

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d'Aïn-Témouchent



Institut des Sciences
Département de sciences de la nature et de la vie

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Master en sciences biologiques
Option : Microbiologie Appliquée

Présenté par :
Melle. **BENSAYEH Amina** & Mlle. **MALEK Aicha**

Thème:

Etude de la thermorésistance de *B. cereus* isolées à partir de la farine infantile

Encadrant :

Dr ZIANE Mohammed
Maitre de conférences "A" à C.U.B.B.A.T.

Soutenu Le 02 /07/2020

Devant le jury

Président : : Dr BOUAMRA M	MCA	C.U.B.B.A.T
Examineur : Dr DERRAG Z	MCB	C.U.B.B.A.T.
Encadrant : M. ZIANE Mohammed	MCA	C.U.B.B.A.T.

Année Universitaire : 2019-2020

Remerciements

Dédicace

Liste d'abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

INTRODUCTION **01**

Partie I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. 1. Généralité sur la farine infantile	02
I. 1. 2. Caractéristique d'une farine infantile	02
I. 1. 3. Différents types de farine infantile	03
I. 1. 4. Valeur nutritionnel de la farine infantile	03
I. 1. 5. Procédés et les étapes de la fabrication de la farine infantile	04
I. 1. 6. Indices de qualité de la farine infantile	09
I. 1. 6. 1. Granulométrie des farines	09
I. 1. 6. 2. Teneur en eau des farines	09
I. 1. 6. 3. Consistance	09
I. 1. 6. 4. Qualité nutritionnelle de la farine infantile	09
I. 1. 6. 5. Qualité bactériologique	10
I. 1. 7. Altération biologique de la qualité de la farine	11
I. 2. Généralité sur <i>Bacillus cereus</i>	12
I. 2. 2. Caractéristique générale de <i>Bacillus cereus</i>	12
I. 2. 3. Classification et taxonomie de <i>Bacillus cereus</i>	12
I. 2. 4. Propriétés et structure des spores de <i>Bacillus cereus</i>	13
I. 2. 5. Etapes et mécanismes de sporulation de <i>Bacillus cereus</i>	15
I. 2. 6. Etapes et mécanismes de germination de <i>Bacillus cereus</i>	16
I. 2. 7. Thermorésistance des spores de <i>Bacillus cereus</i>	16
I. 2. 8. Pouvoir pathogène de <i>Bacillus cereus</i>	17

PARTIE II EXPERIMENTALE

II. 1. MATERIELS ET METHODES	18
II. 1. 1. Origine des isolats de <i>B. cereus</i> sensu lato	18
II. 1. 2. Confirmation de la pureté des isolats	18
II. 1. 3. Préparation de la suspension sporale	18
II. 1. 4. Traitement thermique des spores	19
II. 1. 5. Dénombrement des spores suivantes	19
II. 1. 6. Détermination de paramètres de thermo-résistance de <i>B. cereus</i>	19
II. 2. RESULTATS ET DISCUSSIONS	21
CONCLUSION	25
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	26
ANNEXES	31
Résumé	

Remerciements

On remercie Dieu le tout puissant de nous avoir guidé, aidé et donné la santé et la volonté d'entamer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche en n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Dr. Mohammed ZIANE, maître de conférences classe A, au centre universitaire d'Ain Témouchent, nous le remercions pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nos remerciements vont également aux membres Dr BOUAMRA M (MCA) et Dr DERRAG Z (MCB) au centre universitaire de Ain Témouchent, de jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail surtout en ces moments très compliqués de COVID19.

Nos remerciements à tous les membres de l'équipe de laboratoire pédagogique de département SNV, l'institut de Science, au centre universitaire d'Ain Témouchent.

Nous tenons aussi à remercier tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience au long de nos études. Nos remerciements s'adressent à tous nos amis.

Nos profonds remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce travail de près ou de loin.

Merci à tous !

Dédicace

Louange à Dieu tout puissant, qui m'a permis de voir ce jour tant attendu

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail

A la mémoire de ma grande mère, décédé trop tôt,

C'est la personne la plus idéale dans ce monde, que je le dédie

Elle reste toujours vivante dans ma mémoire pour la vie.

Que dieu lui garde dans son vaste paradis.

*A mes chères parents qui font le maximum pour leur soutient et patience
durant tout ma vie.*

*A celui que j'aime beaucoup mon frère « Ismail » et mes sœurs « Naima »
et « Safia » qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années
d'études.*

A ma tout ma famille, source d'espoir et de motivation.

A mes amis, A mon cher binôme «Amina ».

*A mon encadreur Mr. ZIANE, qui m'a guidé et éclairé de leurs conseils
tout au long de ce travail.*

A tous mes chers enseignants, source de mes connaissances.

Aicha

Dédicace

*Avec l'aide de Dieu tout puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je
dédie à :*

*A mes chers parents, nulle dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer
réellement, mon profond amour, mon respect et ma reconnaissance pour tous
les sacrifices que vous avez prodigué. Rien au monde ne vaut les efforts
fournissez jour et nuit pour mon éducation, ma réussite et mon bien être.*

*A celui qui partage ma vie dans le meilleur et dans le pire, mes chères sœurs
«Fatiha» et «Amira».*

*A mon cher frère «Abd Elhafid», pour tout ton soutien et ta disponibilité en
toutes circonstances.*

A toute ma famille, et à tous ce qui ont rendu ma vie agréable.

*Qui ont été toujours présents pour moi, qui a dirigé ce travail. A mon
encadreur Mr. ZIANE qui mérite tous mon respect et tribut.*

A ma collègue dans ce travail, mon amie MALEK Aicha.

A tous mes amis et les étudiants de ma promotion.

*Sans oublier tous les enseignants qui m'ont accompagné tous le long de mon
parcours et qui m'ont appris tout ce que je sais aujourd'hui.*

Amina

Liste d'abréviations

°C : Degrée Celsius

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFNOR : Association française de normalisation

Anse : Agence nationale de sécurité sanitaire alimentaire et environnementale

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ARNt : Acide ribonucléique de transport

ATCC: American type culture collection

a_w : Activité d'eau

BHI: Brain Heart Infusion

C : Cytosine

Cytk : La cytotoxine K

DPA: L'acide dipicolinique

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

G : *Guanine*

g: Gramme

h : Heure

IFT: Institute of Food Technologists

JORAD : Journal officiel de la république Algérienne

Kcal : kilocalories

L : Litre

mg : Milligramme

min: Minute

mL: Millilitre

mm : Millimètre

Nhe : Entérotoxine non hémolytique

nm: Nanomètre

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PanC : Pantothenate

pH : Potentiel hydrogène

S : Souche

sp : Specie

Spp : Pluriel de specie

T : La température

TSE : Tryptone sel eau

UFC : Unité forment colonie

V/V : Volume à volume

Z : Sensibilité au traitement thermique

δ: Temps de la première réduction d'un facteur 10 de la population bactérienne

μl : Microlitre

μm : Micromètre

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Composition souhaitable en nutriments pour des farines infantiles destinées aux nourrissons de 6 à 2 ans en complément du lait maternel.	
02	Normes applicable aux farines infantiles selon Codex Stan 74-1981 du <i>codex alimentarius</i> et en Algérie(en nombre de germe par gramme de farine).	
03	Structure phylogénétique du groupe <i>B. cereus</i> et leur principales caractéristiques.	
04	Paramètres de thermo-résistances de <i>B. cereus</i> de la farine infantile.	

Liste des figures :

N°	Titre	Page
01	Diagramme de fabrication de la farine infantile, le diagramme est établi durant cette étude.	
02	Structure d'une spore.	
03	Observation microscopique des cellules de <i>Bacillus</i> spp après la coloration de Gram pour l'isolat S1 (100 x 10).	
04	Culture de dénombrement de spores de <i>B.cereus</i> S1 de 03 dernier diluants successifs 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3}	
05	Evolution de log N (UFC.mL ⁻¹) en fonction du temps de traitement thermique pour <i>Bacillus cereus</i> S1.	
06	Sensibilité au traitement thermique des différentes souches de <i>Bacillus cereus</i>	



INTRODUCTION

Introduction

Pendant les premiers six mois, le lait maternel seul permet de couvrir les besoins nutritionnels des nourrissons. Mais au-delà, les enfants ont besoin d'autres sources alimentaires afin que le bon développement soit assuré. Il est donc nécessaire de donner aux nourrissons des aliments complémentaires au lait maternel. Parmi ces compléments, la farine infantile occupe une place importante surtout durant la «période dite de sevrage de 6 à 24 mois sans interruption de l'allaitement (Briend, 2009).

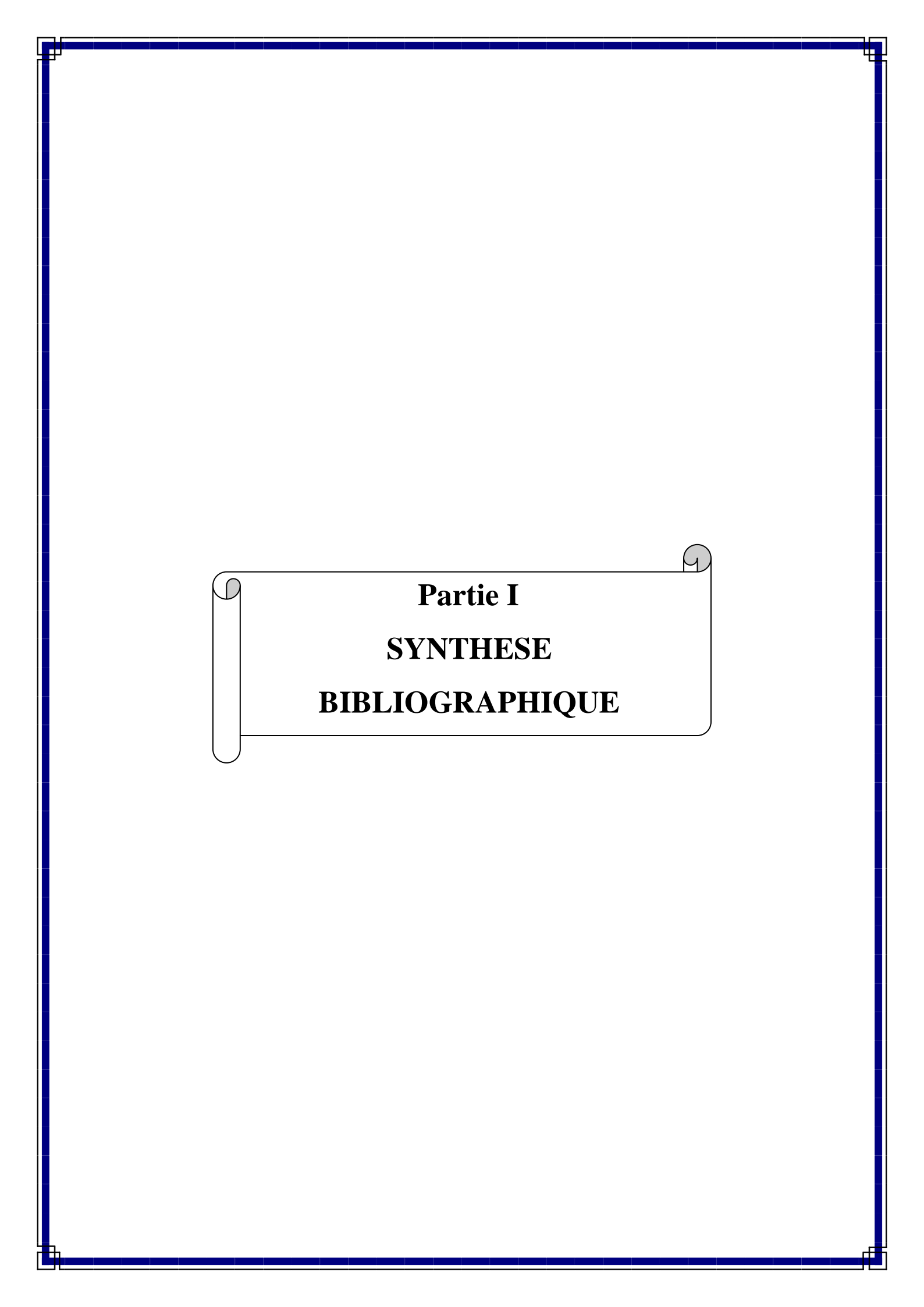
La farine infantile est un produit déshydraté à faible activité d'eau ($a_w < 0,5$) qui limite la croissance de bactéries mais ne nie pas leur présence surtout les bactéries aérobies sporulées. A partir de 2 Juillet 2017, l'Algérie a intégré la recherche de Bactéries sporulées notamment les *B. cereus* dans les critères microbiologiques (JORAD n° 39, 2017). Il est responsable de deux types de symptômes : le syndrome diarrhéique et le syndrome de type émétique (Anese, 2011). En outre, *B. cereus* est une menace pour la santé du groupe de nourrissons, et 0,61% des cas de diarrhée aiguë liés aux bactéries chez les nourrissons ont été causés par *B. cereus* au Kosovo pendant une période de 7 ans (Yunyi, 2017).

La réhydratation de la farine infantile aboutit à la germination des spores de *B. cereus* puis croître durant l'attente et/ou le stockage jusqu'à la consommation. La farine infantile est préparée dans l'eau chaude ou bien chauffé à différentes températures chez les consommateurs. Dans ce contexte, nous tenterons d'évaluer la thermorésistance de spores de *B. cereus* à différentes températures.

Bacillus cereus est présent dans toutes les catégories de produits alimentaires à savoir les céréales, les épices, les légumes, les produits carnés, les produits laitiers ainsi que dans le sol et l'environnement.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons divisé notre travail en deux parties :

- Première partie, est consacrée à la synthèse bibliographique relative aux farines infantile et leur processus de fabrication et aux groupes de *Bacillus cereus*.
- Deuxième Partie, est la partie expérimentale qui décrit le protocole de notre étude de la thermorésistance des spores de quelques souches de *Bacillus cereus* et la synthèse des résultats et discussion. La dernière partie c'est la conclusion finale et les perspectives de recherche.



Partie I
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE 1
FARINE INFANTILE

I. 1. 1. Généralité sur la farine infantile :

Dès l'âge de 4 à 6 mois le lait maternel devient qualitativement et quantitativement insuffisant pour le nourrisson dont les besoins nutritifs deviennent croissants. Il s'avère donc nécessaire d'introduire dans l'alimentation du jeune enfant, des aliments nouveaux sous forme liquide ou semi liquide pour compléter les apports du lait maternel, c'est la période de sevrage (**Zannou, 2011**) qui s'étend de 6 mois à 1 an voire 2 ans. Par ailleurs il est important de continuer l'allaitement maternel jusqu'à l'âge de deux ans ou plus pour protéger l'enfant contre la malnutrition et d'autres maladies (**Traore, 2003**).

La farine infantile est un aliment de sevrage que l'on donne sous forme de bouillie aux enfants à partir de l'âge de quatre à six mois en complément du lait maternel.

Elle doit être spécialement conçue pour couvrir leurs besoins nutritionnels en tenant compte des apports du lait maternel et de la fréquence journalière des repas (dans de nombreux contextes, les enfants reçoivent moins de trois bouillies par jour) (**Mouquet et al., 1998**).

La plus ancienne expérience de production de farines infantiles en Afrique est née en Algérie (1966) (**Treche, 1995**), qui représentant une des plus grandes capacités de production. Il s'agit de la "Supéramine", qui est une farine précuite déshydratée, enrichie en protéine, équilibrée en acides aminés essentiels et enrichie en vitamines et sels minéraux, sucre et aromatisée. Elle se compose de farines de blé dur (28 %), de pois chiche(38 %) et de lentille (19 %), de lait écrémé en poudre (10 %), de saccharose (5 %) et de 1% d'aditifs (vitamines A, D, B2, B6, PP, C, CO₂-Ca) (**Treche, 1995**).

I. 1. 2. Caractéristique d'une farine infantile :

C'est un aliment donné aux jeunes enfants en complément du lait maternel, qui répondre à certains critères pour couvrir leurs besoins nutritionnels : salubre(ne contient pas de germes pathogènes, de toxines ou de résidus chimiques toxiques susceptibles d'avoir des répercussions sur la santé du nourrisson), accessible au plus grand nombre d'enfants (prix modéré, disponible en permanence aux endroits appropriés, considérée comme facile à préparer par les mères et acceptable d'un point de vue culturel et organoleptique) et avoir une bonne valeur nutritionnelle (énergie et de nutriments indispensables pour couvrir leurs besoins nutritionnels en complément du lait maternel) (**Mouquet et al., 1998**).

I. 1. 3. Différents types de farine infantile

On peut distinguer deux types de farines infantiles selon leur mode de préparation :

- ✓ Les farines dites à cuire, qui nécessitent une cuisson plus ou moins prolongée par l'utilisateur. Elles s'obtiennent généralement par des procédés ne modifiant pas de façon importante leurs principaux constituants (torréfaction /grillage, broyage et mélange de différentes matières premières).
- ✓ Les farines instantanées que l'on prépare sous forme de bouillies par simple mélange avec de l'eau portée à ébullition. Elle fait appel à des procédés souvent plus complexes : cuisson au four (type biscuit), séchage sur rouleau, cuisson-extrusion (**Mouquet et al., 1998**).

I. 1. 4. Valeur nutritionnel de la farine infantile

La qualité des farines infantiles utilisées pendant la période de sevrage du nourrisson est d'une grande importance (**Sika et al., 2019**). Un aliment de sevrage comporte quatre types d'ingrédients (**Sanogo, 1994**) :

- ✓ un aliment de base : c'est l'ingrédient principal, de préférence une céréale comme le mil, riz, maïs, sorgho, ou bien le manioc, l'igname, la banane ;
- ✓ un complément riche en protéines : lait en poudre, haricots secs, soja, arachides, niébé...etc. ;
- ✓ un apport en énergie : matière grasse, huile ;
- ✓ un supplément en vitamines et sels minéraux apportés après la cuisson de la bouillie sous forme de jus de fruit (mangue, orange, tomate, pain de singe) (**Sanogo, 1994**).

Ainsi, la nature et les proportions des différents ingrédients incorporés peuvent varier selon les habitudes alimentaires, la disponibilité et le prix des matières premières (**Treche, 1995**).

La composition souhaitable en nutriments des farines doit être définie par rapport à leur contenu énergétique et être exprimée en gramme, milligramme ou microgramme pour 100 kcal (**Mouquet et al., 1998**). Elle dépend du niveau des besoins de l'enfant et des autres aliments ingérés (**Mouquet et al., 1998**).

La composition nutritionnelle standard pour 100 g d'aliment de sevrage se présente comme suit :

- Glucides 68%
- Protéines 13%
- Matières grasses 7%
- Fibres 5%
- Cendres 2%
- Eau 5%

Soit 400 calories. La densité énergétique de la bouillie doit être de 1 Kcal/ml (Mouquet *et al.*, 1998).

I. 1. 5. Procédés et les étapes de la fabrication de la farine infantile :

La production de farine nécessite de multiples opérations qui vont s'effectuer sur différentes matières premières (céréales, légumineuses ...) (cf. figure 1).

Le respect du procédé de fabrication et des règles d'hygiène associées doit permettre d'atteindre les seuils retenus en matière de qualité sanitaire si les matières premières utilisées sont de qualité satisfaisante. (Nutrifaso, 2007). Selon (Treche, 1995), le procès de fabrication comprend:

- ✓ l'entreposage des matières premières ;
- ✓ la transformation (triage, lavage, séchage, grillage, concassage, mouture, refroidissement) ;
- ✓ le conditionnement (pesage et emballage de la farine) ;
- ✓ le stockage du produit fini.

Sanogo, 1994 et nutifaso, 2007 à décrit les étapes comme suite :

- **L'entreposage des matières premières**

Il est important d'avoir des matières premières propres et sèches (céréales, légumineuses). Un tri avant stockage et un séchage peuvent se révéler très utiles pour éviter des pertes importantes dues aux moisissures.

- **Le nettoyage**

Un triage et un nettoyage à sec permettent d'éliminer les cailloux, les graines abîmées, les pièces métalliques et les autres corps solides présents dans les graines. Cette étape reste très souvent manuelle et nécessite une main d'œuvre importante.

Le lavage permet de débarrasser les grains des poussières ou des produits de traitement comme les insecticides qui ont pu être utilisés lors du stockage. Le lavage peut se faire dans des bassines ou des grands bacs : le fond de ces bacs est garni d'un tamis qui retient les grains.

- **Le séchage**

Le séchage des grains après lavage s'effectue sur des nattes, sur des aires de séchage en ciment ou dans des séchoirs solaires. Selon les conditions climatiques, ce séchage peut durer de 3 à 8 heures. On peut également utiliser des séchoirs électriques (en fonction de la disponibilité en énergie et de son coût).

- **Le décortilage**

Le décortilage demande une technologie spécifique pour chaque céréale ou légumineuse. L'opération de décortilage consiste à débarrasser le grain de son enveloppe (péricarpe) ainsi que d'une partie du germe. Le péricarpe est riche en fibres cellulosiques indigestes; il peut contenir des tanins amers qui peuvent entraver l'assimilation des substances nutritives. Le germe est riche en matières grasses qui provoquent le rancissement de la farine.

Le décortilage doit conserver à la farine le maximum de protéines et doit débarrasser le grain du maximum de cellulose et de matières grasses.

- **La torréfaction**

La torréfaction est une étape délicate et importante de la fabrication d'une farine. Elle consiste en un chauffage en l'absence d'eau à des températures supérieures à 100 °C. Elle permet de diminuer la teneur en eau des graines, de réduire considérablement la flore microbienne, de détruire certaines substances indésirables (facteurs antinutritionnels, lipases, etc.) et d'améliorer les caractéristiques organoleptiques (goût) du produit final.

Le refroidissement est une opération importante, car il permet d'éviter la continuation de la cuisson du produit torréfié. Il est souhaitable de l'effectuer en étalant le produit en couche fine sur un support plat et propre (bassines ou tables de refroidissement) juste après sa sortie du torréfacteur.

- **Pesage des ingrédients**

Avant mouture, les différents ingrédients (céréales, légumineuses, lait en poudre, sucre ...) de la farine infantile sont pesés séparément et mélangés avant passage au moulin.

- **La mouture**

Les farines infantiles demandent une mouture fine et sèche pour une bonne conservation. Le taux d'humidité de la farine, donc des grains, joue un rôle important dans sa durée de conservation et dans le goût du produit fini. Plus une farine n'est sèche, mieux elle se conserve. Il est donc important d'utiliser un équipement adapté au broyage des grains secs. Le taux d'humidité acceptable est de 16 %.

- **Le Conditionnement**

Il consiste à mettre la farine dans des emballages. Le matériel de base se compose d'une balance permettant de peser la farine et d'une thermosoudeuse permettant de souder les emballages. Ceux-ci doivent être hermétiquement scellés, résistants et imperméables à l'eau, à l'air et aux graisses. Aussi, l'emballage doit avoir une étiquette attrayante et informative qui renseigne le consommateur sur un certain nombre d'informations :

- le nom de l'aliment ;
- la liste des ingrédients énumérés selon leur proportion par ordre décroissant ;
- la valeur nutritionnelle du produit (énergie, protéines, lipides, minéraux et vitamines) ;
- la date limite de consommation du produit ;
- toutes conditions particulières pour l'entreposage ;
- le mode d'emploi ;
- le nom et l'adresse de l'entreprise productrice ;
- le poids net du paquet.

Les produits une fois conditionnés devront être entreposés dans les endroits les plus sombres et les plus frais car l'exposition à la lumière peut entraîner un ternissement de leur couleur et la perte éventuelle de certaines vitamines.

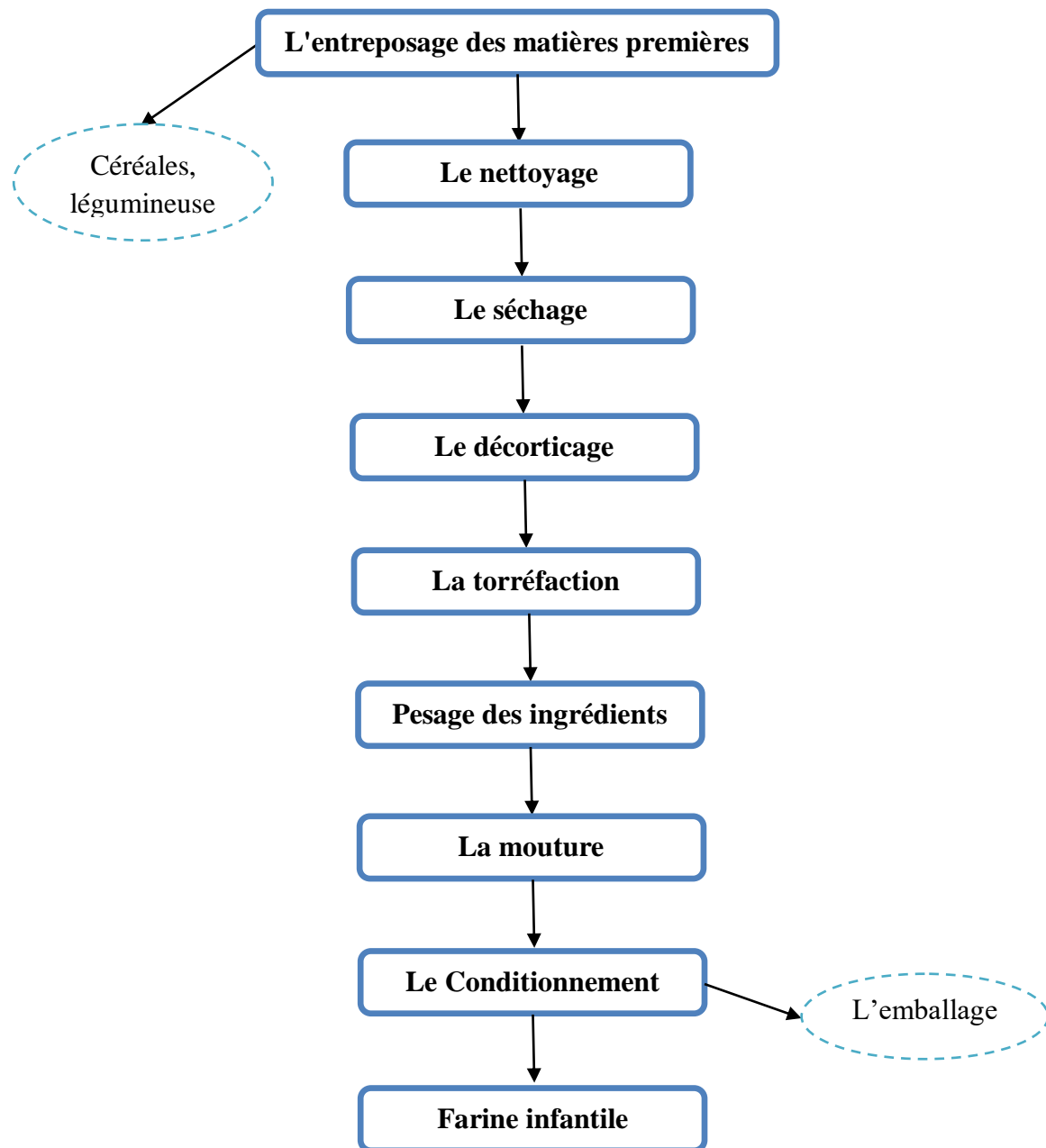


Figure1 : Diagramme de fabrication de la farine infantile, le diagramme est établi à partir de Mlle MALEK.

I. 1. 6. Indices de qualité de la farine infantile

I. 1. 6. 1. Granulométrie des farines

La farine ne doit pas contenir de particules de dimensions supérieures à 500 μm (Treche, 1995). Elle est déterminée par la méthode du tamisage qui consiste à déposer un échantillon de 50 à 200g de farine au sommet d'un empilement de 7 à 16 tamis dont la dimension des mailles va décroissant et auquel on applique un mouvement vibratoire manuel ou mécanique durant 5 à 30 min. Elle est jugée satisfaisante lorsque 97% des particules (en poids) ont un diamètre inférieur à 0,5 mm, et 100% ont un diamètre inférieur à 1 mm (Nutrifaso, 2007).

I. 1. 6. 2. Teneur en eau des farines

Elle est déterminée par la méthode de dessiccation à l'étuve à une température de 100°C d'une quantité définie de produit jusqu'à l'obtention d'un poids constant selon la norme NF V03-707 juillet 2000. Les valeurs atteintes par les farines doivent être $< 8\%$ car traduisant d'une activité de l'eau (a_w) $< 0,5$ qui est une eau fortement adsorbée par les constituants de l'aliment et ne participant pas au processus de dégradation microbologique (Nutrifaso, 2007).

I. 1. 6. 3. Consistance

Les bouillies préparées pour être données aux enfants doivent avoir des caractéristiques acceptables en termes de consistance et de densité énergétique. En effet, en plus d'être digeste pour les enfants, des apports en faibles quantités doivent apporter le plus d'énergie (au moins 100 kcal/100 g) pour couvrir leurs dépenses journalières (Nutrifaso, 2007).

I. 1. 6. 4. Qualité nutritionnelle de la farine infantile

Les recommandations les plus récentes en termes de teneurs minimales en macro- et micronutriments dans les farines infantiles destinées aux nourrissons de 6 à 24 mois en complément du lait maternel sont résumées dans le tableau 1 ci-dessous (Nutrifaso, 2007).

Tableau 1: Composition souhaitable en nutriments pour des farines infantiles destinées aux nourrissons de 6 à 2 ans en complément du lait maternel (**Mouquet *et al.*, 1998**).

Teneurs minimales ou maximales pour 100 Kcal	
Protéine et acides aminés	Minéraux
Protéines brutes.....<5.5g	Sodium.....>74mg
Histidine.....<28mg	Calcium.....>125mg
Isoleucine.....>67mg	Magnésium.....>19mg
Leucine.....>181mg	Fer.....>4mg
Lysine.....>120mg	Vitamines
Méthionine+cystine.....>66mg	Vitamines A.....5 µg
Lipides et acides gras essentiels	Vitamine D.....>2.5 µg
Lipides Acide>2.1g	Vitamine C.....>2.3mg
linoléique Acide>480mg	Thiamine.....>50 µg
linoléique.....>56mg	Acide folique.....>3 µg

I.1. 6. 5. Qualité bactériologique

Les nourrissons et les jeunes enfants sont très sensibles aux maladies d'origine alimentaire. Ils doivent donc recevoir des aliments de très bonne qualité sanitaire (**Nutrifaso, 2007**).

Les spécifications microbiologiques recommandées pour les farines infantiles à cuire et instantanées sont résumées dans le tableau 2 selon les normes international de *codex alimentarius* et national.

Tableau 2 : Normes applicable aux farines infantiles selon Codex Stan 74-1981 du *codex alimentarius* et en Algérie(en nombre de germe par gramme de farine) (**Mouquet et all., 1998**).

Germes	Farine à cuire	Farine instantanées
Bactéries aérobies mésophiles	< 10 ⁵	< 10 ⁴
Coliformes fécaux	< 100	< 20
<i>Escherichia coli</i>	< 10	< 2
Levures et moisissures	< 10 ³	Non précisé
Salmonella	Absence dans 25 g	Absence dans 25 g

I. 1. 7. Altération biologique de la qualité de la farine

Le nourrisson et le jeune enfant sont très sensibles aux maladies d'origine alimentaire à celles d'origine biologique parce qu'elles sont responsables d'une part considérable des maladies diarrhéiques. S'ils consomment des aliments contaminés, sont susceptibles de contracter des toxi-infections qui les rendront malades et entraîneront souvent leur décès (**Treche, 1995**).

Treche montre aussi qu'il y a divers germes pathogènes à l'origine des maladies diarrhéique telles qu'*Escherichia Coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Vibrio cholerae O1* et *Campylobacter jejuni*, de protozoaires comme *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium spp.*, et de virus entériques comme les rotavirus. En outre, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* et divers helminthes sont des germes couramment transmis par la nourriture et qui provoquent des maladies s'accompagnant souvent de diarrhées (**Treche, 1995**).

Les altérations biologiques sont dues aux activités métaboliques de l'écosystème constitué par les microorganismes, les arthropodes (acariens, insectes), les petits vertébrés (rongeurs, oiseaux) et les germes présents initialement au niveau du grain lui-même (**FAO, 1995**).

Quelle que soit leur origine, les grains et les produits qui en dérivent après mouture sont toujours porteurs d'un grand nombre de microorganismes, bactéries, levures et moisissures, appartenant à des genres et espèces très divers (**FAO, 1982**).

La microflore des farines dérive de celle du grain, la mouture exerce un effet sélectif. En effet, les espèces trouvent au niveau du champ, les espèces de stockage seront facilement transmises à la farine. La contamination peut se faire aussi au moulin, par des espèces qui se développent dans les résidus de farine séjournant dans les machines (**FAO, 1982**).



CHAPITRE 2

BACILLUS CEREUS SENSU LATO

I. 2. 1. Généralité sur *Bacillus cereus*

Bacillus cereus fut isolé pour la première fois par Frankland et Frankland en 1887 au Royaume Uni, à partir de l'air d'une étable. Cette souche dénommée ATCC 14579 est considérée comme la souche type de *Bacillus cereus* (dû a sa morphologie : *cereus* (lat) cierge (Ouhib, 2007).

Bacillus cereus sensu lato est une bactérie ubiquitaire formant des endospores qui adapte à des habitats très différents, des environnements thermiques froids aux chauds, couvrant des sols alpins à tempéré, et des aliments réfrigérés aux aliments déshydratés (Guinebretière, 2008). Certaines espèces de ce groupe sont pathogènes (Ruilling, 2018).

I. 2. 2. Caractéristique générale de *Bacillus cereus* :

Bacillus cereus est un bacille de 0,5µm par 1,2µm à 2,5µm par 10µm de diamètre (Drobniewski, 1993), à Gram positif, aéro-anaérobie facultative mobile à la présence de flagelles péritriches (Drobniewski, 1993) à bas pourcentage en G et C (McClure, 2002). Il forme des spores résistant aux conditions défavorables du milieu, telles que des températures élevées, la déshydratation et le rayonnement, et produit diverses toxines qui contaminent variété d'aliments (Drobniewski, 1993). Ils produisent le catalase (Drobniewski, 1993), fermentent le glucose, réduisent les nitrates, Voges Proskauer (+), et hydrolysent la Gélatine (Zwietring *et al.*, 1996).

Il peut se développer dans une large gamme de température allant de 4 ° C à 48 ° C, à des pH de 4,9 à 9,3 et supporte des concentrations en NaCl dans le milieu jusqu'à 7% (Sanchez, 2016).

I. 2. 3. Classification et taxonomie de *Bacillus cereus* :

B. cereus sensu lato est une bactérie particulièrement hétérogène qui fait partie du domaine des bactéries ou eubactéries et du phylum des *Firmicutes*, à la famille des *Bacillaceae*, ordre des *Bacillales*, classe des *Bacilli*, genre *Bacillus* (Dromigny, 2008).

Une étude phylogénétique du groupe *B. cereus sensu lato* a permis de mettre en évidence l'existence de 7 groupes phylogénétiques caractérisés par différents domaines de températures de croissance ou « thermotypes » (Guinebretière *et al.*, 2008).

Tableau 3 : Structure phylogénétique du groupe *B. cereus* et leur principales caractéristiques (Guinebretiere et al., 2010)

Phylogenetic group ^a	Species	Subgroup	Other designation	Growth temp range (°C)	No. of tested strains	% of strains carrying ^b :				
						<i>hbl</i>	<i>cytK-2</i>	<i>cytK-1</i>	<i>nhe</i>	<i>ces</i>
I	<i>B. pseudomycooides</i>	BC10	I-1	10–43	17	41	0	0	100 ^c	0
		BC13	I-2		7	86	0			
II	<i>B. cereus</i> II, <i>B. thuringiensis</i> II	BC06	II	7–40	31	61	13	0	100	0
III	<i>B. cereus</i> III, <i>B. thuringiensis</i> III, <i>B. anthracis</i> (found only in subgroup III-4)	BC12	III-1	15–45	15	67	73	0	100	0
		BC05	III-2		26	12	31			31
		BC09	III-3		14	14	57			7
		BC08	III-4		28	14	39			0
IV	<i>B. cereus</i> IV, <i>B. thuringiensis</i> IV	BC04	IV-1	10–45	34	97	79	0	100	0
		BC03	IV-2		32	97	97			
		BC07	IV-3		29	86	79			
V	<i>B. cereus</i> V, <i>B. thuringiensis</i> V	BC11	V	8–40	17	88	6	0	100	0
VI	<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycooides</i> , <i>B. thuringiensis</i> VI	BC01	VI-1	5–37	93	83	0	0	100	0
		BC02	VI-2		43	60	0		100	
VII	<i>B. cytotoxicus</i>	BC14	VII	20–50	5	0	0	100	100	0

^a The phylogenetic groups to which they belong in the *B. cereus* group (previously defined in reference 10).

^b Distribution of the known food poisoning toxin genes among these groups (data from this study). Results shown in boldface indicate important results that are in contrast with those of other groups.

^c In group I, 9 strains (rather than 24 strains) were tested for *nhe* genes.

I. 2. 4. Propriétés et structure des spores de *Bacillus cereus* :

Les endospores de *B. cereus* sont de grande préoccupation pour l'industrie alimentaire, car ils possèdent une résistance remarquable, ce qui leur permet de survivre (De Vries et al., 2006). La structure et la composition chimique de la spore jouent rôles majeurs dans la résistance des spores (Setlow, 2006) grâce à la structure très différente de celle d'une cellule végétative, avec un certain nombre de caractéristiques et de constituants unique aux spores (cf. Figure 2).

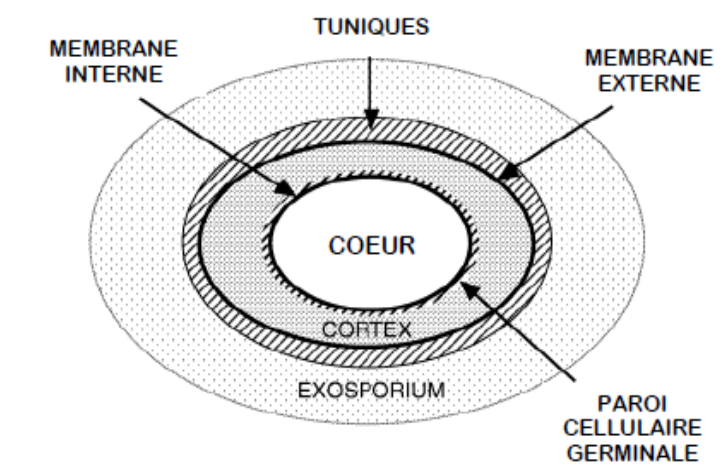


Figure 2: Structure d'une spore (Setlow, 2006).

a) *Exosporium*

C'est une grande structure composé de protéines et glycoprotéines (Setlow, 2006) possède une épaisseur de 25-40 nm (Henriques *et al.*, 2007). Les rôles de l'exosporium sont multiples. Il fournit une résistance à des traitements chimiques et enzymatiques. De plus, il améliore les propriétés d'adhésion des spores aux différentes surfaces comme, il joue un rôle dans la germination (Faille *et al.*, 2007).

a) *Les tuniques*

Elles sont largement composées de protéines avec des quantités mineures de glucides et de lipides (Leggett *et al.*, 2012). Elles confèrent à la spore une résistance contre les enzymes qui peuvent dégrader le cortex et autres substances sporocides comme le peroxyde d'hydrogène (Leggett *et al.*, 2012).

b) *La membrane externe*

Cette membrane est une structure essentielle dans la formation de la spore, la suppression de cette membrane chez des spores n'affecterait pas leurs résistances à la chaleur, aux radiations et à certains agents chimiques (Setlow, 2006).

c) *Le cortex*

C'est une couche épaisse d'aspect monomorphe, qui représente 10 à 20 % de la spore. Il est composé de peptidoglycane, durant la germination, le peptidoglycane du cortex est rapidement dégradé par les enzymes lytiques, présentes dans la spore en dormance (Setlow, 2006).

Le cortex a une importance cruciale dans la maintenance et la déshydratation du cœur de la spore et également un rôle dans la résistance et la dormance (Setlow, 2006).

d) *La membrane interne*

C'est une membrane phospholipidique qui deviendra la membrane plasmique de la cellule végétative après sa germination (Leggett *et al.*, 2012). Elle consiste également une forte barrière de perméabilité qui joue un rôle majeur dans la résistance des spores à des nombreux produits chimiques, en particulier ceux qui traversent cette membrane pour endommager ADN de spores (Setlow, 2006).

e) *Le cœur*

Se trouve au centre de la spore .Il contient les enzymes de la spore ainsi que l'ADN, les ribosomes et les ARNt (Setlow, 2006). Il a une faible teneur en eau qui est le principal facteur de la dormance enzymatique de la spore et est le facteur le plus important déterminant la résistance de la spore à la chaleur humide (Setlow, 2006).

I. 2. 5. Etapes et mécanismes de sporulation de *Bacillus cereus*

Les spores des espèces de Bacille sont formées dans le processus de sporulation et elles sont à la fois métaboliquement dormant et beaucoup plus résistantes que les cellules de plus en plus à une variété de facteurs de stress environnementaux (Setlow, 2003).

Le phénomène déclenché par l'épuisement de la ressource nutritive dans un contexte physicochimique qui peut être varié d'une espèce à autre. En général, une limitation en source de carbone, d'azote ou plus rarement de phosphore peut induire une entrée en sporulation (Abbas, 2014). Alors la sporulation est le processus qui conduira à la formation de cette forme cellulaire de résistance qui s'appuie sur une morphologie unique et remarquable (Abbas, 2014). Sur la base des observations en microscope électronique, le processus de la sporulation peut être divisé en six étapes :

Étape 1

Le matériel nucléaire apparaît sous la forme de filament disposé axialement. Le développement d'un mésosome sporale se produit alors, qui deviendra plus tard associé à la partie du filament axial qui sera enfermée par le septum de la spore (Setlow, 2003).

Étape 2

La formation du septum de la spore est la conséquence d'un repliement de la membrane cytoplasmique (Dromigny, 2008).

Étape 3

La sporulation est caractérisée par le mouvement simultané des secteurs vésiculaires vers le pôle de la cellule et la progression du septum de la spore dans la même direction. Les résultats de ce processus sont la formation d'une double membrane de « préspore » qui enferme complètement l'ADN de la spore (Setlow, 2003).

Étape 4

Elle est caractérisée par l'appariement de matériel cortical entre les composants opposés de la membrane de la « préspore », l'exosporium apparaît dans cette étape. Tardivement, on assiste au développement du cortex, manifeste par une couche dense aux électrons, et au développement d'une couche corticale moins dense (Moir, 2006).

Étape 5

Elle est caractérisée par le fait qu'aucun matériel nucléaire n'est visible dans le nouveau de la spore, mais des agrégats ribosomiaux peuvent être observés. La membrane interne du septum initial de la spore est maintenant la membrane limitatrice du noyau de la spore (Setlow, 2003).

Étape 6

Elle correspond à une spore définitive, toujours emballée dans le sporange. Ensuite, la lyse sporangiale, avec libération d'une spore libre, est un processus lent (Dromigny, 2008).

I. 2. 6. Etapes et mécanismes de germination de *Bacillus cereus*

La germination est un processus essentiellement biophysique aboutissant à la perte des propriétés spécifiques des spores telles que leur structure unique, leur extrême résistance et leur dormance. Elle se produit sans nécessité de synthèse de nouvelles macromolécules car l'appareil de germination est déjà présent dans la spore mature en dormance (Moir, 2006). La germination peut être divisée en deux grandes étapes :

- la première est appelée le déclenchement, elle est détectée dès les premières minutes après l'addition du germinant et consiste en la perte des résistances de la spore, la libération du DPA, la perte des cations ainsi que l'hydratation partielle du cœur de la spore (Setlow, 2003).
- la seconde étape correspond à l'hydrolyse du cortex, à l'hydratation complète du cœur de la spore, et une nouvelle perte de résistance à la chaleur, puis excroissance. Un certain nombre de méthodes ont été utilisées pour surveiller la germination des spores bactériennes, y compris, mesures de densité optique, libération de DPA et imagerie de cellules vivantes (Setlow, 2017).

I. 2. 7. Thermorésistance des spores de *Bacillus cereus* :

La résistance à la chaleur des spores a été attribuée à son architecture unique et sa composition. En particulier, la déshydratation relative du noyau de spores en raison de sa haute teneur et de l'acide dipicolinique (DPA) qui a été identifié comme étant le facteur le plus important de résistance à la chaleur (Moir *et al.*, 2002; Margosch *et al.*, 2004).

La thermorésistance est décrite par la mesure de la valeur D appelé le temps de la réduction décimale, ou temps (en général exprimé en minutes) nécessaire à une température donnée pour réduire la concentration du germe au $1/10^e$ de sa valeur initiale. La valeur Z est

l'élévation (ou l'abaissement) de température qui permet de réduire (ou multiplier) D au $1/10^{\circ}$ de sa valeur initiale ou par 10) (**Dromigny, 2008**).

Les conditions environnementales lors de la production des spores de *B. cereus*, peuvent également influencer leur thermo-résistance. Par exemple des spores produites à basse température sont moins résistantes que des spores produites à 30 °C (Planchon *et al.*, 2011), tandis que les spores produites en anaérobioses sont plus résistantes (**Abbas, 2014**).

I. 2. 8. Pouvoir pathogène de *Bacillus cereus*

Bacillus cereus consiste comme un pathogène d'origine alimentaire attribué comme agent causal de nombreux cas d'intoxication alimentaire (**Ziane et al., 2019**). En plus, elle peut provoquer des infections systémiques et locales, y compris bactériémie fulminante, méningite, abcès cérébral, endophtalmie, pneumonie et gangrène gazeuse (infections cutanées) (**Siele, 2011**).

Bacillus cereus a la capacité de produire différents toxines qui affectent la santé humaine lorsqu'elles sont consommées un aliment contaminé par le micro-organisme à des doses de 10^5 à 10^8 cellules par gramme d'aliment (**Sanchez, 2016**). Ils sont impliqués dans deux syndromes (**Augusto, 2018**).

➤ **Le syndrome diarrhéique :**

La production d'entérotoxines diarrhéiques a lieu en phase stationnaire de croissance généralement avec une population par gramme d'aliment comprise entre 10^7 et 10^8 (**AKaKi, 2008**). Elle se produit au cours de la multiplication des bactéries sur les intestins. Au moins trois toxines sont impliquées en cas de syndrome diarrhéique: hémolysine BL (HBL), non entérotoxine hémolytique (Nhe) et cytotoxine k (CytK) (Sanchez, 2016). Chez quelques patients, surtout les adolescents ou jeune adultes, peuvent ressentir une douleur abdominale. Par ailleurs, on observe des formes longues, avec 2 à 10 jours de diarrhée (**Dromigny, 2008**). Le syndrome diarrhéique est caractérisé par la survenue de diarrhée, de crampes et de vomissements, qui commence après 6 à 15 heures après la consommation de nourriture (**Dromigny, 2008**).

➤ **Le syndrome émétique :** causé par la toxine céréulide préformée dans les aliments (**Heini, 2018**). produite dans des conditions aérobies ou microaérophile (**Sanchez, 2016**).

Le syndrome émétique est caractérisé par des symptômes de vomissements et attribué à la consommation d'aliments contaminés par la toxine dodécadepsipeptide cereulide sécrétée par les souches de *B. cereus* émétique (Yunyi, 2017).



PARTIE II
EXPERIMENTALE



II. 1. MATERIELS ET METHODES

Cette partie a été réalisée au laboratoire pédagogique de microbiologie du centre universitaire d'Ain Témouchent.

II. 1. 1. Origine des isolats de *B. cereus sensu lato*

Les isolats ont été obtenus de laboratoires de l'université de Bechar. Les isolats étaient isolés à partir de la farine infantile vendue dans la ville de Béchar.

II. 1. 2. Confirmation de la pureté des isolats

Pour confirmer la pureté des souches isolées, nous sommes basées sur l'observation macroscopique de l'aspect des colonies puis par observation microscopique des cellules après coloration du Gram et la recherche de catalase.

II. 1. 3. Préparation de la suspension sporale

La préparation des suspensions de spores de *B. cereus sensu lato* a été réalisée suivant la procédure de **Ziane et al. (2014)**. Tout d'abord, une pré-culture de 24 h à 37°C était préparée à partir de bouillon cœur-cerveau (BHI) (Annexe1) pour 12 isolats de *B. cereus sensu lato*. Ensuite, un volume de 0,5 mL de la pré-culture était étalé sur la surface du milieu nutritif gélosé en boîtes de Pétri et supplémenté par 40mg/L de MnSO₄ et 100mg/L de CaCl₂. Puis, les boîtes ensemencées étaient incubées à 30°C pendant 5 jours, une période indispensable pour la sporulation de la population bactérienne. Après incubation, la surface des boîtes était raclée à l'aide d'une spatule stérile pour récolter les spores de *B. cereus sp.* Les spores récupérées étaient mises en suspension dans de l'eau distillée stérile. La suspension des spores était lavée trois fois à l'eau distillée stérile et centrifugée à 5000 g pendant 15 min. Le culot récupéré après le lavage était repris par un mélange eau/éthanol (v /v) puis placé à 4° C pendant 12h afin d'éliminer les formes végétatives. Le mélange était centrifugé à 5000g pendant 15min. Puis, le culot final était récupéré dans un volume minimum d'eau distillée stérile de façon à avoir une forte concentration en spores environ 8 log. La concentration des spores était estimée par dénombrement sur milieu nutritif gélosé et maintenue à 4°C pendant deux mois avant traitement thermique (**Ziane et al., 2014**).

II. 1. 4. Traitement thermique des spores

Le traitement des spores était effectué dans des tubes à essais, à partir du stock de spores de *B.cereus* conservé à 4°C. Un volume de 10 µl était réparti dans des tubes à essais puis apportés au bain marie à différentes températures (90°C, 95°C et 98°C).

Après le traitement thermique, ils étaient retirés à des intervalles de temps puis refroidis instantanément dans un bain d'eau glacée pendant 30 secondes.

Le contenu de tubes a été additionné à 9 mL de l'eau distillée stérile. Ensuite, des dilutions décimales successives étaient réalisées dans le même diluant. L'eau distillée a été utilisé a cause de non disponibilité de TSE et/ou de l'eau physiologique.

Enfin, 0,5 mL de 3 dernières dilutions étaientensemencées en masse sur milieu nutritive gélosé puis incubé à 37°C pendant 24 heures.

II. 1. 5. Dénombrement des spores suivantes

Le dénombrement était effectué sur compteur de colonies suivant la formule la formule de la norme AFNOR, (1995) :

$$N = \frac{\sum C}{V (n_1 + 0,1n_2) d}$$

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.

Les résultats du dénombrement sont exprimés en UFC par mL.

II. 1. 6. Détermination de paramètres de thermo-résistance de *B.cereus*

Dans cette étude, le modèle de Weibull non linéaire adapté par **Mafart et al. (2002)** a été utilisé. Les paramètres estimés de ce modèle (équation 1) ont été utilisées pour quantifier la thermorésistance des souches :

$$\log N = \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \dots\dots\dots \text{Eq 1}$$

N_0 représente le nombre initial de cellules, N le nombre de cellules au temps t , δ le paramètre d'échelle représente le premier temps nécessaire à détruire 90 % de la population initiale, p paramètre de forme renseigne sur la courbure de la cinétique. Si $p > 1$: la courbe est concave, si $p < 1$: la courbe est convexe et si $p = 1$ la courbe est linéaire.

Cette équation a été approuvée par l'Institute of Food Technology »(IFT) au deuxième sommet sur la recherche en Janvier 2003 (**Heldman & Newsome, 2003**).

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 2 (**Bigelow, 1921**) :

$$\log \delta = \log \delta^* - \left(\frac{T - T^*}{z_T} \right) \dots\dots\dots \text{Eq 2}$$

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.



II. 2. RESULTATS ET DISCISSIONS

II. 2. Résultats et discussions

Après vérification de la pureté des isolats recueillis (Figure 3), la thermo résistance de 12 souches de *B. cereus* a été étudiée à différentes températures de 90, 95 et 98°C. Les cinétiques ont été tracées par dénombrement (UFC) de spores survivantes (cf. figure 4) à différents temps de traitement versus le temps (minutes).

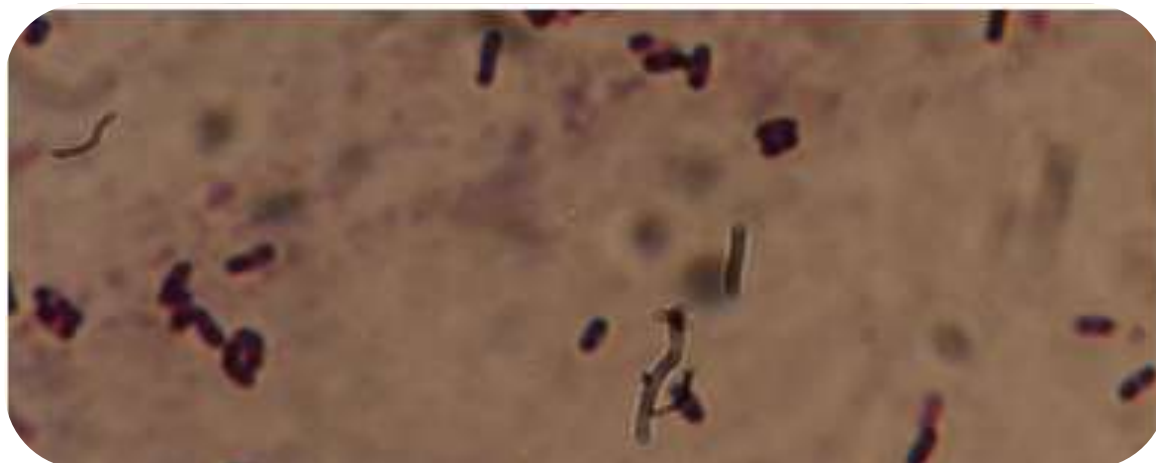


Figure 3: Observation microscopique des cellules de *Bacillus* spp après la coloration de Gram pour l'isolat S1 (100 x 10) (Original).



Figure 4: Culture de dénombrement de spores de *B.cereus* S1 de 03 dernier diluants successifs 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} (Original).

Les cinétiques de destruction ont été ajustées par la régression non linéaire à l'aide de l'équation 1. Les cinétiques sont illustrées sur la figure 5 et l'annexe 4. Ils sont tous convexe ($P > 1$) caractérisée par une chute rapide de la population de spores plus sensible au traitement suivi par un trainé d'une autre population plus thermorésistante. Le coefficient de détermination R^2 est bonne comprise entre 0,998 et 0,999.

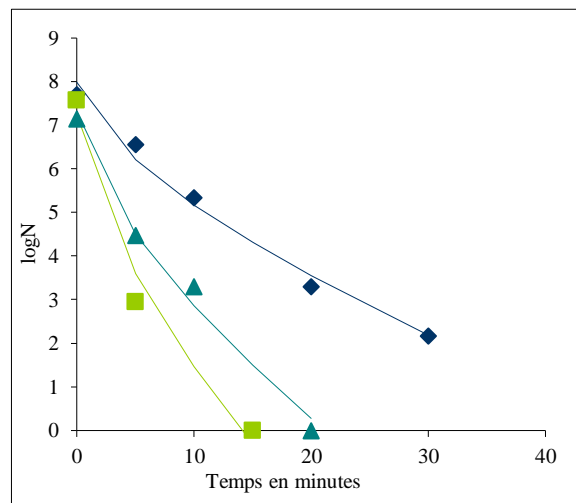


Figure 5: Evolution de log N (UFC.mL⁻¹) en fonction du temps de traitement thermique pour *Bacillus cereus* S1.

Ces cinétiques sont semblables à celles obtenus par **Ziane et al. (2014)** ; **Ziane et al. (2016)**. D'autres formes de cinétiques (concave et linéaire) ont été montrées également par les mêmes auteurs. Ce forme de cinétique peut être du à la présence de deux population de spores l'une thermosensible et l'autre thermorésistante. Il peut être également du à la présence des forme végétative dans le stock de spore.

Par ailleurs, les valeurs de la themorésistance sont illustrées sur le tableau 4. Les valeurs de δ sont inversement proportionnelles à la température du traitement. Les résultats ont montré également que les valeurs de δ sont dépendantes de l'isolat. Les isolats S2, S4 et S5 ont montré des valeurs élevées par rapport aux autres deux souches quelle que soit la température testée. Dans cette étude, les valeurs de δ sont plus élevées que celle montré par **Mazas et al. (1999)**. Ces auteurs ont montré que les valeurs de $\delta_{90^\circ\text{C}}$ étaient comprises entre 3,123- 4,753 min. Cependant ces valeurs sont beaucoup plus faibles par rapport aux valeurs montrées par **Montville et al. (2005)** et **Berendsen (2006)**. Par ailleurs, **Janstova et Lukasova (2001)** ont montré des valeurs de δ concorde avec la thermorésistance de l'isolat. Par ailleurs, les valeurs $\delta_{95^\circ\text{C}}$ entre 1,927-2,639 min, la souche 4 (S4) est la plus thermo-résistances et la souche 1 (S1) est la plus thermosensible pour $\delta_{90^\circ\text{C}}$ et $\delta_{95^\circ\text{C}}$ que les autres souches. Quant aux valeurs $\delta_{98^\circ\text{C}}$ étaient comprises entre 1,338-2,117 min, la souche 2 (S2) la plus thermo-résistances et la souche 1 (S1) est la plus thermosensible par rapport les autres souches.

Tableau 4 : Paramètres de thermo-résistances de *B. cereus* de la farine infantile.

Souche s T°C	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
P	0.66	0.76	0.84	0.83	0.81	0.51	1.07	0.81	0.71	0.75	0.63	0.66
D_{90°C}	2.1	3,08	3,78	4,41	4,49	0,78	4,93	3,67	6,85	3,26	2,31	2,58
D_{95°C}	1.04	1.65	2.62	2.2	2.12	0.43	3.42	2.00	1.80	1.64	1.76	0.72
D_{98°C}	0.70	1.63	2.07	1.50	2.03	0.33	3.10	1.92	//			
Z_{T°C}	16.8	27.35	30.6	18.1	22.0	20.8	38.7	27.1	28.6	16.6	42.5	9.03
R²	1	0.937	1	1	0.94	0.99	0.98	0.95	1	0.94	1	1

Dans notre étude le paramètre p est inférieure à 1, les courbe sont de forme convexe pour tout les souches de *B.cereus* testées (Figure 6) qui est expliqué la présence de forme végétative dans la suspension.

Les valeurs de la thermosensibilité varie entre 16,6 et 42,5°C. Ces résultats sont concordance aux valeurs $Z_{T°C}$ rapportées par **Janstova et Lukasova (2001)**. Cependant, ces valeurs sont élevées par rapport à valeurs montrées par **Ziane et al. (2016)** et **Luu-Thi et al. (2014)**. D'après les résultats obtenus la thermo-résistance des spores de *B.cereus* varie en fonction des souches et les conditions environnementales considérées dans cette étude (temps et température).

Tenant compte les résultats de la thermorésistance et des données exemple des instructions donnés par le fabricant d'une marque à consommation nationale dont la température de l'eau utilisé pour la préparation est de 45°C. Les paramètres de la thermorésistance estimés à l'aide de l'équation 2 à cette température, qui a donné des valeurs comprise entre 10,5 et 13,02°C. À cet effet, les concentrations de *B. cereus* estimées après la préparation de repas, tenant compte une concentration initial de Uniform(20 ;12000cellules) (résultats d'une autre étude antérieur) et le temps d'exposition à la température de préparation (2min;6min;8min)), le nouveau-né est exposé à une valeur moyens de 6503 cellules, si le repas est consommé directement.

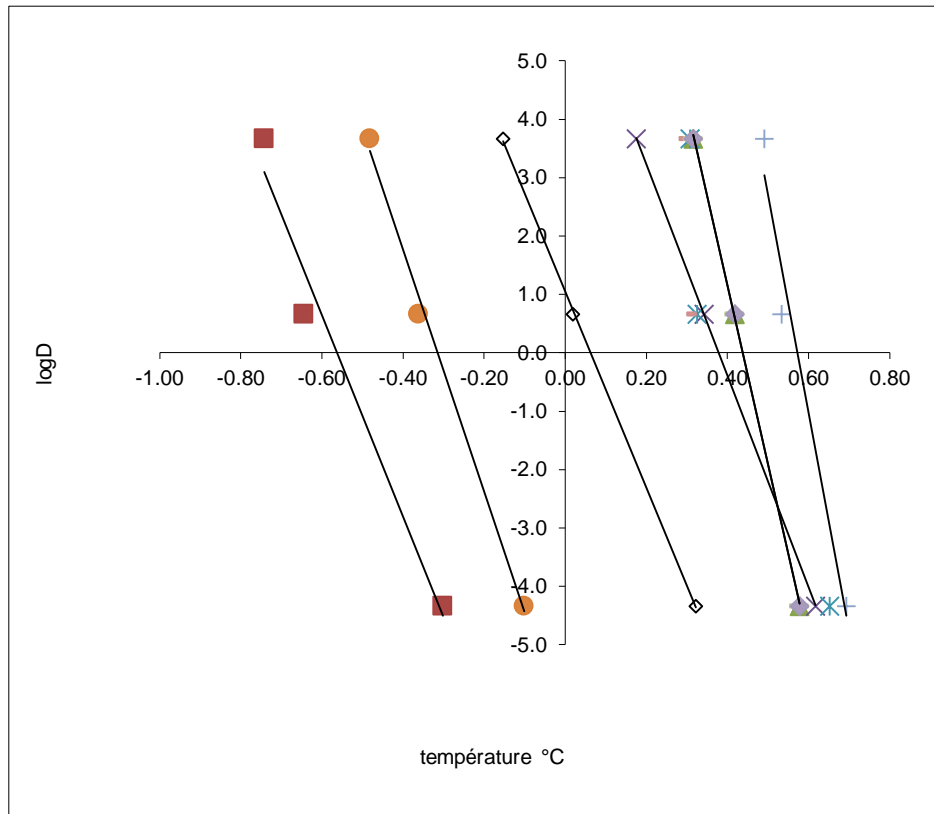


Figure 6: Sensibilité au traitement thermique des différentes souches de *Bacillus Cereus*



CONCLUSION

Conclusion

L'objectif principal de ce travail était d'étudier la thermorésistance de *Bacillus cereus sensu lato* isolée de la farine infantile. A cet effet, la thermorésistance des spores de *B. cereus* de 12 souches était testée à différentes températures (90°C, 95°C et 98°C). Les résultats ont montré des valeurs de temps de réduction décimale dépendante de l'isolat dont les valeurs de $\delta_{90^\circ\text{C}}$ comprise entre 3,123 et 4,753 min avec des valeurs de sensibilité ($Z_{T^\circ\text{C}}$). Ces résultats présentent un intérêt primordial dans le contrôle de comportement de ce pathogène dans un produit destiné à une tranche de consommateurs trop sensible « nouveau-né et enfants ».

Ce travail confirme qu'il est essentiel de s'assurer de la qualité des matières premières, des bonnes pratiques de fabrication et d'hygiène, des températures de distribution et de stockage pour obtenir des produits finis qui soient microbiologiquement stables et salubres.

Des recommandations peuvent être établit : (1) Hygiènes dans la cuisine, (2) utiliser une température entre 50 et 80°C, (3) préparer une quantité pour un seul repas et (4) minimiser le temps de l'attente et de conservation.

Comme perspective à ce travail, les isolats de spores de *Bacillus spp* doit être identifiée par le séquençage de gène d'ARNr 16S. Si l'identification a montré la présence de l'espèce *cereus*, une deuxième affiliation moléculaire basée sur le gène *panC* sera effectué.

Deuxième perspective, est la validation de la thermorésistance de ces isolats dans le repas de la farine infantile ainsi que leur croissance dans les différentes conditions environnementales. Au terme de ces résultats envisagés, une évaluation de l'exposition de *B. cereus* liée à la consommation de la farine infantile.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Abbas A.A. 2014. Effet de l'absence d'oxygène sur la capacité de sporulation et les propriétés de spores des *B. cereus*. Thèse de doctorat, Université d'Avignon et les pays de Vaucluse. Pp 12-29.
2. AFNOR (1994). Microbiologie : Directives générales pour le dénombrement de *Bacillus cereus*. NF ISO 7932. 203- 217.
3. Akaki D., Sadat A.W., Loiseau G. et Guyot J P. 2008. Etude du comportement des souches de *Bacillus cereus* ATCC 9139 et d'*escherichia coli* ATCC 25922 par la méthode des challenge-tests lors de la confection de bouillies à base de pâte de mil fermentée en provenance de OUAGADOUGOU (Burkina-faso). p : 103-117
4. ANSES (2011). Caractéristiques et sources de *Bacillus cereus*. Rapport de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
5. Gabriel A., Rossi M., Eduardo C., Aguilar G., Silva H O. et Vidal A M C. 2018. *Bacillus cereus* group: genetic aspect related to food safety and dairy processing. *Arq. Inst. Biol.* 85, 1-7.
6. Bigelow W.D. (1921). The logarithmic nature of thermal death time curves. *J. Infect. Dis.* 29, 528-536.
7. Briend A. 2009. L'alimentation de complément : recommandations actuelles. Revue générale. *Med Trop*; 69: 298-302.
8. Codex Alimentaire 2015. Code d'usages en matière d'hygiène pour les aliments à faible teneur en eau. FAO et OMS. pp 26.
9. De Vries M C., Vaughan E E., Kleerebezem M. et De Vos W M. (2006). *Lactobacillus Plantarum*-Survival, Functional and Potential Probiotic Properties In The Human Intestinal Tract. *Int. Dairy J.* 16(9), 1018-1028.
10. Drobniowski F A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* 6(4), 324-338.
11. Dromigny E. 2008. *Bacillus cereus*. Edition Lavoisier, pp.1-233.
12. Faille C., Tauveron G., Gentil-Lelievre C L. et Slomianny C. 2007. Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *J. Food Prot.* 70, 2346- 2353.

13. FAO 1982. Les graines de légumineuses dans l'alimentation humaine « étude FAO : Alimentation et Nutrition (20) ». Rome. 152 p.
14. FAO 1995. Le sorgho et les mils dans la nutrition humaine, collection FAO Alimentation et Nutrition N°27.
15. Guinebretière M H., Thompson F L., Sorokin A., Normand P., Dawyndt P., Ehling-Schulz M., Birgitta S., Vincent S., Nguyen-The C., Heyndrickx M. et De Vos, P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environ. Microbiol.* 10(4), 851-865.
16. Guinebretière M H., Velge P., Couvert O., Carlin F. and Debuyser M L. (2010). Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups i to vii) rather than species affiliation. *J. Clin. Microbiol.* 48(9), 3388-3391.
17. Heini N., Stephan R., Ehling-Schulz M. et Johler S. 2018. Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from powdered food products. *Int. J. Food Microbiol.* 283, 59-64.
18. Heldman D R. et Newsome R. L. (2003). Kinetic models for microbial survival during processing. *Food Technol.* 57, 40-46.
19. Henriques A O. et Moran C P. 2007. Structure, assembly, and function of the spore surface layers, *Ann. Rev. Microbiol.* 61, 555-588.
20. Janstova B. et Lukasova J., 2001. Heat resistance of *Bacillus spp.* spores isolated from cow's milk and farm environment. *Acta Vet. Brno.* 70, 179–184.
21. JORAD. n° 39. 2017. Critère microbiologique applicables aux denrées alimentaires. le journal officiel d'Algérie .pp 22.
22. Leggett M J., McDonnell G., Denyer S P., Setlow P. et Maillard J Y., 2012. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *J. Appl. Microbiol.* 113, 485-498.
23. Luu-Thi H., Khadka D B. et Michiels C W. 2014. Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 189, 183-188.
24. Mafart P., Couvert O., Gaillard S. et Leguérinel I. 2002. On calculating sterility thermal reservation methods: application of the Weibull frequency distribution model.
25. Margosch D., Gänzle M G., Ehrmann M A. et Vogel R F. 2004. Pressure inactivation of *Bacillus* endospores. *Appl. Environ. Microb.* 70, 7321-7328.

26. Margarita M., Martinez S., Lopez M., Alvarez A B. et Martin R. 1999. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores affected by the solutes used to control water activity of the heating medium. *Int. J. Food Microbiol.* 53(1), 61-67
27. McClure C., Blackburn W. et Peter J. 2002. Foodborne pathogens; Hazards, risk analysis and control: Second edition.
28. Moir A., Corfe B. M. et Behravan J. 2002. Spore germination. *Cell Mol. Life Sci.* 59 (3), 403-409.
29. Montville T J., Dengrove R., De Siano T., Bonnet M. et Schaffner D W. 2005. Thermal Resistance of Spores from Virulent Strains of *Bacillus anthracis* and Potential Surrogates. *J. Food Prot.* 68, 2362-2366.
30. Mouquet C., Bryeron O. et Treche S., 1998. Caractéristiques d'une bonne farine infantile. Bulletin du réseau TPA. 15, 8-11. 47.
31. NutriFaso, Groupe de recherche et d'échanges technologiques. 2007. Cahier des charges d'une Farine infantile souhaitant être labellisée nutrifaso.
32. Jacobs O. 2007. Effet de la variation de la source de carbone (glucides) sur la croissance, le métabolisme fermentaire et la toxinogénèse de *Bacillus cereus*. Thèse de doctorat dissertation, Aix-Marseille 3.
33. Planchon S., Dargaignaratz C., Levy C., Ginies C., Broussolle V. et Carlin F. 2011. Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 degrees C and 30 degrees C display variations in their properties. *Food Microbiology* 28, 291-297.
34. Rouling L V; Wang D., Zou M., Wang W., Ma X., Chen W., Zhou J., Ding T., Ye X. et Liu D. 2018. Analysis of *Bacillus cereus* cell viability, sublethal injury, and death induced by mild thermal treatment. *J. Food Safety* 39, 1-8.
35. Sanchez J., Correa M., Laura M C S. 2016. *Bacillus cereus* un patogeno importante en el control microbiologico de los alimentos. Facultad Nacional de Salud Pública 230-242.
36. Sanogo M., Mouquet C., and Trêche S., 1994. La production artisanale de farines infantiles, Expériences et Procédés. Gret, Paris, France, p 11.
37. Setlow P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis* : their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 101, 514-525.
38. Setlow P., Wang S., Li Y Q. 2017. Germination of spores of the orders *Bacillales* and *Clostridiales*. *Annu Rev Microbiol* 71:459–477.

39. Setlow P. 2003. Spore germination. *Curr Opin Microbiol.* 6(6), 550-556.
40. Ceuppens S., Rajkovic A., Heyndrickx M., Tsilia V., De Wiele T V., Boon N. et Uyttendaele M. 2011. Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Crit. Rev. Microbiol.* 37(3), 188-213.
41. Sika A E., Romuald B., Kadji L., Dje K M., Thierry F., Kone M., Dabonne S. et Koffi-Nevry A R. 2019. Qualité nutritionnelle, microbiologique et organoleptique de farines composées à base de maïs (*Zea mays*) et de safou (*Dacryodes edulis*) produites en Côte d'Ivoire p : 326
42. Six S C., De Buyser M L., Vignaud M L., Dao T T., Messio S., Pairaud S. et Brisabois A. 2012. Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus*: bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation/Sécial Risques alimentaires microbiologiques*, 50, 57-61.
43. Teyssou R., Hance P., Nicand E., Nizon J. Y., Buisson Y. 1998. les infections à *Bacillus cereus*: bactériologie, clinique et traitement p : 99.
- a. thermal reservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int. J. Food Microbiol.* 72, 107
44. Traore T., Zagre N M., Traore A S. et Treche S. 2003. Effet de la consommation de bouillies fortifiées de haute densité énergétique sur les ingérés, la croissance et les statuts en fer et en vitamine A d'enfants de 6 à 10 mois en zones rurales sahéliennes. 2ème Atelier international. Voies alimentaires d'amélioration des situations nutritionnelles. Ouagadougou. 23-28 / 11 / 2003.
45. Trèche S., de Benoist B., Benbouzid D., Vertser A. et Delpeuch F. 1995. L'alimentation de complément du jeune enfant, Actes d'un atelier OMS/Orstom inter-pays, du 20 au 24 novembre 1994 à l'Université Senghor, Alexandrie (Égypte), Paris, France.
46. Yunyi Zhang, Jiancai Chen, Chunyan Feng, Li Zhan, Junyan Zhang, Yi Li, Yong Yang, Honghu Chen, Zheng Zhang, Yanjun Zhang, Lingling Mei, and Haifeng Li 2017. Quantitative Prevalence, Phenotypic and Geotpic Characteristics of *Bacillus cereus* Isolated from Retail Infant Foods in China p: 9
47. Zannou Tchoko V.J., Bouaffou K.G.M., KOUAME K.G. et Konan B.A., 2011. Etude de la valeur nutritive de farines infantiles à base de manioc et de

- soja pour enfant en âge de sevrage. Bulletin de la société royale des Sciences de Liège. 80, 748–758.
48. Ziane M., Desriac N., Le Chevalier P., Couvert O Moussa-Boudjema B. et 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
 49. Ziane M., Leguerinel I. et Membre J M. 2019. A quantitative microbiological exposure assessment of *Bacillus cereus* group IV in couscous Semolina, Algeria. *Microbial Risk analysis*. p: 12
 50. Ziane M., Le Chevalier P., Couvert O., Moussa-Boudjema B. et Leguerinel I. 2016. Identification and characterization of aerobic spore forming bacteria isolated from commercial camel's milk in south of Algeria. *Small Ruminant Res.* 137, 59-64.
 51. Zwietering M H., de Wit J C. et Notermans S. 1996. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurized milk at point of consumption. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 55-70.

ANNEXES

Annexe 01 : les milieux de culture

1. BHI: (Brain Heart Infusion agar)

Pour 1 litre de milieu :

- Extrait coeur-cervelle17,5 g
- Peptone pancréatique de gélatine10,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Phosphate disodique2,5 g
- Glucose.....2,0 g
- Agar agar bactériologique.....15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,4 \pm 0,2$.

Préparation :

- Mettre en suspension 52,0 g de milieu déshydraté (BK029) dans 1 litre d'eau distillée ou Déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

2. Gélose nutritif:

- Peptone.....10g/l
- Extrait de viande 15g/l
- Extrait de levure 2g/l
- Sodium chloride5g/l
- Aar-agar 15g/l
- ED.....1L

Annexe 02 : 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.

1. Préparation du frottis :

- Sur une lame, déposer une goutte d'eau stérile ;
- Ajouter une suspension d'une culture jeune à l'aide de l'anse de platine ;
- Sécher la lame après la fixation par la flamme bleue de bec bensen (passer 3 fois rapidement) et laisser refroidir.

2. Coloration

Principe :

Cette coloration est une coloration complexe qui permet de différencier les bactéries d'après leur forme et leur affinité pour les colorants.

La coloration permet de distinguer les bactéries GRAM + des GRAM – grâce à leurs différences de nature de paroi. Les bactéries à Gram négatif ont une paroi plus fine et riche en lipides, alors que les bactéries Gram positifs ont une paroi épaisse et pauvre en lipide.

Réalisation de la coloration :

- 1- La coloration par violet de gentiane (cristal violet) et laisser agir pendant 1 min après rincer à l'eau distillé ;
- 2- Verser le lugol pour fixer le colorant pendant 1 min puis rincer à l'eau distillée ;
- 3- Verser l'alcool pour décolorer la préparation après rincer à l'eau distillé pendant 30 secondes ;
- 4- Contre coloration à la Fuschine ou de la Safranine, laisser agir de 30 secondes à 1 min et laver doucement à l'eau distillé après sécher la lame à l'aire ;
- 5- Observer au microscope optique à l'objectif x100 à immersion.

Une coloration rose indique que les bactéries sont Gram négatives, et une coloration violette qu'elles sont Gram positive.

Annexe 03 : Test de catalase

1. Intérêt

La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique pour l'identification d'une souche pure bactérienne en ce qui concerne les bactéries à Gram +

2. Principe

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

Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.

3. Technique :

- déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (= peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur
- prélever une colonie à l'aide de l'anse
- dissocier la colonie dans la goutte

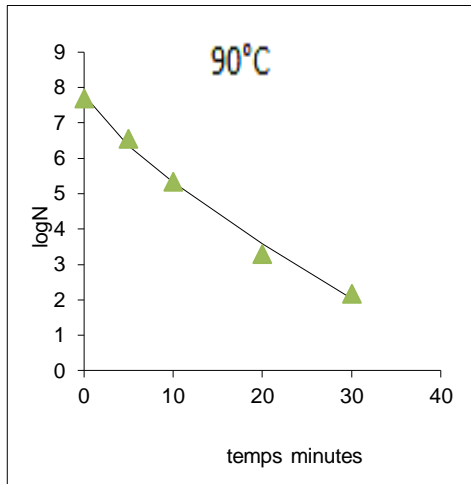
4. Lecture :

Bulles d'oxygène : La bactérie possède la catalase, elle est dite : **Catalase +**

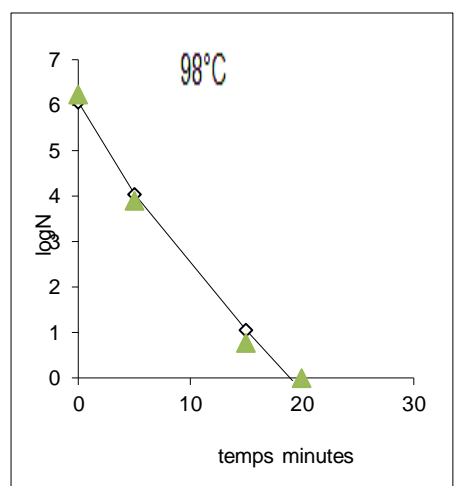
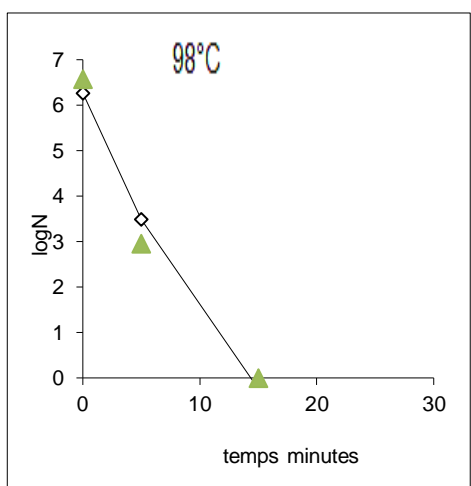
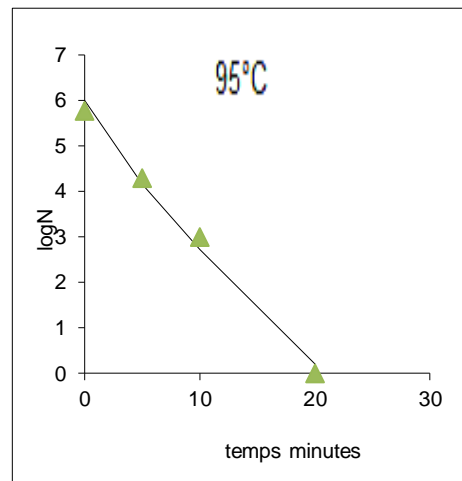
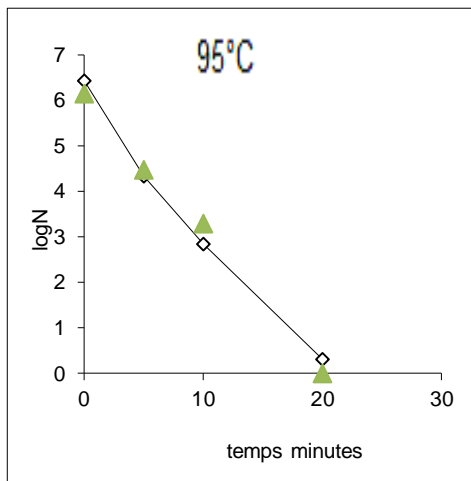
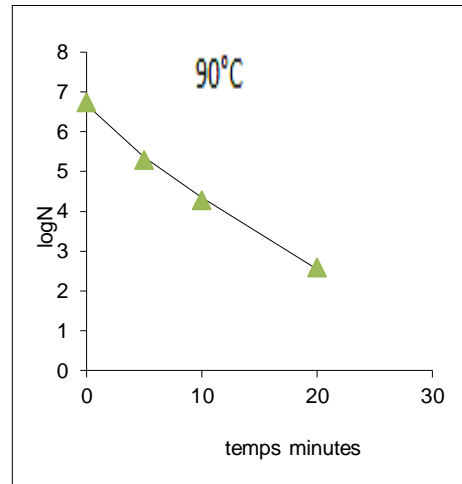
Pas de bulle : La bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite : **Catalase –**

Annexe 4 : Cinétiques de destruction de 12 isolats de *B.cereus* (original)

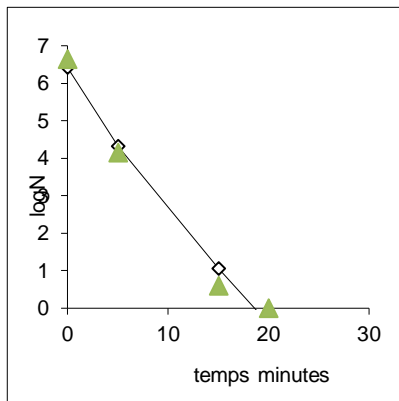
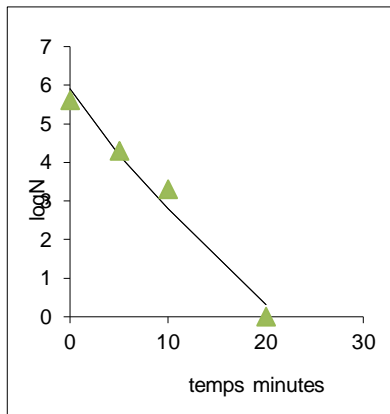
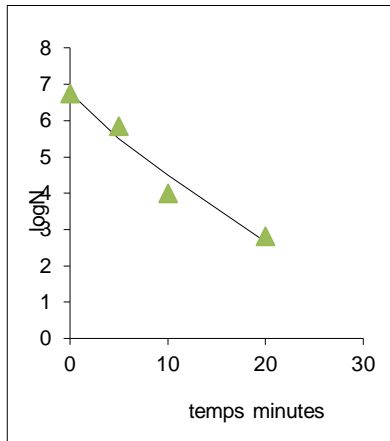
Isolat 1



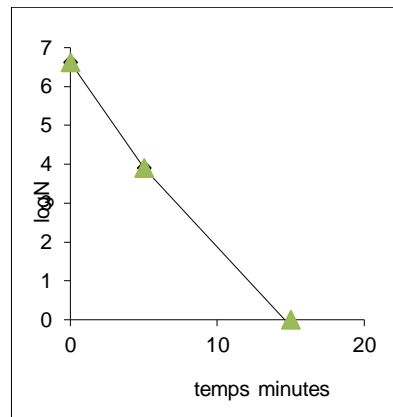
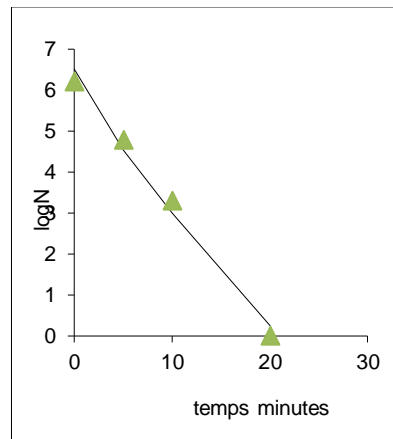
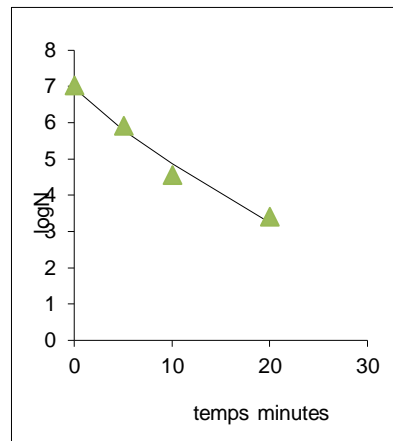
Isolat 2



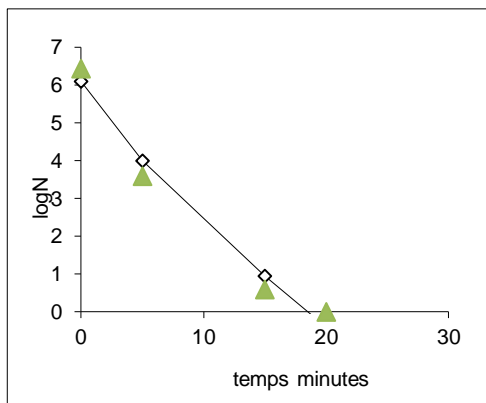
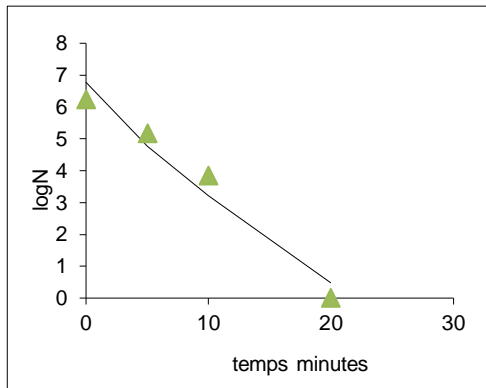
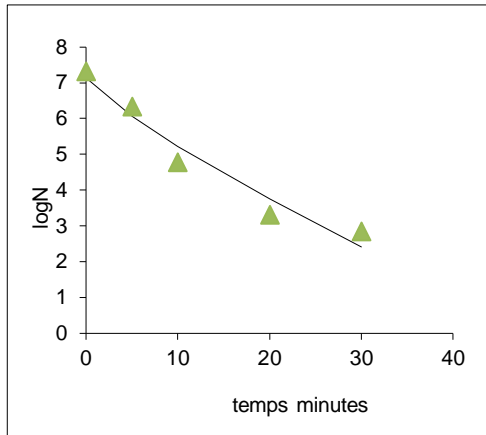
Isolat 3



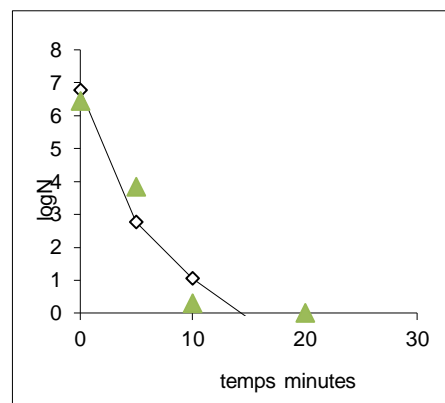
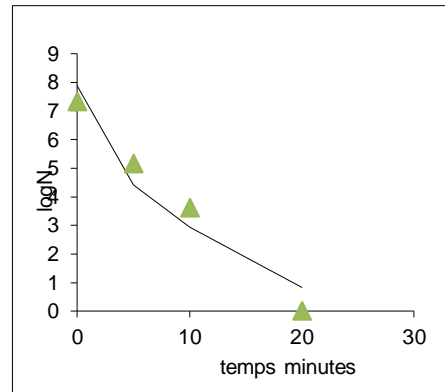
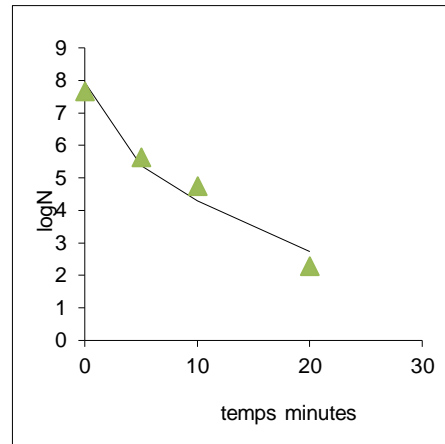
Isolat 4



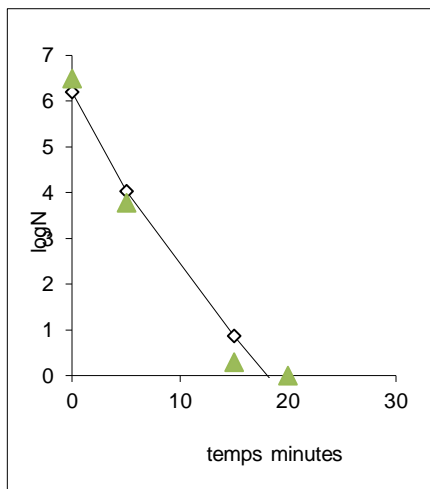
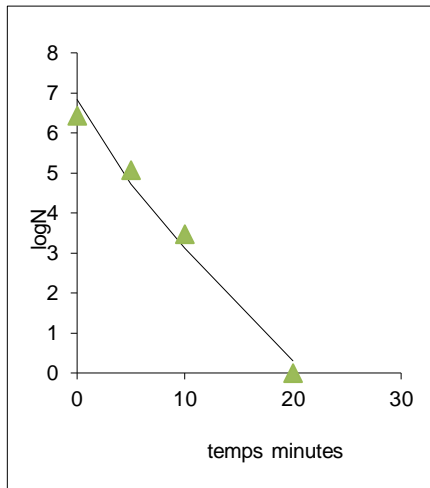
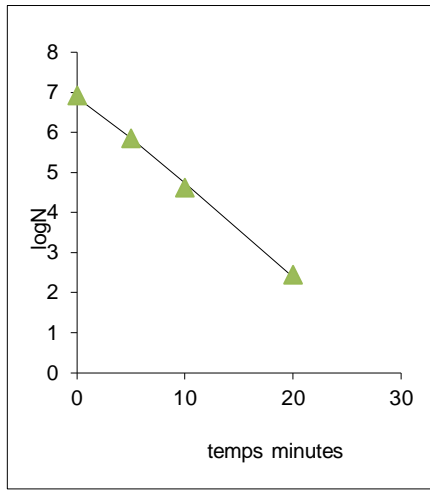
Isolats 5



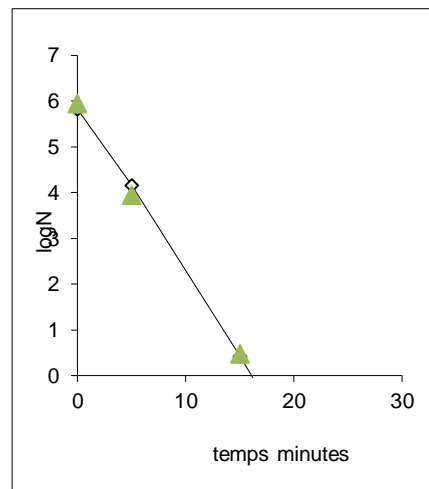
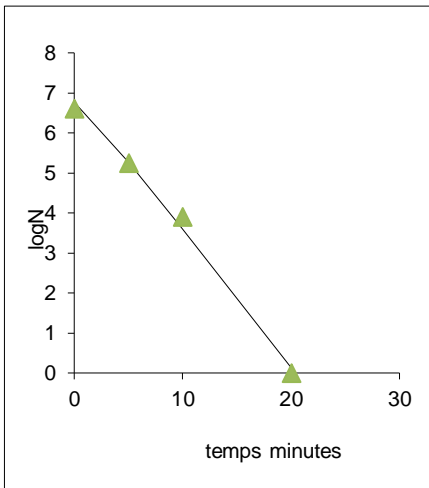
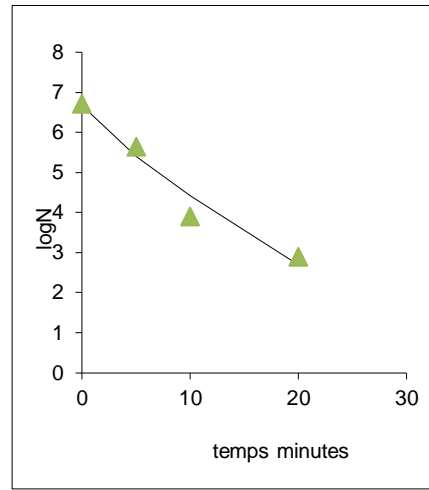
Isolat 6



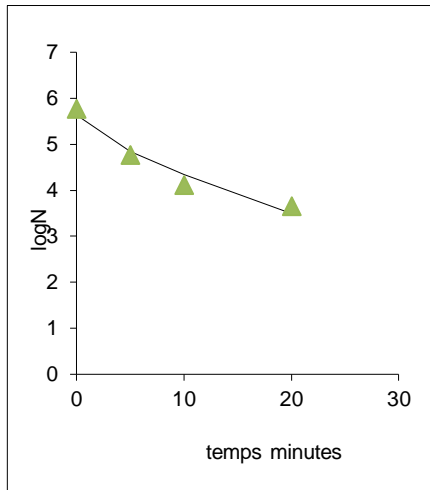
Isolat 7



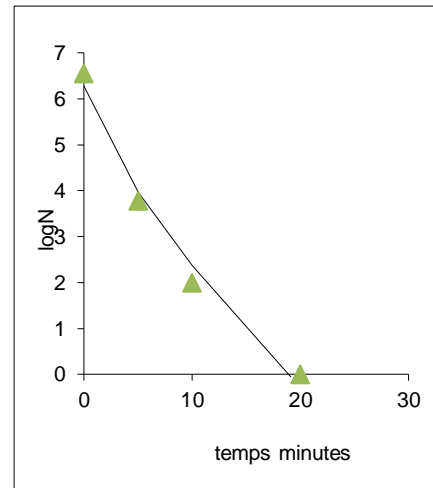
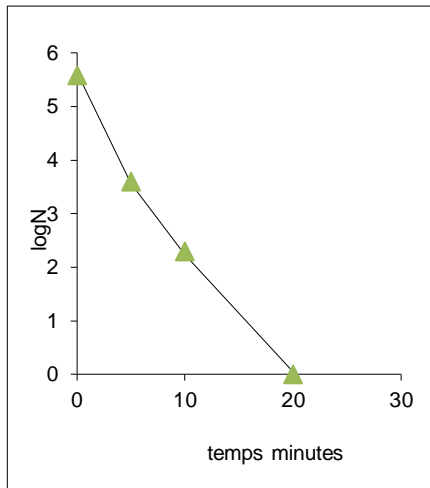
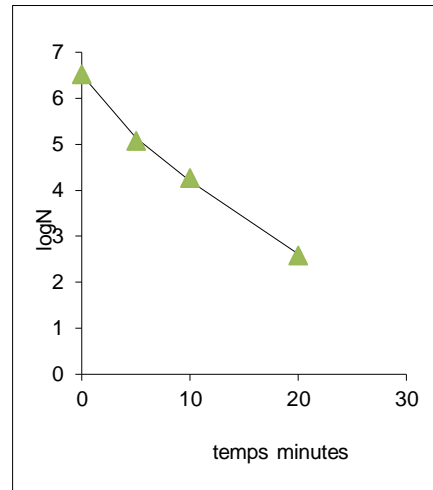
Isolat 8



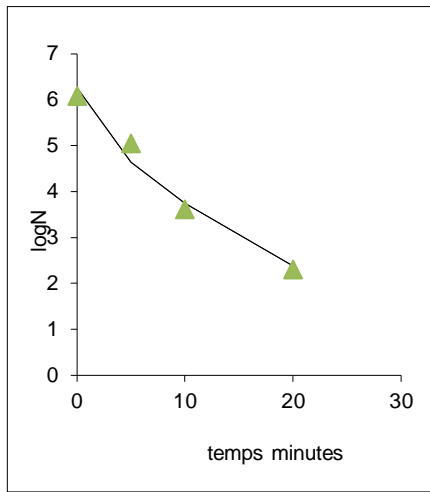
Isolat 9



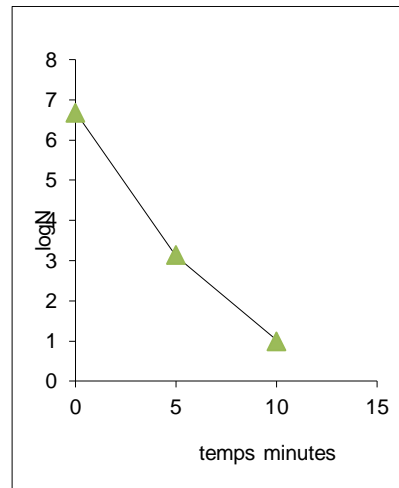
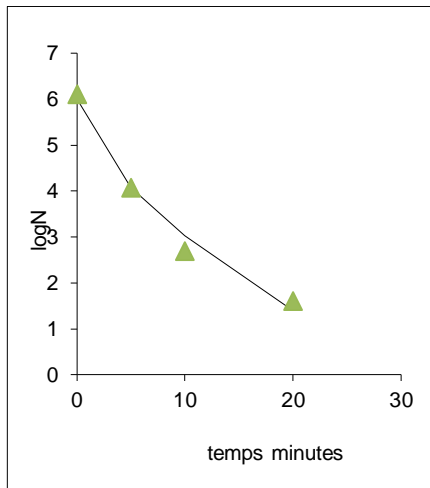
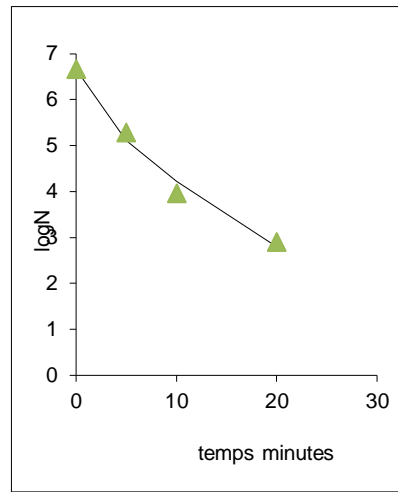
Isolat 10



Isolat 11



Isolat 12



Résumé :

Bacillus cereus est une bactérie sporulée ubiquitaire reconnue comme un agent causal des maladies d'origine alimentaire, notamment, lié aux produits alimentaires déshydratés comme la farine infantile destinée à une tranche d'âge trop sensible. Les spores, généralement produites en condition de carence nutritionnelle, sont extrêmement résistantes ce qui leur permet de persister dans son environnement.

Dans ce travail, 12 souches de *B. cereus* a été étudié pour évaluer leur thermo-résistance. Les résultats montrent la thermo-résistance des isolats est dépendante d'une souche à une autre suivi d'une cinétique convexe ($P < 1$). En effet, les valeurs de $\delta_{T^{\circ}C}$ des isolats obtenus varient entre 3,123- 4,753 min à 90°C, entre 1,927-2,639 min à 95°C et entre 1,338-2,117 min à 98°C. Par ailleurs, les valeurs $Z_{T^{\circ}C}$ varient de 19,74 à 34,31°C. Ce travail a permis de définir les paramètres importants pour maîtriser le risque contamination alimentaire par *B. cereus*.

Mots clés : *B. cereus*, farine infantile, thermo-résistance, spores.

Abstract

Bacillus cereus is a ubiquitous spore-forming bacterium recognized as a causative agent of food-borne illnesses, in particular, linked to dehydrated food products such as infant meal intended for an overly sensitive age group. The spores, generally produced in a nutritional deficiency condition, are extremely resistant which allows them to persist in the environment.

In this work, 12 strains of *B. cereus* were studied to assess their heat resistance. The results show the heat resistance of the isolates is dependent on one strain to another followed by a convex kinetics ($P < 1$). Indeed, the values $\delta_{T^{\circ}C}$ of the isolates obtained vary between 3.123-4.753 min at 90 ° C, between 1.927-2.639 min at 95 ° C and between 1.338-2.117 min at 98 ° C. In addition, the $Z_{T^{\circ}C}$ values vary from 19.74 to 34.31 ° C. This work made it possible to define the important parameters to limit the risk of food contamination by *B. cereus*.

Key words: *B. cereus*, infant flour, heat resistance, spores.

المخلص:

Bacillus cereus هي بكتيريا توجد في كل مكان معترف بها كعامل مسبب للأمراض التي تنتقل عن طريق الغذاء، على وجه الخصوص، المنتجات الغذائية المجففة بما في ذلك طحين الاطفال المعدة لفئة عمرية شديدة الحساسية. تكون الأبواغ، التي يتم إنتاجها بشكل عام في حالة نقص التغذية، شديدة المقاومة مما يسمح لها بالاستمرار في بيئتها. في هذا العمل، تمت دراسة 12 سلالة من بكتيريا *B. cereus* لتقييم مقاومتها للحرارة. أظهرت النتائج أن مقاومة الحرارة للعزلات تعتمد على سلالة إلى أخرى تليها حركة محدبة ($P < 1$). في الواقع، تختلف قيم $\delta_{T^{\circ}C}$ للعزلات التي تم الحصول عليها بين 3.123-4.753 دقيقة عند 90 درجة مئوية، وبين 1.927-2.639 دقيقة عند 95 درجة مئوية وبين 1.338-2.117 دقيقة عند 98 درجة مئوية. بالإضافة إلى ذلك، تتراوح قيم $Z_{T^{\circ}C}$ من 19.74 إلى 34.31 درجة مئوية. هذا العمل يسمح من تحديد اعدادات هامة للحد من خطر تلوث الغذاء عن طريق *B. cereus*.

الكلمات المفتاحية: *B. cereus*، دقيق الأطفال، مقاومة الحرارة، الأبواغ