiale, N : la population survivante au temps t exprimé en nombre d'UFC ml-1 et D la durée de réduction décimale (Gaillard.,2003).

Un autre paramètre Z de thermorésistance, correspond à l'élévation de température nécessaire pour réduire au dixième la durée de réduction décimale D (Bigelow.,1921), ce paramètre est couplé de D en permettant de quantifier et modéliser la thermorésistance des souches bactériennes à des conditions de température et de durée de traitement choisies.

Ce modèle mathématique a des limites, La diminution de population microbienne au cours du temps est considérée comme log-linéaire est le plus largement utilisés, Les valeurs D et Z permettent de dresser une hiérarchie dans la résistance thermique des spores de différentes espèces. Le tableau 04 est un exemple des valeurs de D et Z rencontrées dans la littérature (Gaillard.,2003).

Tableau 04: Niveaux de thermorésistance de spores bactériennes.

Type d'aliments et microorganismes	D value (min) à :		Z value (°C)
	121°C	100°C	
Aliments peu acides (pH>4.6)			
<u>Anaérobie thermophiles</u>			
<i>Moorella thermoacetica</i>	30-38 ^a		6.5-8.6 ^a
<u>Aérobie thermophiles</u>			
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	4.0-4.5 ^b	3000 ^b	7 ^b
<u>Anaérobie mésophiles</u>			
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.1-1.5 ^b		9-13 ^b
<i>Clostridium botulinum types A et B</i>	0.1-0.2 ^b	50 ^b	10 ^b
<i>Clostridium perfringens</i>		0.3-20 ^b	10-30 ^b
<u>Aérobie mésophile</u>			
<i>Bacillus licheniformis</i>		13 ^b	6 ^b
<i>Bacillus subtilis</i>		11 ^b	7 ^b
<i>Bacillus cereus</i>		5 ^b	10 ^b
<i>Bacillus megaterium</i>		1 ^b	9 ^b
Aliments acides (pH<4.6)			
<u>Aérobie thermotolérants</u>			
<i>Bacillus coagulans</i>	0.01-0.1 ^b		
<u>Aérobie mésophiles</u>			
<i>Bacillus polymyxa</i>		0.1-0.5 ^b	

^a(André et al., 2013) ^b(Farkas, 2007)

Cependant une destruction log-linéaire en fonction du temps implique que toute la population bactérienne d'un échantillon présente la même thermorésistance; Or, dans de nombreux cas, des courbes de destruction thermique non linéaires sont rencontrées (Figure 03). Dans ce cas, les paramètres D et Z ne sont plus adaptées.

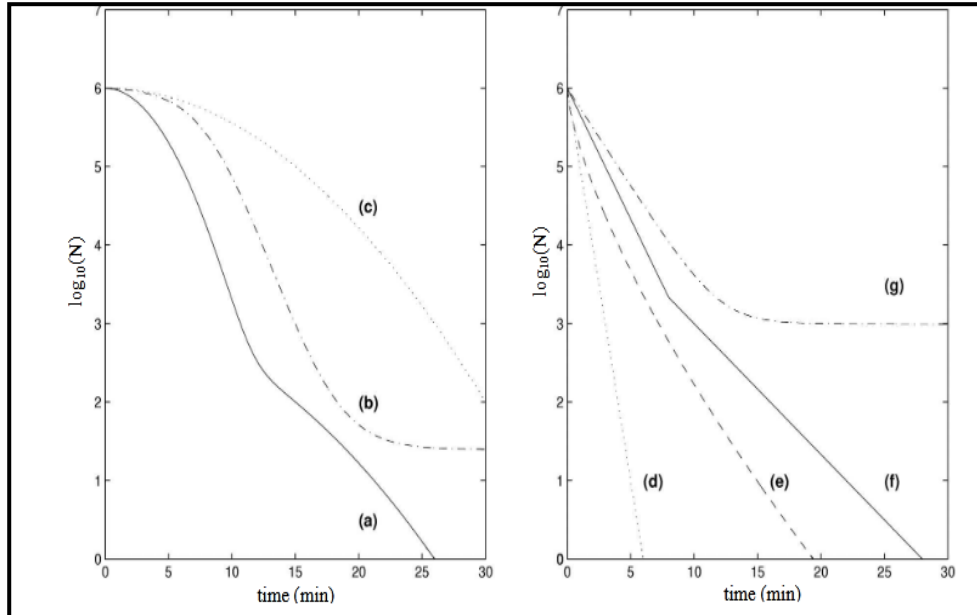


Figure 03 : Exemple de courbes de réduction obtenues lors d'un traitement thermique Les différents types de courbes d'inactivation fréquemment observées: biphasique avec diminution non linéaire (a), sigmoïdale (b), concave (c), linéaire (d), convexe (e), biphasique (f), linéaire avec effet de traîne (g) (Coroller et al., 2006).

Le modèle de Mafart prend en compte la diversité de distribution au sein de la population bactérienne, inspirée de la distribution statistique de Weibull (Mafart et al., 2002). Ce modèle simplifié peut s'adapter à des courbes concaves ou convexes, équation 02:

$$\text{Équation 02: } \log N \equiv \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p$$

Avec N la population survivante après un traitement thermique de temps t, N₀ la population initiale, δ la durée de première réduction décimale, et p un paramètre de distribution de la courbe log(N) = f(t) décrivant une courbe concave (p > 1), convexe (p < 1) ou linéaire (p = 1).

Ce modèle présente des avantages du fait de sa flexibilité pour définir des régressions non linéaires. Par ailleurs, l'influence de la température sur la résistance à la chaleur bactérienne a été quantifiée par le paramètre de sensibilité classique Z_t montré dans l'équation 03 (Bigelow., 1921) :

$$\text{Équation 03 : } \text{Log}\delta = \text{log}\delta^* - \left(\frac{T-T^*}{Z_t}\right)$$

Z_T correspond à l'élévation de la température qui permet de diviser la valeur de δ par 10 ; T : Température étudiée ; T^* : Température de référence notée 121.1°C ; δ^* : la durée de traitement thermique à la température de référence 121.1°C permettant une réduction décimale de la population microbienne.

*Partie 2: Etude
Expérimentale*

Chapitre III: *Matériel* *et méthodes*

III. Introduction

Cette étude a été effectuée durant la période Février-Mai 2021. La partie pratique a été réalisée au niveau du Laboratoire pédagogique de Microbiologie du Département de Biologie Université de Laghouat et du Centre Algérien De Contrôle De Qualité Et de l'emballage (CACQE) à GHARDAIA.

III.1. Description de la région d'étude

III.1.1. La wilaya de Laghouat

Située à 370 km au Sud d'Alger sur la route nationale N°1 en direction du grand Sud, par cette position elle constitue la porte centrale du Sahara, elle est l'une des passages obligés vers la Méditerranée et localisée dans une région de transition sur plusieurs plans, Physique, climatique et même humaine (Houyou., 2015).

III.1.2. La Wilaya de Ghardaïa

Est localisée dans la partie nord du Sahara algérien, Située à 600 km au sud d'Alger. Avec une superficie de 86 560 Km² (Ben Semaoune., 2008).

III.1.3. La Wilaya de Tlemcen

Est localisée dans la partie occidentale du Nord-Ouest algérien et dispose d'une façade maritime de 120 km, c'est une wilaya frontalière avec le Maroc, avec une superficie de 9017,69 Km². Le Chef-lieu de la wilaya est situé à 432 km à l'Ouest de la capitale d'Alger (Medjahdi et al., 2018).

III.2. Recherche des spores de *B. cereus* dans les épices et les herbes séchées

La recherche des spores de *Bacillus cereus* a été effectuée sur différents types d'épices et herbes séchées commercialisées dans la région de Laghouat, Maghnia et GHARDAIA selon les étapes suivantes :

III.2.1. Prélèvement et transport des échantillons d'épices et herbes séchées

Dans l'ensemble, 35 échantillons ont été prélevés à partir de différentes épicereries de différentes Wilayas : Laghouat, MAGHNIA et GHARDAIA au niveau du centre ville et la commune de METLILI EL DJADIDA-NOUMERAT.

Tableau 05 présente les villes dans lesquelles les prélèvements étaient effectués, le nombre d'échantillons prélevés dans chaque ville ainsi que le nombre des sites de prélèvements par ville.

Tableau 05: Nombre et répartition des échantillons par ville.

Ville	Nombres d'échantillons	Nombres de sites de prélèvement / ville
LAGHOUAT	4	1
TLEMCEN	6	1
GHARDAIA	25	2

Tableau 06 : Liste des épices utilisées de différentes Wilayas.

région épices	Laghouat	Ghardaïa	Maghnia
Paprika	×	×	×
Poivre noir	×	×	×
Gingembre		×	
Curcuma	×	×	×
Cumin	×		
Cannelle		×	
Mélange	×	×	×
Ail moulu		×	
Coriandre		×	
Carvi	×	×	
Cubèbe		×	
Safran		×	×
Origon		×	

Les échantillons se présentent sous deux formes de conditionnement : sous emballage (la plupart dans des sachets en plastique de 30g) ou en vrac; les échantillons sous emballage ont été prélevés dans leur emballage de vente tandis que les échantillons vendus en vrac ont été prélevés dans des pots stériles et pesés par l'opérateur lui-même (un pot contient 10g de l'échantillon) puis transférés directement au laboratoire pour l'analyse.



Figure 04 : Des échantillons d'épices sous emballage et en vrac.

III.2.2. Isolement et dénombrement des spores de *B. cereus sensu lato*

III.2.2.1. Milieu de culture

L'isolement a été réalisé sur le milieu Mossel complet (Annexe01) qui est un milieu d'isolement sélectif de groupe *Bacillus cereus*. Il est particulièrement utilisé pour le dénombrement de *Bacillus cereus* dans les produits alimentaires.

III.2.2.2. Préparation des échantillons et leurs dilutions

Pour les échantillons conditionnés, la surface externe du sachet a été désinfectée à l'alcool à froid puis le sachet a été ouvert en espace stérile (Bec Bunsen). À l'aide d'une cuillère stérile, une quantité de 10g de chaque épice a été pesée aseptiquement puis mélangée avec 90 ml du tryptone sel eau (TSE) (annexe02). De cette façon, les dilutions 10^{-1} ont été obtenues (c'est la solution mère). Le mélange était ensuite porté au Shaker pendant 15 min pour être homogénéisé puis au bain marie à 80°C pendant 10 min, suivi de refroidissement dans l'eau glacée à la fin du temps fixé.

Ce traitement permet d'éliminer la forme végétative présente dans les échantillons et de sélectionner les cellules bactériennes thermorésistantes ciblant les bactéries

sporulées. Ensuite, des dilutions décimales successives 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} étaient alors réalisées dans TSE à partir des mélanges traités thermiquement.

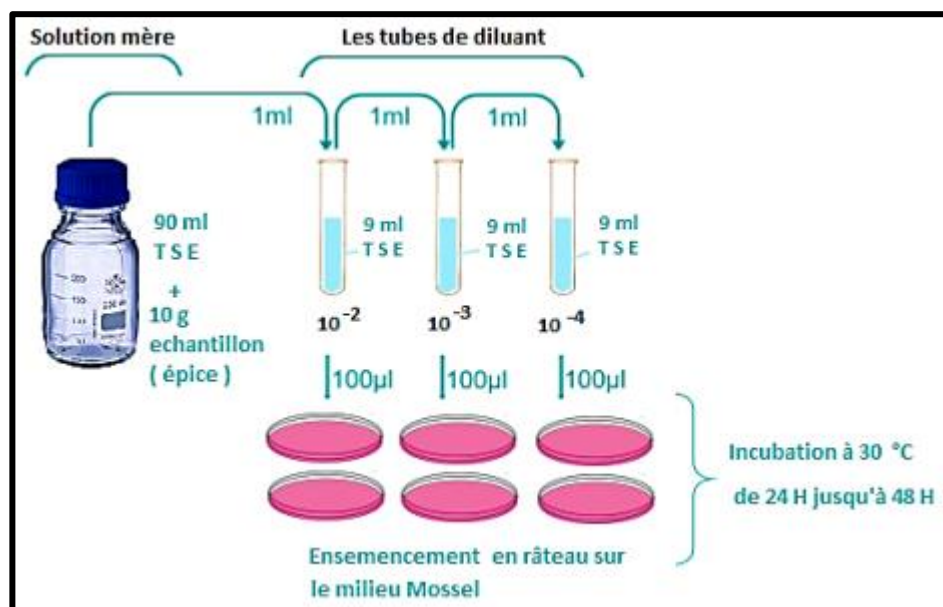


Figure 05 : La réalisation des dilutions décimales et ensemencement sur le milieu Mossel complet.

III.2.2.3. Dénombrement des *Bacillus cereus sensu lato*

Le dénombrement de *Bacillus cereus* a été effectué selon la procédure décrite par la norme **ISO 7932 (2005)**. Il consiste l'énumération des cellules présumées de *B.cereus* sur la gélose Mossel complet. Un volume de 0,1 ml de la dilution 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} était étalé à la surface d'une boîte Pétri pour chaque dilution, puis ont été incubés à 30 C° pendant 24 à 48h.

B. cereus présumatif sont des colonies dont l'aspect macroscopique correspondaux critères recommandés par **la norme ISO 7932 (2005)** d'où les colonies présumées ont :

- Un aspect rose-rougeâtre suite à l'absence de virage de couleur du milieu dû à la non dégradation du mannitol ;
- Entourées par un halo opaque dû à l'hydrolyse de lécithine de jaune d'œuf parla lécithinase produite par les cellules de *B. cereus*.

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

$$N(\text{ufc /ml ou g}) = \frac{\sum C}{V(n1+0,1n2)d}$$

Où :

C : est le nombre des colonies comptées sur une boîte retenue des dilutions effectuées ;

V : est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres ;

n1 : est le nombre des boîtes retenues à la première dilution ;

n2 : est le nombre des boîtes retenues à la seconde dilution ;

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

III.2.3. La confirmation de l'appartenance des souches au groupe *B. cereus*

L'appartenance des souches au groupe *B. cereus* a été confirmée par les tests mentionnés ci-dessous : (voir tableau 07)

Tableau07 :Les tests de confirmation.

Coloration et examen microscopique	Tests complémentaires d'orientations
Coloration au bleu de méthylène	Test de l'hémolyse
Coloration de Gram	Recherche de la catalase / type respiratoire
Coloration de vert de malachite	Test mannitol-mobilité-nitrate

III.2.4. Production et conservation des spores de *Bacillus cereus sensu lato*

III.2.4.1. Préparation de pré-cultures

D'abord, des pré-cultures de *Bacillus cereus* ont été préparées à partir des isolats dans le bouillon cœur-cerveille (BHIB) (Annexe 02) et incubées à 30°C pendant 24h.

III.2.4.2. Préparation de la suspension sporale

Pour la préparation du stock de spores, le protocole utilisé a été inspiré de celui utilisé par **Gaillard et al. (1998)**. Un volume de 0,5 ml de la pré-culture était étalé sur la surface du milieu nutritif gélosé (Annexe 02) supplémenté par 40mg/l de MnSO₄ et 100mg/l de CaCl₂ en boîtes de Pétri de 90 cm. Puis, les boîtesensemencées ont été incubées à 30°C pendant un temps nécessaire à la sporulation de la population bactérienne (5 à 7 jours) (**Ziane., 2014**).

III.2.4.3. Récupération et lavage du culot des spores de *B. cereus sensu lato*

Après la période d'incubation, la sporulation a été vérifiée par examen microscopique et les spores ont été récoltées au moins 90 % des cellules avaient produit des spores. La récolte des spores de *B. cereus sensu lato* était effectuée à l'aide d'une spatule stérile en raclant la surface de la gélose. Les spores récupérées étaient mises en suspension dans un volume de 20ml d'eau distillée stérile. La suspension des spores était

ensuite lavée par l'eau distillée à 4000g pendant 20min. le culot était récupéré et remis dans 20ml d'eau distillée stérile. Cette opération était renouvelée deux fois. Le culot récupéré après le lavage 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 4000g pendant 20min.

Les culots traités subissaient une nouvelle fois trois cycles de lavage toujours à l'eau distillée dans les mêmes conditions de la centrifugation. Toutes 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. Le stock des pores de *Bacillus cereus* obtenu était conservé à 4°C dans de l'eau distillée stérile.

III.3.Étude de la thermorésistance des sporesde *B. cereus*

Les souches utilisées ont été identifiées, confirmées et conservées (stockées) l'année dernière.

III.3.1. Préparation de la matrice alimentaire

La soupe de poisson déshydratée a été délayée dans un 1 /4 litre de l'eau distillée stérile ensuite le mélange a été versé dans 3 /4 litre d'eau distillée stérile puis remué jusqu'à nouvelle ébullition, le mélange a été couvert à moitié et laissé cuire à feu doux pendant 10 minutes en remuant de temps à autre.

La soupe préparée a été autoclavée pendant 120°C pendant 20min afin de la rendre stérile (éliminer toute forme de microorganismes) dans le but de créer un milieu naturel aux souches de *B.cereus* choisies.

III.3.2. Traitement thermique et ensemencement

L'étude de thermorésistance a été réalisée sur des souches isolées et stockées depuis l'année passée (2020) , parmi ces dernières,10 souches ont été choisies(voire tableau 08).

Tableau 08 : L'origine d'épices et leurs codes.

Souche	Code	Origine d'épice
1	MLN-S4 :G02	Mélange
2	S ₄ -CNAD4 :G4	Cannelle
3	S ₄ -Cur AD4	Curcuma
4	S ₄ PN AD4 :G4	Poivre noir
5	S ₄ -CRA AD4 :G4	Carvi
6	S ₄ -Cu AD4 :G4	Cumin
7	SO ₃ Cr-3 :G02	Coriandre
8	SO ₃ Cur-4 :G02	Curcuma
9	E ₂ PN G04 Ag2	Poivre noir
10	E ₂ CN-3 G04 Ag2	Cannelle

La thermorésistance des 10 souches a été réalisée dans des tubes à essais à 5 températures et 4 durées différentes voire tableau09.

Un volume de 100 μL de stock de spores était inoculé dans 90 ml de soupe stérile puis bien homogénéisée ensuite, 1mL a été transféré dans 20 tubes à essai contenant 9ml d'eau physiologique stérile ensuite, apportés au bain marie à différentes températures (85°C, 90°C, 95°C). Les tubes à essai étaient retirés à chaque (10 min, 15 min, 20 min, 30min). Le traitement à 100°C et 110°C a été effectué de la même manière mais dans un bain d'huile thermostaté ensuite, les tubes ont été directement lavés à l'eau froide pendant 30 secondes. Un tube t_0 de chaque souche était dénombrée sans traitement thermique. Correspondant à N_0 la population initiale.

A partir de chaque tube traité thermiquement, une série de dilutions décimales successives était réalisée dans de l'eau physiologique stérile jusqu'à 10^{-4} .

Le dénombrement des bactéries survivantes était effectué dans la gélose nutritive (annexe 02). Un volume de 0,5mL de dilution 10^{-3} et 10^{-4} étaitensemencé en masse dans le GN. L'incubation des boîtes a été effectuée à 37°C pendant 24h.

Tableau 09 : Barème du traitement thermique.

Température Durée	85°C	90°C	95°C	100°C	110C
2min					*
5min				*	*
10min	*	*	*	*	*
15min	*	*	*	*	*
20min	*	*	*	*	

30min	*	*	*		
-------	---	---	---	--	--

III.3.3. Dénombrement des cellules survivantes

La charge de *Bacillus cereus sensu lato* était calculée suivant la formule de la norme AFNOR (1995) .

III.4. Détermination des paramètres de la thermorésistance

III.4.1. La mesure de la durée de réduction décimale DT°C

La valeur DT°C a été déterminée après ajustement de modèle de Mafart, par équation suivante :

$$\text{Equation 04: } \log N \equiv \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right) p$$

Avec N la population survivante après un traitement thermique de temps t, N₀ la population initiale, δ la durée de première réduction décimale, et p un paramètre de distribution de la courbe log(N) = f(t) décrivant une courbe concave (p>1), convexe (p<1) ou linéaire (p=1)

La valeur de DT°C représente également l'inverse négatif de la pente de la partie linéaire de la courbe log N (de spores survivantes) vs le temps de traitement.

III.4.2. La mesure de valeur Zt

C'est l'élévation de température nécessaire pour réduire au dixième la valeur D, la valeur Z était estimée à l'aide de l'équation 05.

$$\text{Équation 05 : } \log \delta = \log \delta^* - \left(\frac{T-T^*}{Z}\right)$$

Zt correspond à l'élévation de la température qui permet de diviser la valeur de δ par 10 ; T : Température étudiée ; T* : Température de référence notée 121.1°C ; δ* : la durée

de traitement thermique à la température de référence 121.1°C permettant une réduction décimale de la population microbienne.

La valeur **Z** représente l'inverse ($z=1/\text{pente}$) de la pente de la droite tracée de **log DT°C** en fonction de la température du traitement.

Chapitre IV :
Résultats et Discussion

Résultats et discussion

IV.1. Résultats de la recherche des spores de *B. cereus*

Après l'incubation des boîtes pétries à 30°C pendant 24h jusqu'à 48 h, Les cellules présumptives du *B. cereus* ont une couleur Rose –rougeâtre, entouré d'un halo claire (voir figure 6et 7).



Figure 07:Les colonies de *B. cereus*
Présumptif sur le milieu MYP
(curcuma)



Figure 06 :Les colonies de *B. cereus*
Présumptif sur le milieu MYP
(mélange).

IV.1.1. La prévalence des spores de *B. cereus* sensu lato dans les épices

Au total, 35 échantillons ont été collectés et analysés pour évaluer la diffusion des spores du groupe *B.cereus* dans les épices commercialisées dans trois différentes régions. Les résultats obtenus sont représentés dans le (tableau 10)

Les résultats ont montré une prévalence de 14% des spores de *B. cereus* dans les échantillons.

Tableau 10 : La prévalence de *B. cereus* dans les épices collectées.

Epice	N°d'échantillon	Echantillon positif	Prévalence %
1: Gingembre	2	0	-
2: Paprika	4	1	25
3: Curcuma	4	1	25
4: Cumin	2	0	-
5: cannelle	2	0	-
6: Poivre noire	3	0	-
7: Mélange	4	1	25
8: Ail moulus	2	0	-
9: Coriandre	2	0	-
10: Carvi	3	0	-
11: Cubèbe	2	1	50
12: Safran	3	0	-
13 : Origon	2	1	50

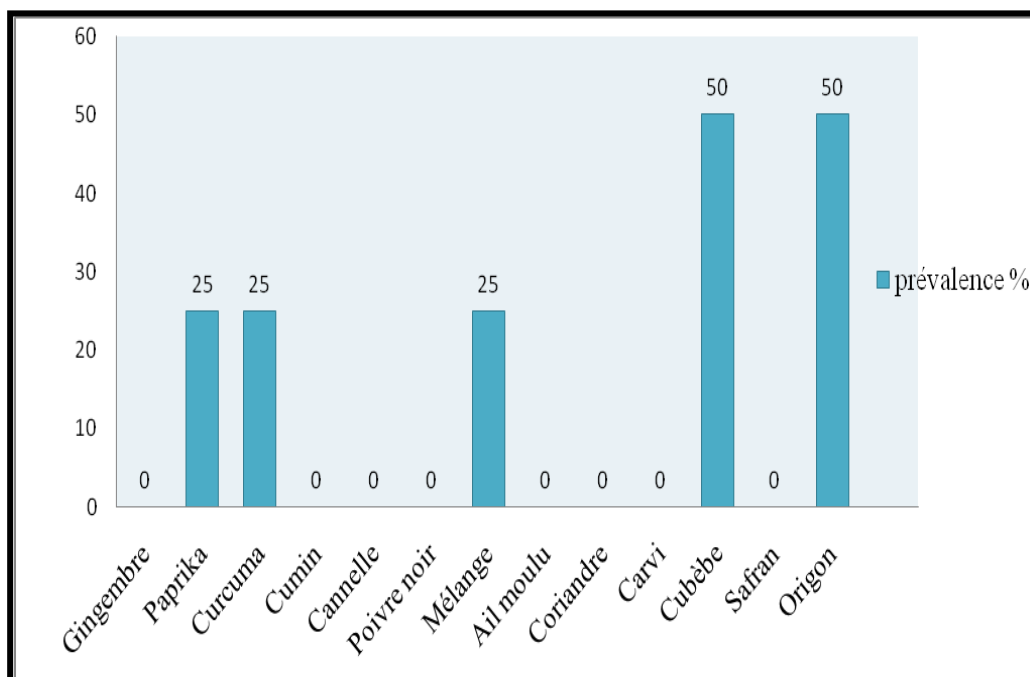


Figure 08:La prévalence de *B.cereus* dans les épices collectées.

En effet, La prévalence de contamination la plus élevée est de 50% était enregistrée pour les deux échantillons (**Cubèbe, Origon**), la prévalence la plus faible est de 25% pour les échantillons (**Paprika, Curcuma, Mélange**), et un résultat négative pour les échantillons (**Gingembre, Cumin, Cannelle, Poivre noire, Ail moulu, Coriandre, Carvi et Safran**)

En comparant les quatre régions d'étude on constate que les spores de *Bacillus cereus* ont été présentes dans les échantillons de la région de LAGHOUAT (Mkam) avec une prévalence de 75%, par rapport au deux autres régions de GHARDAIA avec un nombre de deux échantillons contaminé d'une prévalence de 8% tandis que aucun échantillon contaminé n'a été observé dans la région de MAGHNIA.

Le pourcentage obtenu (14 %) est nettement faible par rapport à celui (28%) déclaré par les travaux de **Gdoura-Ben Amoret al(2018)** et par celui reporté par **BertholdPultaet al (2019)** dans lequel le pourcentage d'échantillons contaminés atteint 63,3 %.

IV.2. Niveau de contamination

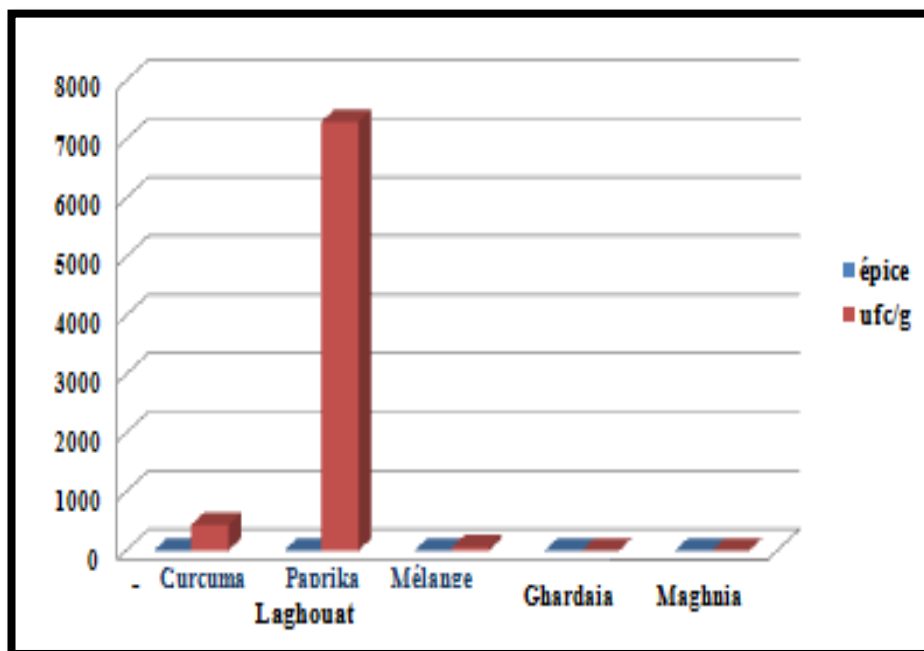


Figure 09 :Diagramme de niveau de contamination par région.

Les échantillons d'épices contaminés par les spores de *Bacillus cereus* ont présenté une charge nettement plus faible que la valeur maximale limitée par 10^4 (ufc/g).

D'après l'arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires du journal officiel de la République Algérienne N° 39 le seuil de niveau de contamination d'épices, mélange d'épices et herbes aromatiques séchées par les *Bacillus cereus* a été limité microbiologiquement par la valeur de 10^4 (ufc/g) tandis que les épices contaminées **Paprika, Curcuma et Mélange** prélevées de la région de Laghouat (Mkam) atteints $7,3 \cdot 10^2$ ufc /g ; $4,4 \cdot 10^2$ ufc /g et $5,9 \cdot 10^1$ ufc /g répétitivement qui n'ont pas dépassés le seuil.

Hariram et Labbé (2015) ont reporté des niveaux élevés ($>10^7$) en spores de *B. cereus* dans les épices, ce résultat est plus élevé que le notre.

Ces variations des résultats ont été attribuées probablement à la composition chimique des épices (facteurs antimicrobiens), d'après les travaux de **Sucheela (2007)**

la composition chimique de l'épice joue un rôle dans son activité antimicrobienne. Ainsi les lieux de vente, les pays d'origines, la saison de la récolte (une faible activité d'eau) et avec les technique de traitement des épices en plus les conditions de transformation et de stockage de ces produits influencent la concentration de *B.cereus* d'un échantillon à l'autre (KneifeletBerger.,1993).

IIV. Etude de la thermorésistance des spores de *B.cereus*

Après incubation à 37 °C pendant 24h, les cellules de *B.cereus* se représentent dans milieu GN comme suivant (voir figure 10 et 11) .

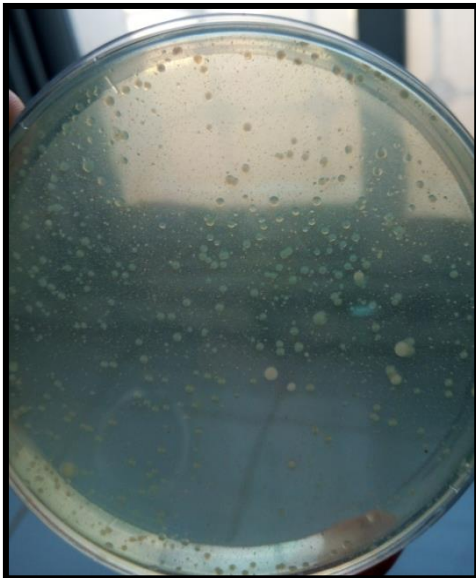


Figure 11 :Résultat au traitement thermique à 85°C sur GN (souche1).



Figure 10 :Résultat au traitement Thermique à 95°C sur GN (souche3).

La thermorésistance a été étudiée sur dix souches à différentes températures 85°C, 90°C, 95°C, 100°C, 110°C. Le traitement à 85°C et 90°C a été inefficace pour les 10 souches,4 meilleures souches ont été choisies pour les discutées prenant les températures 95°C, 100°C et 110°C. Les figures 12, 13, 14, 15 montrent les cinétiques de destructions :

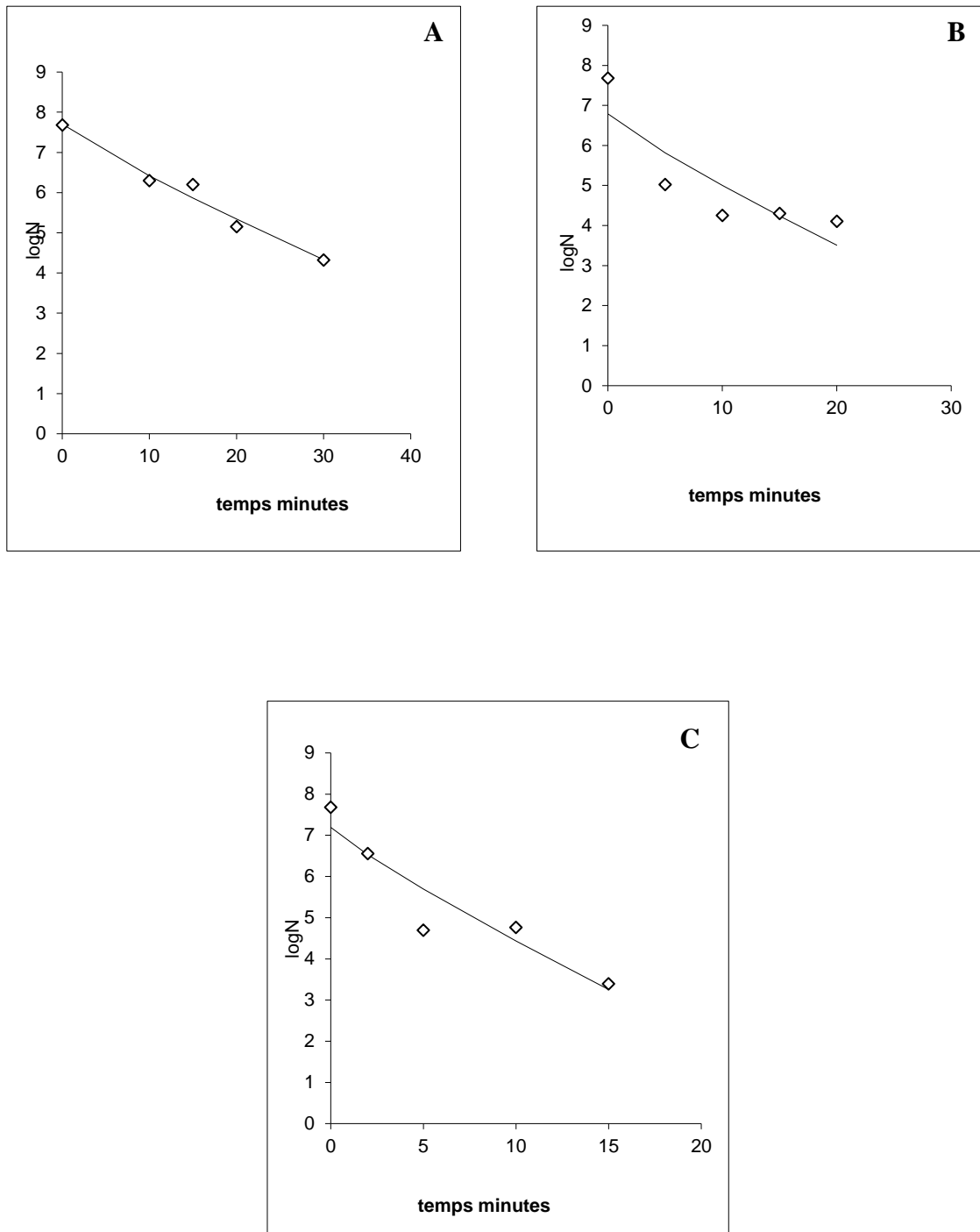


Figure 12: Cinétique de destruction de la souche 1, A(95°C), B(100°C), C(110°C).

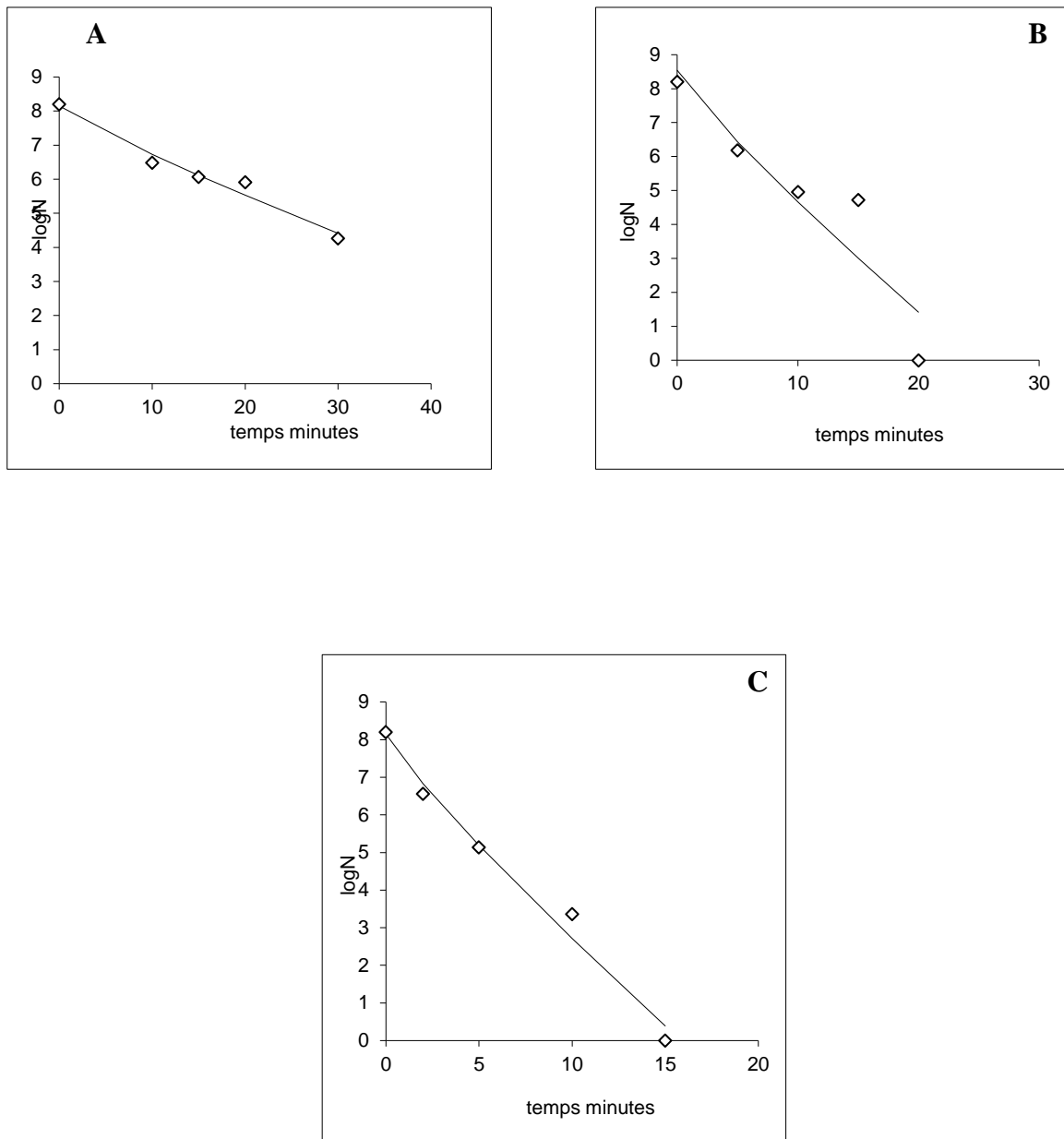


Figure 13 : Cinétique de destruction de la souche 3, A(95°C), B(100°C), C(110°C).

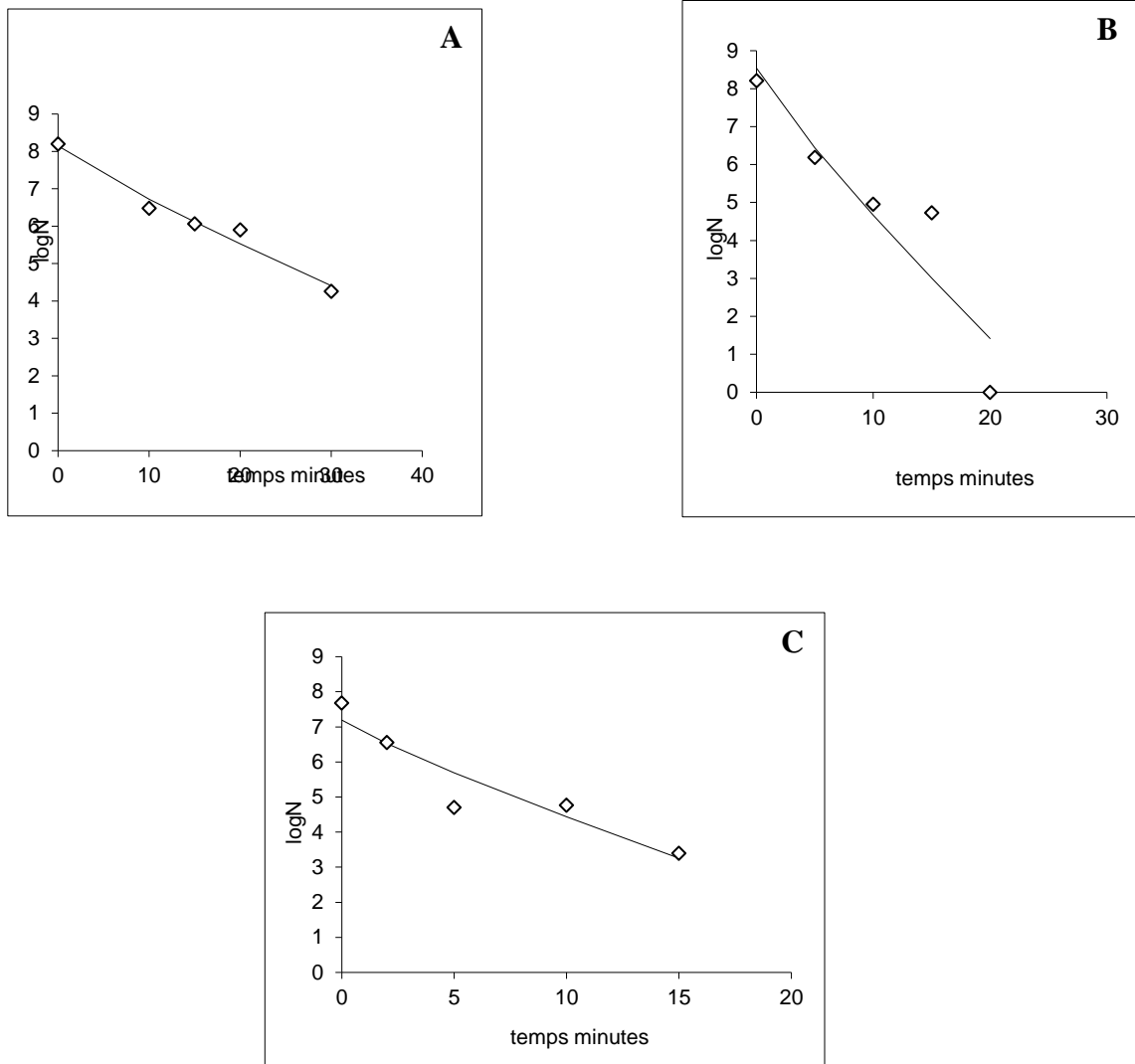


Figure 14 : Cinétique de destruction de la souche 8, A(95°C), B(100°C), C(110°C).

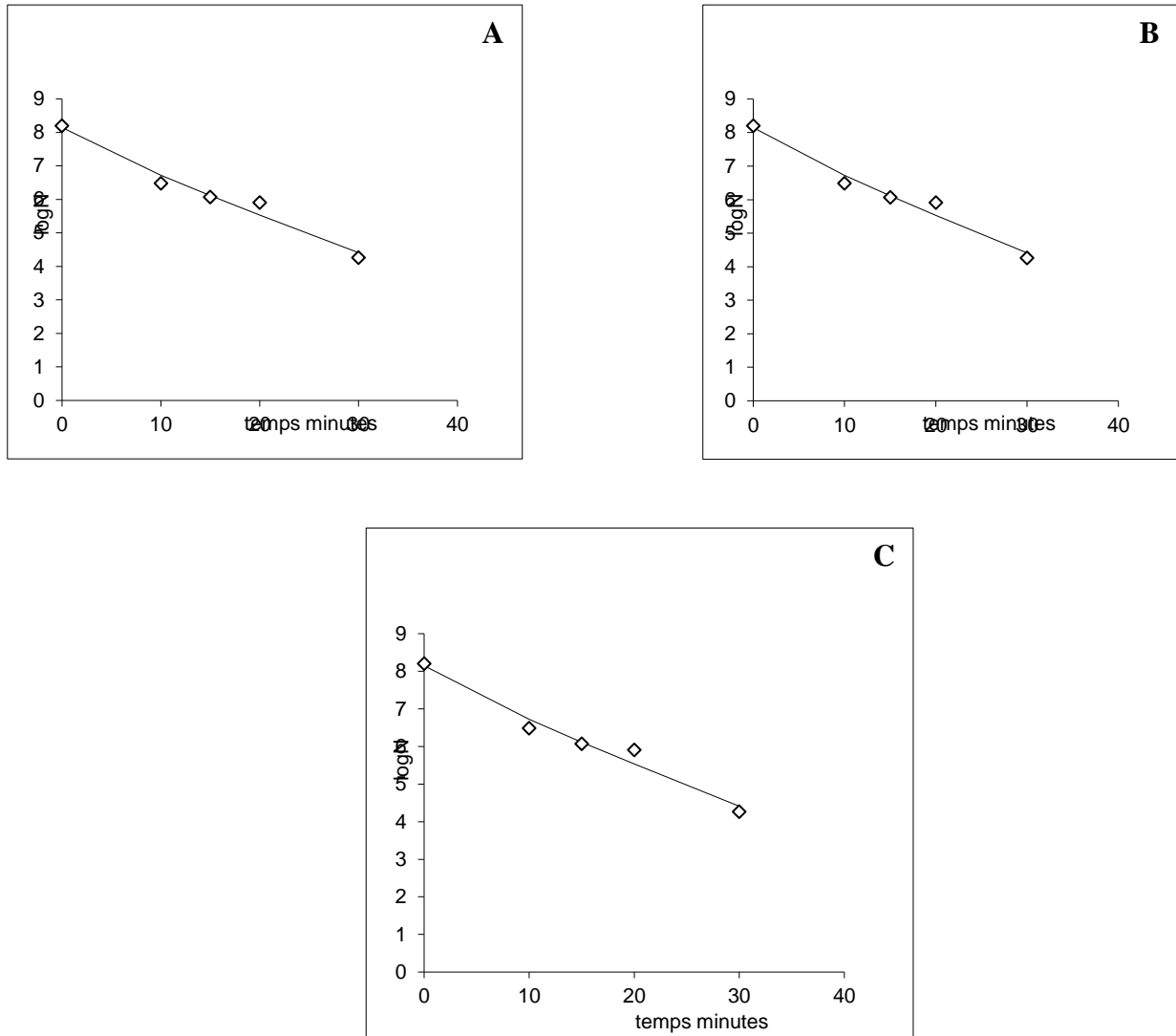


Figure15 : Cinétique de destruction de la souche 9, A(95°C), B(100°C), C(110°C).

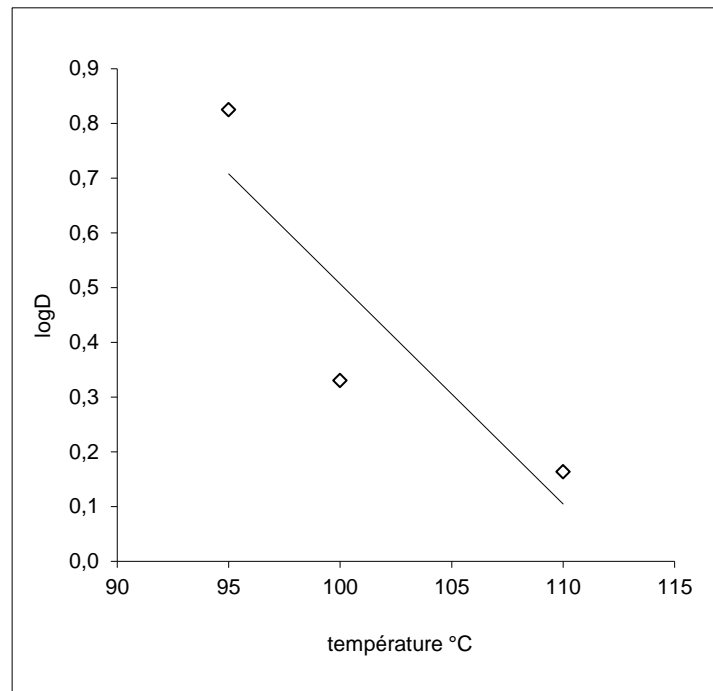
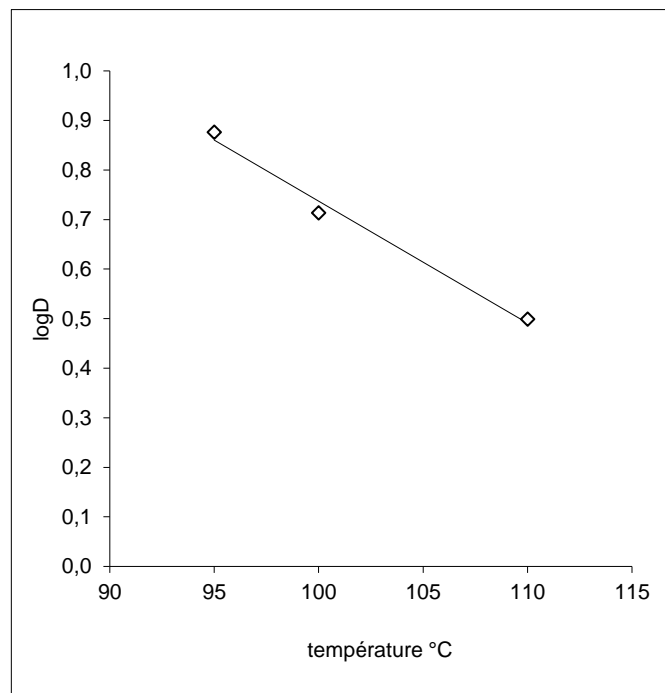
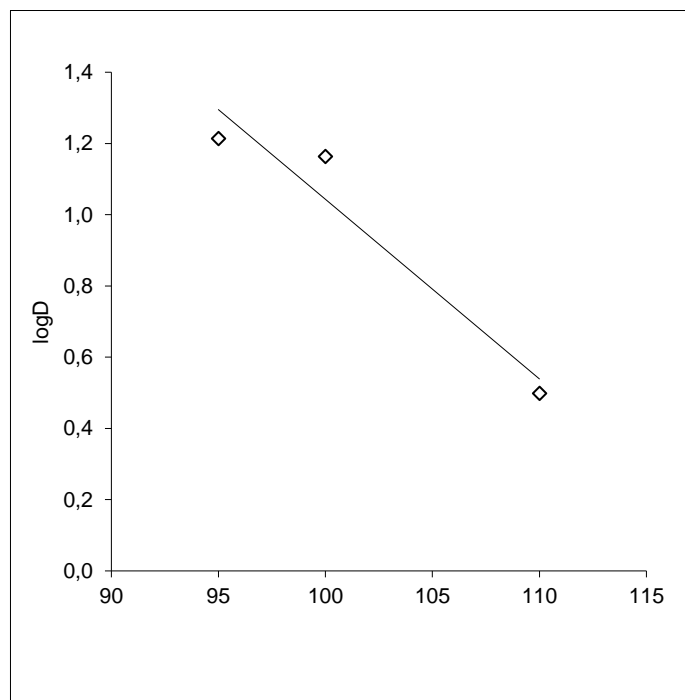


Figure
souche 1.



16 :Sensibilité de

Figure 17 : Sensibilité de la souche 3.**Figure 18 :** Sensibilité de la souche 8.

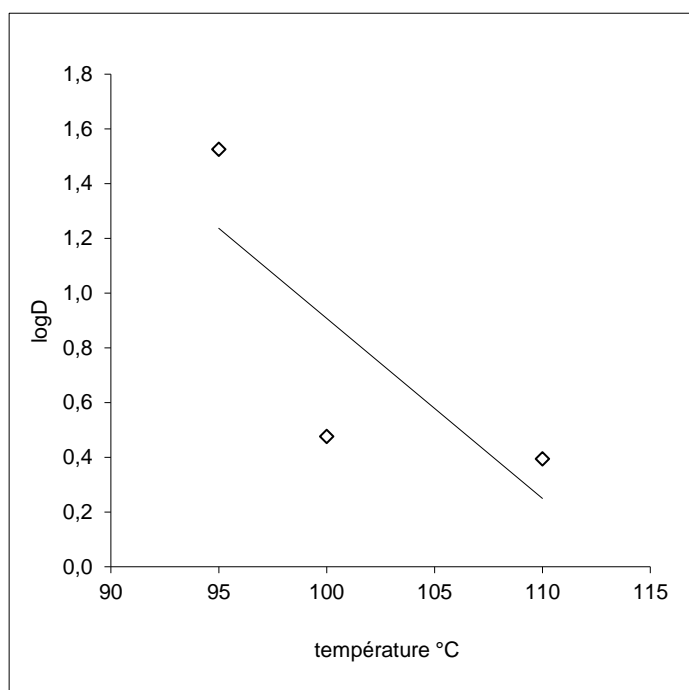


Figure 13 :Sensibilité de la souche 9.

Conclusion

Conclusion

De nos jours, l'homme préfère de consommer des aliments sains, naturels et bio contenant des substances à base de plantes et condiments. Ces derniers sont souvent contaminés par des microorganismes tels que les champignons et la flore bactérienne thermorésistante qui peut être à l'origine des intoxications alimentaires même après l'exposition à des barèmes sévères de traitement thermique.

Le groupe des *Bacillus cereus* omniprésent dans les aliments qui ont subi un traitement thermique et /ou déshydratés (faible A_w) nécessite une importance particulière.

L'objectif du présent travail était d'étudier le niveau de contamination des épices commercialisées dans trois régions différents par les spores de *B.cereus* et d'étudier leurs thermorésistance.

Les résultats ont montré que parmi 35 échantillons analysés ; 14% était contaminé avec une charge maximale de 7.3×10^2 (ufc /g), et une autre minimale de 5.9×10^1 ufc/g.

Quand à l'étude de la thermorésistance dans une matrice alimentaire qui subit généralement un traitement thermique au cours de sa préparation, La souche 9 semble être la plus résistante avec une valeur de $D_{95^\circ\text{C}} 33.5\text{min}$ Tandis que la souche 3 est la moins résistante avec une $D_{110^\circ\text{C}} 1.5\text{min}$. Ce paramètre de destruction thermique avait une certaine dépendance de l'origine des isolats.

Les souches testées dans cet étude ont une sensibilité hétérogène vis à vis la température élevée avec des valeurs de Z_t qui peuvent aller de 15 à 40°C .

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

Enfin, les résultats obtenus dans cette étude ne constitue qu'une partie de recherche scientifique sur la thermorésistance de spores de *B.cereus*, il serait aussi intéressant d'orienter les études vers la réalisation des études approfondies et complémentaires tels que l'étude de la thermorésistance à des températures plus élevées en utilisant d'autres techniques, d'étudier l'effet de pH et A_w sur la thermorésistance, réaliser une identification moléculaire et réaliser des tests de cytotoxicités. Il est aussi important de suivre cette étude par des applications *in vivo* afin d'évaluer et d'estimer le risque de contamination sur l'être humain.

*Références
bibliographiques*

- 1) **Abbas, A. A.(2014).**Effet de l'absence d'oxygène sur la capacité de sporulation et les propriétés des spores de *Bacillus cereus*.. Avignonnet des pays de Vaucluse,12-29.
- 2) **Afchain, A. L., Carlin, F., Nguyen-the, C. &albert, I.(2008).** Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurised and chilled foods. *International journal of food microbiology*, 128, 165-173.
- 3) **Al-hinai, m. A., jones, s. W. & papoutsakis, E. T.(2015).** The *Clostridium* sporulation programs: diversity and preservation of endospore differentiation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79, 19-37.
- 4) **AlizeeG.(2016).** Comportement de la bactérie pathogène *Bacillus cereus* dans des aliments prêts à l'emploi -Impact des conditions physico-chimiques. Bactériologie. Montpellier SupAgro,
- 5) **Andersson, a., ronner, u. & granum, P. E.(1995).** What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International journal of food microbiology*, 28, 145-155.
- 6) **Bazinet, A. L. (2017).** Pan-genome and phylogeny of *Bacillus cereus* sensu lato. *BMC evolutionary biology*, 17, 176.
- 7) **Berthold-pluta, a., pluta, a., garbowska, m. & stefańska, I.(2019).** Prevalence and toxicity characterization of *Bacillus cereus* in food products from Poland. *Foods*, 8, 269.
- 8) **Bigelow, W.D. (1921).** The logarithmic nature of thermal death time curves. *The Journal of Infectious Diseases* 29, 528-536
- 9) **Carlin, F. (2011).** Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology*, 28, 177-182.
- 10) **Carter, l., chase, h. R., giesecker, c. M., hasbrouck, n. R., stine, c. B., khan, a., ewing-peeples, l. J., tall, b. D. & gopinath, G. R. (2018).** Analysis of enterotoxigenic *Bacillus cereus* strains from dried foods using whole genome sequencing, multi-locus sequence analysis and toxin gene prevalence and distribution using endpoint PCR analysis. *International journal of food microbiology*, 284, 31-39.
- 11) **Coroller, L., Leguerinel, I., Mettler, E., Savy, N., Mafart, P. (2006).** General model, based on two mixed Weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 6493-6502.

12) **Didelot, x., barker, m., falush, d. & priest, F. G. (2009).** Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. *Systematic and Applied Microbiology*, 32, 81-90.

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

14) **Dromigny., É.(2009).** *Bacillus anthracis*, Lavoisier.

15) **DromignyE.(2008).** *Bacillus cereus*. Edition Lavoisier,1-233.

16) **Ehling-schulz, m., frenzel, e. & gohar, M.(2015).** Food–bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. *Frontiers in microbiology*, 6, 704.

17) **Fagerlund, a., lindbäck, t., storset, a. K., granum, p. E. & hardy, S. P.(2008).** *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology*, 154, 693-704.

18) **Faille, c., lequette, y., ronse, a., slomianny, c., garenaux, e., guerardel, Y.(2010).** Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium. Consequences on their ability to adhere to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology* 143, 125-135

19) **Fayad, n., awad, m. K. & mahillon, J.(2019).** Diversity of *Bacillus cereus* sensu lato mobilome. *BMC genomics*, 20, 436.

20) **Fogele, b., granta, r., valciņa, o. & bērzīņš, A.(2018).** Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. *Food Control*, 83, 69-74.

21) **Frankland., g. C. & frankland, P. F.(1887).** XI. Studies on some new micro-organisms obtained from air. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.(B.)*, 257-287.

22) **Gaillard, s., leguérinel, i. & mafart, P.(1998).** Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *Journal of Food Science*, 63 (5), 887-889.

23) **Gaillard S. (2003).** Modélisation de la thermorésistance, de la viabilité et du comportement à la recroissance de *Bacillus cereus*, en fonction de la température, du pH et de l'activité aqueuse., Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, France.8.12.15.

24) **Garbowska, M., Pluta, A. B., & Rozanska, L. S. (2015).** Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiology*, 49,15.

25) Glasset, B.(2016).*Approche combinatoire pour la caractérisation des souches de Bacillus cereus à l'origine d'infections chez l'Homme.* Université Paris Saclay (COMUE).

26) Gould, G.(2006). History of science–spores: lewis B Perry Memorial Lecture 2005. *Journal of applied microbiology*, 101, 507-513.

27) Guerin, A. E.(2016). *Comportement de la bactérie pathogène Bacillus cereus dans des aliments prêts à l'emploi-Impact des conditions physico-chimiques.* Montpellier SupAgro.

28) Guinebretière, m.-h., auger, s., galleron, n., contzen, m., de sarrau, b., de buyser, m.-l., lamberet, g., fagerlund, a., granum, p. E. & lereclus, D.(2013). Bacillus cytotoxicus sp. nov. is a novel thermotolerant species of the Bacillus cereus group occasionally associated with food poisoning. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63, 31-40.

29) Guinebretiere, m. & borja, V. S.(2003). Bacillus cereus sensu lato. *Bulletin-Société Française de Microbiologie*, 18, 95-103.

30) Guinebretière, m. H., thompson, f. L., sorokin, a., normand, p., dawyndt, p., ehling-schulz, m., svensson, b., sanchis, v., nguyen-the, c. & heyndrickx, M.(2008). Ecological diversification in the Bacillus cereus group. *Environmental Microbiology*, 10, 851-865.

31) Hariram, u. & labbé, R. G.(2016). Growth and inhibition by spices of growth from spores of enterotoxigenic Bacillus cereus in cooked rice. *Food Control*, 64, 60-64.

32) ICMSF.(1996). Bacillus cereus. Ch2 In: Microorganisms in food 5: Microbiological specifications of food pathogens. Blackie Academic and professional, London, p.20-35

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

34) Hertwig, C., Reineke, K., Ehlbeck, J., Knorr, D., & Schluter, O. (2015). Decontamination of whole black pepper using different cold atmospheric pressure plasma applications. *Food Control*, 55, 221-229.

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

36) Kim, H., Hahn, M., Grabowski, P., McPherson, D.C., Otte, M.M., Wang, R., Ferguson, C.C., Eichenberger, P., Driks, A. (2006). The Bacillus subtilis spore coat protein interaction network. *Molecular Microbiology* 59, 487-502

37) Kim, S.-Y., Sagong, H.-G., Choi, S. H., Ryu, S., & Kang, D.-H. (2012b). Radio-frequency heating to inactivate Salmonella Typhimurium and Escherichia coli O157:H7 on black and red pepper spice. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1e2), 171e175.

38) Leggett, m. J., mcdonnell, g., denyer, s. P., setlow, p. & maillard, J. Y. (2012). Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of applied microbiology*, 113, 485-498.

39) Lücking, g., stoeckel, m., atamer, z., hinrichs, j. & ehling-schulz, M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International journal of food microbiology*, 166, 270-279.

40) Luu-thi, h., khadka, d. B. & michiels, C. W. (2014). Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of Bacillus cereus. *International journal of food microbiology*, 189, 183-188.

41) Martinez, s., borrajo, r., franco, i., carballo, J. (2007), "Effect of environmental parameters on growth kinetics of Bacillus cereus (ATCC 7004) after mild heat treatment" *International Journal of Food Microbiology*, , 223-227.

42) Marina Stoeckel, Anja Westermann, Zeynep Atamer, Jörg Hinrichs. (2013) Thermal inactivation of Bacillus cereus spores in infant formula under shear conditions. *Dairy Science & Technology*, EDP sciences/Springer, , 93 (2), pp.163-175. [ff10.1007/s13594-012-0101-6](https://doi.org/10.1007/s13594-012-0101-6) [ffhal-01201403](https://doi.org/10.1007/978-3-642-21014-0_13)

43) Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology* 72, 107-113

44) Mazas, M., Lopez, M., Gonzalez, I., Bernardo, A., & Martin, R. (1997). Effects of sporulation pH on the heat resistance and the sporulation of Bacillus cereus. *Letters in Applied Microbiology*, 25(5), 331-334

45) Merzougui S., Lkhider M. and Cohen N. (2013). Bacillus cereus, un réel problème pour l'industrie agro alimentaire?. *ScienceLib Editions Mersenne*. 5, 130915

46) Meyer A., Deiana J. et Bernard A., (2004). Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2ème éd. Hongrie: Ed doin. 430

47) Palop, a, raso, j, pagan, r, condon, s, sala, fJ, (1999), "Influence of pH on heat resistance of spores of Bacillus coagulans in buffer and homogenized foods", *International Journal of Food Microbiology*, 46, 243-249.

48)Paredes-sabja, d., setlow, p. & sarker, M. R.(2011). Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved. *Trends in microbiology*, 19, 85-94.

49)Popham, D. L. (2002). "Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore: the inner wall of the lockbox." *Cellular and Molecular Life Sciences*59(3): 426-33.

50)Prescott L M., Harley J P., Klein D A.,(2006).Microbiologie. 2ème éd. France: Ed De Boeck. 1137 p.propriétés des spores de Bacillus cereus. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et des pays de Vaucluse, pp.12-29

51)QiuW.(2004).Lecture schedule of Microbiology in the Hunter College of the city University of New York, <http://diverge.hunter.cuny.edu/~weigang/>

52)Sastalla, I., Fattah, R., Coppage, N., Nandy, P., Crown, D., Pomerantsev, A. P., et al.(2013). The Bacillus cereushbl and nhe tripartite enterotoxin componentsassemble sequentially on the surface of target cells and are not interchangeable.plos One, 8(10), e76955. Doi:10.1371.

53)SETLOW, P. (2003). Spore germination. *Current opinion in microbiology*, 6, 550-556.

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

55)Setlow, P. (2007). I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in microbiology*, 15, 172-180.

56)Stenfors arnesen, I. P., fagerlund, a. & granum, P. E.(2008). From soil to gut: Bacillus cereus and its food poisoning toxins. *FEMS microbiology reviews*, 32, 579-606.

57)Stenfors, I. P. & granum, P. E.(2001). Psychrotolerant species from the Bacillus cereus group are not necessarily Bacillus weihenstephanensis. *FEMS microbiology letters*, 197, 223-228.

58)Stragier, P.(2001). A gene odyssey: exploring the genomes of endospore-forming bacteria. *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*, 519-525.

59)Susheela, R.(2007).Handbookof Spices, Seasonings, and Flavorings, 2nd ed, CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742,281.

60) Veening, j.-w., murray, h. & errington, J.(2009). A mechanism for cell cycle regulation of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Genes & development*, 23, 1959-1970.

61) Warth, A. (1978). Molecular structure of the bacterial spore. *Advances in microbial physiology*. Elsevier. ZEALAND, A. N. AGENTS OF FOODBORNE ILLNESS.

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

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

64) Ziane M., Le Chevalier P., Couvert O, Moussa-Boudjemaa B. & Leguerinel I.(2016). Identification and characterization of aerobic spore forming bacteria isolated from commercial camel's milk in south of Algeria. *Small Ruminant Research*. 137.59-64

Annexes

Annexe 1: Milieu de culture et diluants

1. Milieu Mossel

Mossel de base

Extrait de viande..... 1g/l

ED.....900ml

Peptone..... 10g/l

Mossel complet

Sodium chloride10g/l

Milieu Mossel de base90ml

D-mannitol10 g/l

Solution de polymixine B1ml

Rouge de phénole0.025g/l

Émulsion de jaune d'œuf10ml

Agar-agar13.5 g/l

PH du milieu : 7,2±0,2 .

Emulsion de jaune d'œuf

- Utilisation des œufs de poule fraîches avec leur coquille intacte
- Lavage des œufs avec un détergent liquide, rinçage sous l'eau courante puis plonger dans 95% (en volume) d'éthanol pendant 30 seconds
- Flamber l'œuf entre deux becs bunsen
- En utilisant des procédures aseptiques, Casser chaque œuf et séparer le jaune du blanc en transférant à plusieurs reprises le jaune d'une moitié de la coquille d'œuf à l'autre.
- Récupérer le jaune d'œuf dans un bécher et ajouter quatre parties par volume d'eau distillée stérile pour obtenir une émulsion
- Mélanger l'émulsion vigoureusement, le Porter au Bain marie fixée à 44-47 °C, puis laisser pendant 18-24 h à 5°C ± 3 °C.
- Récupérer le surnageant et ajouter stérilement 10ml dans chaque flacon contenant le milieu Mossel de base stérile en surfusion.

1. Tryptone sel (TSE) : Diluant

Tryptone.....1g
Chlorure de sodium.....8,5g

pH :7,0 ± 0,2

2. BHIB

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

3. Gélose nutritive

Extrait de viande.....15g
Extrait de levure.....2g
Peptone.....10g
Chlorure de sodium.....5g
Agar.....1.5g
Eau distillé.....1000ml

pH :6,8-7,4

4. GN enrichie

GN.....1l
Mnso4.....40mg/l
Cacl2.....100mg/l

5. Gélose au sang

Gélose nutritive.
Sang du mouton/de cheval.

6. Viande-fois

Peptone viande-foie.....30g
Glucose.....2g
Amidon soluble.....2g
Sulfite de sodium.....2,5g
Citrate ferrique ammoniacal.....0,5g
Agar-agar.....11g

pH final : $7,6 \pm 0,2$

7. Mannitol-Mobilité-Nitrate

Hydrolysate tryptique de caséine. 10 g
Nitrate de potassium.....1g
Mannitol.....7.5g
Rouge de phénol40 mg
Agar-agar.....3,5 g
Eau distillée1000 ml

pH final : $7,6 \pm 0,2$

Annexe 2 : Tests et Techniques

1. Coloration au bleu de méthylène

La Technique

On réalise un frottis sans fixation ; Le recouvrir de bleu de méthylène et on aperçoit au microscope, à un grossissement de 100x

Observation: les cellules apparaissent colorées en bleu et sa forme et mode de regroupement sont bien visibles.

2. La 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.

Matériel Nécessaire

- Une lame -du Violet de Gentiane (ou Violet Cristal)
- Du Lugol -de l'alcool (éthanol à 95%)
- De la Fuschine fraîchement préparée
- De l'eau distillée
- Microscope photonique : objectif x 40 et x100

La Technique en étapes

Partie 01: Préparer la lame

-La désinfection d'une lame d'un microscope photonique par l'alcool ou l'éthanol à 95%, le prélèvement d'une colonie à partir d'une boîte de culture jeune à l'aide d'une anse de platine et en respectant les conditions d'asepsie (Bec bunsen);

-Mettre une goutte de l'eau physiologique stérile dans la lame préparée précédemment et transférer la colonie sur la lame, étalement par mouvement circulaire au centre de la lame sans toucher les bords, le frottis est réalisé;

-La fixation de frottis par le passage rapide de la lame dans la flamme de bec bunsen, sans la chauffer trop;

-Placer la lame sur un bac de coloration tout en laissant le liquide utilisé pour la coloration s'écouler dans le bac.

Partie 02: Réaliser la coloration

-A l'aide d'une pipette, verser violet de gentiane ou le cristal violet à l'aide d'une pipette stérile, attendez de 30 à 60 secondes. Rincer la lame à l'aide d'une pissette remplie à l'eau distillée ou sous l'eau de robinet, en évitant de diriger directement le jet d'eau dans le frottis.

-Recouvrez le frottis d'iode (le plus souvent sous forme de solution de Lugol), laissez pendant une minute et rincez précautionneusement suivant la même méthode que précédemment.

-Verser un décolorant (Alcool ou un mélange d'acétone et de méthanol), tenez la lame inclinée et versez le décolorant jusqu'à ce que le filet qui s'écoule reste clair, sans coloration violette. Rincez immédiatement le décolorant resté sur la lame, suivant la technique décrite plus haut.

-Versez le recolorant (la fushine, safranine) sur le frottis, et laissez-le sur la lame au moins pendant 45 secondes puis rincez-le.

• Partie 03: Analyser la coloration

Placez la lame sous la lumière du microscope, repérez les bactéries à l'objectif x40. Déposez une goutte d'huile à immersion sur le frottis et faire la mise au point à l'objectif x100.

On peut noter que les bactéries à Gram positif apparaissent violettes, le cristal violet étant piégé au sein de leurs parois cellulaires épaisses, alors que les bactéries à Gram négatif apparaissent roses, le cristal violet étant passé à travers leurs fines parois cellulaires et le recolorant rose les ayant pénétrées.

3. La coloration de vert de malachite

Est une coloration qui permet de mettre en évidence la présence de spore au sein d'une cellule bactérienne.

La Technique

Réaliser un frottis fixé sur lame de verre, recouvrir la lame de la solution de vert de malachite à 5% et laisser pendant 10 minutes. Le laver à l'eau distillée;

Recouvrir ensuite le frottis de la fushine basique et laisser pendant 1 minute. Laver à l'eau distillée puis sécher et observer à immersion avec l'objectif x100

Les spores apparaissent vertes dans des corps bactériennes roses.

4. Le test de Catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

✚ La Technique

- déposés sur une lame une goutte d'eau oxygénée à l'aide d'une pipette pasteur
- Prélever une colonie à l'aide de l'anse
- Dissocier la colonie dans la goutte

✚ La lecture

- Bulles d'oxygène : la bactérie possède la catalase, elle est dite : **Catalase +**
- Pas de bulles: la bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite : **Catalase -**

5. Mise en évidence de la mobilité

Tel que vue précédemment dans le chapitre matériel et méthodes (IV. 2. 2. 5. 2), l'ensemencement a été réalisé dans le milieu Mannitol-Mobilité-nitrate en tubes, une régénération du milieu avant l'ensemencement est nécessaire.

La lecture

la présence de colonies autour de la pique centrale reflète la mobilité des bactéries.

6. Mise en évidence de type respiratoire

Ce test est effectué dans le milieu viande fois conditionné en tubes, il se crée un gradient de concentration d'oxygène entre la surface et le fond du tube. La technique pour ce test a été décrite précédemment dans le chapitre matériel et méthodes (IV. 2. 2. 5. 3).

La lecture

La position de la culture dans le tube indique le taux d'oxygène approprié pour les bactéries et par conséquent le type respiratoire.

Annexe 3 : Journal officiel de la République Algérienne N°39.

26 JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 39		8 Chaoual 1438 2 juillet 2017			
12- Légumes, fruits, végétaux et produits à base de végétaux					
Catégories des denrées alimentaires	Micro-organismes/ métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc/g)	
		n	c	m	M
Fruits et légumes frais	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10 ²	10 ³
Fruits et légumes prêts à l'emploi ⁽¹⁾	Germes aérobies à 30 °C	5	2	5.10 ⁶	5.10 ⁷
	Flore lactique	5	2	5.10 ⁵	5.10 ⁶
	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100	
Epices, mélange d'épices et herbes aromatiques séchées	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10 ²	10 ³
	Anaérobies sulfito-réducteurs	5	2	10 ³	10 ⁴
	Levures et moisissures	5	2	10 ⁴	10 ⁵
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Bacillus cereus</i> ⁽²⁾	5	2	10 ³	10 ⁴
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
Herbes séchées (thés, camomilles...)	Germes aérobies à 30 °C	5	2	10 ⁴	10 ⁵
	Coliformes thermotolérants	5	2	10	10 ²
	Moisissures	5	2	10 ³	10 ⁴
	Anaérobies sulfito-réducteurs	5	2	10	10 ²
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
Herbes aromatiques fraîches	Germes aérobies à 30 °C	5	2	5.10 ⁶	5.10 ⁷
	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10 ²	10 ³
	Anaérobies sulfito-réducteurs	5	2	10 ²	10 ³
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	

