

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. **BOUHENIA Dalel** & Mlle. **BOUKACEM Bouchra**

Thème:

---

### **Etude de la thermorésistance des spores de *B. cereus* sensu lato isolées à partir des épices de la soupe « Hrira » : cas de la région d'Ain Témouchent**

---

Encadrant :

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

Soutenu Le 25/06/2019

Devant le jury

Président : Pr. BELLEHCENE Miloud	Pr	C.U.B.B.A.T.
Examineur : Dr.CHIBANI Hibat El Rahman	MCB	C.U.B.B.A.T.
Encadrant : M. ZIANE Mohammed	MCA	C.U.B.B.A.T.

## Dédicace

*Du profond de mon cœur, Je dédie ce mémoire  
À mon père,*

*Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras. Pour son enseignement continu à m'inculquer les vraies valeurs de la vie et pour ses précieux conseils. Puisse Dieu, à te garder et à prolonger ta vie.*

*À ma mère,*

*Aucune dédicace n'exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.*

*Que ce mémoire soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le très haut, vous accorde santé, bonheur et longue vie.*

*À ma grand-mère*

*Ce qui ne m'a pas épargné en appelant Dieu pour mon succès. Que Dieu vous bénisse la santé et prolonge ta vie*

*À mes chers frères Abdelkader, Fatima Zohra et Mohamed Amine*

*Qui m'ont encouragé et soutenu tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leur offre la chance et le bonheur.*

*À tous mes cousins et mes cousines et spécialement à Rafika ;*

*À toute la famille Boukacem et Belbachir sans oublier ma tante Fatima et ses enfants.*

*Bouchra*



## Dédicace

*Je dédie ce travail qui n'aura jamais pu voir le jour sans les soutiens indéfectibles et sans limite de mes parents que j'aime beaucoup pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études*

*A mes chères sœurs **Fatima Zohra, Samira, Soumia** et leurs petits enfants : **Marouan, Islem, Hani Ahmed, Kenza, Aya**, la petite épouse **Yakine** pour leurs encouragements permanents et leur soutien moral ;*

*Et mon frère **Amine** pour ses soutiens et ses encouragements ;*

*A toute la famille **Bouhenia** et mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité ;*

*A tous mes amis surtout **Meriem Benmaddah** qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès ;*

*A tous ceux que j'aime*

*Merci !*

*Dalel*

## **Remerciements**

*Tout d'abord, Nous rendons grâce à DIEU créateur de l'univers et maître des destinées, pour avoir permis à la notre de suivre la bonne voie, celle de la foi et du savoir, et pour nous avoir guidés et soutenus lors de l'élaboration de cet humble travail.*

*Nos vifs remerciements vont particulier a notre promoteur Mr **ZIANE Mohammed**, maître de conférences classe A, au centre universitaire de Ain Témouchent, de nous avoir proposé ce sujet et de diriger notre travail par leurs : précieux conseils, encouragements, aides, patiences, disponibilités et compréhensibilités.*

*Nos sincères remerciements vont aussi aux membres de jury pour l'honneur qu'ils auront fait en acceptant de juger ce travail à : Mr **BELAHCENE Miloud**, professeur D'avoir accepté de présider le jury et à M<sup>elle</sup> **CHIBANI Hibat Elrahmane**, maître de conférences classe B, au CUAT qui a consacré son temps pour l'examination de ce travail.*

*Nos remerciements à tous les membres de l'équipe de laboratoire pédagogique de l'institut des Science, particulièrement **Khaled** et **Walid**.*

*Nous tenons aussi à remercier chaleureusement tous nos enseignants de département SNV qui nous ont suivis au long de nos études. Nos remerciements s'adressent à Mr **BREXI Adil** pour son aide matériel ; C'est avec un réel plaisir que nous 'adresse nous sincères reconnaissances et nos profonde gratitude à tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin pour réaliser cette étude.*

*Enfin, nous voudrions remercier tout particulièrement nos familles pour leur soutien constant au long de nos études et tous nos amis dans le laboratoire spécialement à **Amina, Meriem, Ahlem, Leila, Bouchra** et **Kawter**.*

# Sommaire

Liste des tableaux

Liste d'abréviations

Liste des figures

INTRODUCTION

## Partie I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I. 1. Généralités sur les épices</b>	<b>03</b>
<b>I. 1.1. Histoire des épices</b>	<b>03</b>
<b>I. 1. 2. Définition des épices</b>	<b>03</b>
<b>I. 1. 3. Classification des épices</b>	<b>04</b>
<b>I. 1. 4. Variétés des épices et leurs utilisations</b>	<b>06</b>
<b>I. 1. 5. Transformation des épices</b>	<b>10</b>
<b>I. 1. 6. Origine de contamination des épices</b>	<b>11</b>
<b>I. 1. 7. Décontamination des épices</b>	<b>11</b>
<b>I. 1. 8. Propriétés des épices</b>	<b>12</b>
<b>I. 1. 8. 1. Activité antimicrobienne des épices</b>	<b>12</b>
<b>I. 1. 8. 2. Activité antioxydant des épices</b>	<b>12</b>
<b>I. 1. 9. Toxicité des épices</b>	<b>13</b>
<b>I. 2. Généralité sur <i>Bacillus cereus</i></b>	<b>14</b>
<b>I. 2. 1. Principaux caractères de <i>B. cereus</i></b>	<b>14</b>
<b>I. 2. 1. 1. Caractères morphologiques</b>	<b>14</b>
<b>I. 2. 1. 2. Caractères physiologiques</b>	<b>14</b>
<b>I. 2. 1. 3. Caractères biochimiques</b>	<b>14</b>
<b>I. 2. 2. <i>Bacillus cereus</i> et espèces proches</b>	<b>15</b>
<b>I. 2. 3. Classification de <i>B. cereus</i></b>	<b>16</b>
<b>I. 2. 4. Structure de spores de <i>B. cereus</i></b>	<b>17</b>
<b>I. 2. 5. Mécanismes de sporulation des cellules végétatives de <i>B. cereus</i></b>	<b>18</b>
<b>I. 2. 6. Germination des spores de <i>B. cereus</i></b>	<b>20</b>
<b>I. 2. 7. Pouvoir pathogène de <i>B. cereus</i></b>	<b>20</b>
<b>I. 2. 8. Thermorésistance de spores de <i>B. cereus</i></b>	<b>21</b>
<b>I. 2. 8. 1. Origine de la thermorésistance de spores de <i>Bacillus cereus</i></b>	<b>21</b>
<b>I. 2. 8. 2. Paramètre de la thermorésistance de spores de <i>Bacillus cereus</i></b>	<b>21</b>

**Partie II**  
**EXPERIMENTALE**

<b>II. 1. MATERIELS ET METHODES</b>	<b>23</b>
<b>II. 1. 1. Echantillonnage et prélèvement des épices de la soupe</b>	<b>23</b>
<b>II .1. 2. Recherche, isolement et purification de <i>B. cereus sensu lato</i></b>	<b>24</b>
<b>II .1. 3. Confirmation de l'authentification d'appartenance des isolats au groupe <i>B. cereus</i></b>	<b>24</b>
<b>II .1. 4. Mise en évidence de l'hémolyse</b>	<b>25</b>
<b>II. 1. 5. Vérification de la pureté des isolats de <i>B cereus sensu lato</i></b>	<b>25</b>
<b>II .1. 6. Conservation des isolats de <i>B. cereus sensu lato</i></b>	<b>25</b>
<b>II. 1. 7. Etude de la thermorésistance des isolats de <i>B. cereus sensu lato</i></b>	<b>25</b>
<b>II .1. 7. 1. Production de spores de <i>B. cereus sensu lato</i></b>	<b>25</b>
<b>II .1. 7. 2. Traitement thermique des spores</b>	<b>26</b>
<b>II .1. 7. 3. Détermination de paramètres de thermo-résistance de <i>B.cereus sensu lato</i></b>	<b>27</b>
<b>II .1. 8. Schéma récapitulatif des manipes</b>	<b>28</b>
<b>II. 2. RESULTATS ET DISCUSSIONS</b>	<b>29</b>
<b>II. 2.1.Obtention des isolats de <i>B. cereus sensu lato</i></b>	<b>29</b>
<b>II. 2. 2. Test de confirmation de la pureté de la souche de <i>B.cereus sensu lato</i></b>	<b>29</b>
<b>II. 2.3. Test de confirmation de l'authentification</b>	<b>31</b>
<b>II. 2. 4. Production et conservation de spores de <i>B. cereus sensu lato</i></b>	<b>31</b>
<b>II. 2. 5. Prévalence et dénombrement et de <i>B. cereus sensu lato</i> des épices de Hrira</b>	<b>31</b>
<b>II. 2. 5. 1. Prévalence de <i>B. cereus sensu lato</i> dans les échantillons analysés</b>	<b>31</b>
<b>II. 2.5.2.Dénombrement de <i>B. cereus sensu lato</i> dans les échantillons analysés</b>	<b>33</b>
<b>II. 2. 6. Thermorésistance des isolats de <i>B. cereus sensu lato</i></b>	<b>34</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>37</b>
<b>REFERENCES BIBIOLIOPGRAPHIQUES</b>	
<b>ANNEXES</b>	

## **Liste d'abréviations :**

**AFNOR** : Association française de normalisation

**Anse** : agence nationale de sécurité sanitaire alimentaire et environnementale

**AT**:Ain temouchente

**Atb**:Ain Tolba

**ATCC** :American type culture collection

**BHI** : Brain Heart Infusion

**Bnf**: Benisaf

**C**: tunique (Coat)

**Chbt**:Chabat

**Cr** : Cœur ou corps sporal

**Ctx ou Cx**: Cortex

**Cytk** : La cytotoxine K

**D** : le temps de réduction décimal

**DPA** : l'acide dipicolinique

**Eaek**:Emir Abdelkader

**ESA** :association européenne des épices

**EX, SL**: exosporium (Surface Layer)

**FAO**: food and agriculture organization of the United Nations

**Hbh**:Hamam bouhdjar

**Hbl** : hémolysine BL

**IC** : tunique interne (Inner coat)

**IM ou IFM** : Membrane interne (Inner Forespore Membrane)

**JORAD** : journal officiel de la républiquealgérienne

**Mlh**:Malah

**N**: nucléides

**Nhe** : entérotoxine non hémolytique

**OC** : tunique externe (Outer coat)

**OFM**: membrane externe

**PCW ou PGCW**: Paroi sporale (Primordial Germ Cell Wall)

**Sbd**:Sidi ben adda

**Snv** :science de la nature et la vie

**T** : la température

**t** : temps

**TIAC** : toxi-infections alimentaires collectives

**UC**: Sous-tunique (Under Coat)

**UFC** : unité forment colonie

**UNIDO** : united nations industriel development organization

**Z** : sensibilité au traitement thermique



## Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Classification taxonomique des épices (Peter, 2001).	05
02	Classification sensorielle des épices (Peter, 2001).	06
03	Variété des épices et leurs utilisations	7
04	Composés toxique des épices et leur effet (Kneifel et Berger, 1993).	13
05	Principaux caractères bactériologiques permettant de différencier les espèces du "groupe <i>Bacillus cereus</i> "(Carlin et Nguyen-the, 1998 ; Denis et al., 2007)	15
06	Caractéristiques physiologiques de croissance et de thermorésistance de différents groupes de <i>B. cereus</i> (Cadel et al., 2012).	16
07	Points de prélèvement des échantillons des épices utilisées pour assaisonner « Hrira ».	23
08	Prévalence (%) et concentrations (log ufc/g) de <i>B. cereus</i> sensu lato dans les épices utilisées pour l'assaisonnement de « Hrira » dans la région de Ain Témouchent.	32
09	Concentrations (log ufc/g) de <i>B. cereus</i> sensu lato dans les épices utilisées pour la préparation de soupe « Hrira » dans la wilaya de Ain Témouchent.	34
10	Paramètres de thermo-résistances de <i>B. cereus</i> sensu lato des épices commercialisé dans la région d' Ain Témouchent	36

### Liste des figures :

N°	Titre	Page
01	(a) photographie en microscopie de <i>Bacillus cereus</i> en phase stationnaire de croissance ; (b) photographie en microscopie électronique d'une spore de <i>Bacillus cereus</i> (Gaillard, 2003) ; (c) schéma d'une coupe de spore de <i>Bacillus subtilis</i> (Gaillard, 2003).	18
02	Cinétique de destruction thermique	22
03	Calcul de la valeur $Z_{T_c}$ (exemple établi pour la température)	22
04	Logigramme des manipes réalisées.	28
05	Aspect de <i>B. cereus sensu lato</i> sur gélose Mossel à émulsion de jaune d'œuf entourée par une zone claire	29
06	Culture pure sur milieu nutritif gélosé de l'isolat E3 <i>Bacillus cereus sensu lato</i> obtenu à partir de Safran prélevé de Hamam Bouhdjar	30
07	Observation microscopique de cellules de <i>Bacillus cereus</i> isolat E9 obtenu à partir de Safran prélevé de Hamam Bouhdjar (10x100). a) après coloration de Gram, b) après coloration au vert de malachite	30
08	Culture de l'isolat carvi à partir de Sidi Benadda de <i>B. cereus</i> ,ensemencée sur gélose au song, entourée par une zone claire	31
09	Cinétiques de destruction des isolats de <i>B.cereus sensu lato</i> (Souche E11).	35

## Résumé

*B. cereus* est une bactérie sporulée reconnue pour son implication dans les toxi-infections alimentaires, notamment les aliments traités thermiquement et/ou déshydraté à savoir les épices. Elles sont utilisées la Hrira à large consommation surtout en mois de Ramadhan. Ce travail visait à rechercher et dénombrer ce groupe de bactéries ainsi d'évaluer leur thermo-résistance. En effet, 64 échantillons ont été prélevés puis analysés. Les résultats montrent une variabilité de contamination. Les épices chaudes étaient moins contaminées (80%) contrairement aux épices douces et aromatiques. Les concentrations pour l'ensemble des échantillons s'oscillent entre 1 et 6 log ufc/g. Quant aux traitements thermiques, la thermo-résistance des isolats est dépendante de la matrice alimentaires. En effet, les valeurs de  $D_{T^{\circ}C}$  des isolats obtenus à partir de Gingembre étaient relativement similaires (21,62 min et 21,42 min). Par ailleurs, la sensibilité au traitement thermique a montré une dépendance à la matrice alimentaire. Les résultats de ce travail peuvent être un outil au maître de développement microbien dans les aliments.

Mots clés : *B. cereus*, épices, thermorésistance, modélisation.

## Abstract

*B. cereus* is a spore-forming bacterium known for its involvement in foodborne illness, especially heat-treated and / or dehydrated foods, namely spices. They are used the Hrira for large consumption especially in the month of Ramadhan. This work aimed to search for and enumerate this group of bacteria thus to evaluate their thermo-resistance. In fact, 64 samples were taken and analyzed. The results show a variability of contamination. Hot spices were less contaminated (80%), unlike sweet and aromatic spices. Concentrations for all samples oscillate between 1 and 6 log cfu / g. As for heat treatments, the thermo-resistance of the isolates is dependent on the food matrix. In fact, the  $DT^{\circ}C$  values of isolates obtained from Ginger were relatively similar (21.62 min and 21.42 min). In addition, sensitivity to heat treatment showed a dependence on the food matrix. The results of this work can be a tool to the master of microbial development in foods.

Key words: *B. cereus*, spices, heat resistance, modeling.

## ملخص

تعتبر البكتيريا العسوية الشمعية المتبوعة من بين اسباب انتشار التسممات الغذائية خاصة في الاغذية المعالجة بالحرارة او ذات كمية ضئيلة من الماء مثل التوابل هذه الاخيرة تستعمل لتحضير الحريرة الاكثر استهلاكاً خاصة في شهر رمضان المعظم .

هدف هذا العمل للبحث وتحديد تركيز هذه البكتيريا وكذا تقدير مقاومتها لدرجة الحرارة .بالفعل 64 عينة منتقاة من منطقة عين تموشنت. اوضحت نتائج التحليل اختلاف في نسبة التلوث بين التوابل الحارة (80 %) و الحلوة و العطرية .

بالنسبة للمعالجة الحرارية ابدت النتائج علاقة وطيدة بين درجة المقاومة و نوعية التابل .بالفعل نفس درجة المقاومة سجلت للعتنين (21.62 د و 21.42 د) . نفس العلاقة ميزت تغير الحساسية لدرجة الحرارة .يمكن استغلال هذه النتائج في التحكم في النمو البكتيري.

الكلمات المفتاحية: *B.cereus* ، التوابل ، مقاومة الحرارة ، النمذجة

# **INTRODUCTION**

La Harira ou hrira est une soupe très consommée dans les pays du Maghreb et notamment en Algérie. Sa préparation se diffère d'un pays à une autre et d'une région à une autre. Elle est utilisée souvent comme entrée lors des fêtes et quotidiennement durant le mois de Ramadan. Elle est préparée à la base de plusieurs légumes secs, viande, oignons. Elle est assaisonnée avec les épices qui sont responsables de l'aspect (consistance, couleur), du goût, et de la saveur. A cet effet, elles sont considérées comme ingrédients essentiels de l'assaisonnement citant à titre d'exemple le poivre rouge et noire, carvi, coriandre, fenugrec, gingembre, curcuma, cannelle et mélange de diverses épices appelées « Raç El Hanut ».

En fait, les épices sont des produits à faible activités d'eau (<0,85) (Codex alimentarius, 2018). A cette condition, les bactéries ne peuvent pas se développer mais ne nie pas leur présence surtout les spores bactériennes ainsi que contamination fongique (et leurs métabolites). Plusieurs travaux ont étudié les contaminants fongiques et/ou leurs métabolites (Guezlane-Tebibelet *al.*, 2016 ; Lejeau et *al.*, 2015). Tandis que peu des travaux ont été réalisés sur les spores bactériennes aérobies et notamment le groupe de *B. cereus*. Cette bactérie était récemment introduite comme critère microbiologique dans la réglementation algérienne des épices (JORAD, 2017). En effet, à cause de son caractère ubiquitaire, ses spores peuvent être apportées aux épices, de sols et de l'environnement durant la culture, procès...etc.

Durant la préparation de la soupe, assaisonnée par les épices les spores de *B. cereus* persistent à la cuisson infligée à cause de son caractère de thermorésistance. Après la préparation, les spores survivantes peuvent germer durant le stockage et l'attente à la consommation puis atteindre des concentrations critiques a  $10^5$  cellules par mL, la dose susceptible de provoquer des intoxications alimentaires (Anese, 2011).

Elle impliquée dans deux types de toxi-infections alimentaires(TIA) : (1) à symptômes diarrhéiques et (2) à symptômes émétiques (Anese, 2011).

En effet, pour les aliments assaisonnés par les épices, 17,8 % a été observées en Finlande entre 1973 et 1985, 11,5 % aux Pays-Bas, 0,8 % en Écosse, 0,7 % en Angleterre et au pays de Galles, 2,2 % au Canada, 0,7 % au Japon et 15 % (entre 1960 et 1968) en Hongrie..... A l'instar de ces pays, l'Algérie n'est pas protégé de ces TIA.

A cet effet, ce travail vise à rechercher et dénombrer les spores de *B. cereu ssensu lato* dans les épices d'assaisonnement de la soupe « Hrira », ainsi de quantifier leur thermorésistance.

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

- Partie 1, est consacrée à la synthèse bibliographiques relatives aux épices et aux groupe de *Bacillus cereus*.
- Partie 2, se focalise sur les différentes techniques utilisées à la mises en œuvre de la méthodologie de cette recherche ainsi l'exposition de résultats et leurs discussions et la thermorésistante de *Bacillus cereus* dans déférents épices de Hrira. Différentes méthodes sont comparées et discutés dans la troisième partie. Enfin la dernière partie rassemblera la conclusion finale et mettra en évidence les perspectives de recherche.

# **Partie I**

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

### I. 1. Généralités sur les épices

#### I. 1.1. Histoire des épices

Les épices avaient une valeur commerciale et économique dans l'antiquité et à l'époque médiévale (Raghavan, 2007). La plupart des épices sont d'origines tropicales (Inde) ou subtropicales (la chine) (Raghavan, 2007).

En fait, les civilisations préalables, telles que les Indiens, les peuples du Moyen-Orient et les Chinois, utilisaient les épices depuis des temps immémoriaux (Raghavan, 2007). Il se trouve un certain nombre des épices et les arômes appliqués aujourd'hui viennent de l'hémisphère occidental (Raghavan, 2007). Des poivrons chiliens ont été détectés au Mexique depuis 7000 ans av. J.-C., lors de fouilles archéologiques (Raghavan, 2007). Par ailleurs, l'Inde est la source d'origine des épices très populaire à l'heure actuelle. En effet, la civilisation de Harappa (Nord d'Inde) est la première qui utilise les épices depuis 3200 av. J.-C (Raghavan, 2007).

Ils peuvent remonter également, l'utilisation d'épices et d'herbes à l'ère de la pyramide en Egypte, entre 2600 et 2100 av. J.-C., tandis que, le commerce international des épices se situe entre 4500 et 1900 avant J.-C, notamment avec l'Éthiopie (Rosengarten, 1969 et Tapsell et al, 2006)

Par ailleurs, les marchands arabes et phéniciens ont été les premiers importateurs des épices orientales au Moyen-Orient et en Europe (Raghavan, 2007). En effet, depuis au moins 950 avant J.-C, les Arabes étaient dominants médiateurs dans le commerce des épices entre l'Inde et l'Occident puis étendus en Afrique du Nord et au Sud de l'Espagne (Raghavan, 2007).

Jusqu'au 18<sup>ème</sup> siècle, l'utilisation des épices prenaient une importance dans la cuisine pour la classe riche (Raghavan, 2007). Cette importance résultait à leur gout fort et également leur rôle dans la conservation de la viande. Le prix des épices était alors très élevé.

#### I. 1. 2. Définition des épices

Selon Codex *alimentarius*, les épices appartiennent à la catégorie des épices et herbes aromatiques séchées. Elles sont définies comme « parties de végétaux aromatiques naturels ou leurs mélanges, utilisées pour donner de la saveur, de l'arôme ou pour assaisonner les aliments. Ce terme s'applique aux produits entiers, broyés, moulus ou mélangés » (CAC/RCP 42-1995).



Par ailleurs, selon le dictionnaire Larousse (édition 2012), les épices sont définies comme toute substance aromatique et végétale servant à l'assaisonnement des mets.

En revanche, selon l'association européenne des épices (ESA), les épices et herbes culinaires peuvent être définies comme des «parties comestibles de plantes traditionnellement ajoutés aux denrées alimentaires pour leurs propriétés aromatisants, aromatiques et / ou visuelles naturelles » (Baiba et al., 2017).

En fait, les épices et les herbes sont extraites de diverses parties des plantes, telles que les racines, les feuilles, les fleurs, les graines et l'écorce, qui ont une grande valeur sensorielle malgré leur faible valeur nutritive (Fogele et al., 2017).

Le célèbre auteur d'épices Rosengarten décrit une épice comme un produit qui enrichit ou modifie la qualité d'une chose, par exemple en modifiant le goût d'un aliment pour lui donner du zeste ou goût piquant; un arôme piquant ou durable; ou un goût (Peter, 2001). En effet, plusieurs épices végétales sont largement utilisées dans la nutrition humaine y compris le curcuma, la cannelle, le poivron rouge, le poivre noir, le cumin et la menthe séchée. Ces épices sont également utilisées comme arômes pour ajouter de la couleur et du goût aux aliments, ainsi que pour leurs nombreux avantages dans le domaine de la santé (Behnaz, 2017). En revanche, souvent le consommateur préfère un mélange d'épices appelé *Raç Elhanut* "essence" du magasin. Il est composé de plusieurs épices selon les besoins (Gast, 2017).

Dans la plupart des cas, les épices sont souvent séchées et consommées dans un état traité mais complet (UNIDO et FAO, 2005).

Les épices sont stockées et maintenues dans des endroits secs pour maintenir leur qualité. En effet, leur qualité est affectée par le contact avec l'air et l'excès d'humidité qui augmente le risque de dommages microbiens (Baiba et al., 2017).

### **I. 1. 3. Classification des épices**

Les épices peuvent être classées selon leurs propriétés taxonomiques et/ou sensorielles. Comme montre le tableau 01, selon les propriétés taxonomiques, la classification commune des épices remonte à celle qui appartient aux plantes à noyau unique telles que l'ail, le curcuma ou les plantes dicotylédones, telles que la cannelle et le paprika (Jessica et al., 2015).

Quant à la classification sensorielle des épices, elles sont classées en fonction de leurs caractéristiques aromatiques et de leur goût (Jessica et al.,2015). En effet, comme montre le tableau 02, elles peuvent être classées sur le degré de goût :

- épices chaudes;
- épices douces;
- épices et herbes aromatiques.

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

Tableau 01 : Classification taxonomique des épices (Peter, 2001).

Devison	Groupe		Ordre	Famille	Exemple	
Angiospermae	dicotyledonea	sympetala		Solanaceae	Chili; paprika; poivron rouge	
				Pedaliaceae	Sésame	
			Campalunatae	Compositae	camomille, chicorée, estragon	
			archichlamydaea	Piperales	Piperaceae	cube, poivre en rondins
		ranales		Myristiceae	macis, noix de muscade	
				Lauracaceae	feuille de laurier, cassia, cannelle	
				Magnoliaceae	anis étoilé	
		rhoeadales		Cruciferae	wasabi, moutarde	
		myrtiflorae		Myrtaceae	girofle, quatre épices	
		umbelliflorae		Umberlliferae	Cumin,coriandre ,	
			Liliiflorae	Liliaceae	ail, oignon	
			Iridaceae	Safran		
			scitamineae	Zingibraceae	Gengembre,cardamone	
			Orchidales	Orchidaceae	Vanille	

Tableau 02 : Classification sensorielle des épices (Peter, 2001).

Classes	Epices
<b>Chaudes</b>	Capsicum (piments), poivre de Cayenne, poivrons noirs et blancs, gingembre, moutarde
<b>Douces</b>	Paprika, coriandre
<b>Herbes et épices Aromatiques</b>	Piment, cardamome, cassia, cannelle, clou de girofle, cumin, aneth, fenouil, fenugrec, macis et noix de muscade, Basilic, laurier, feuilles d'aneth,

L'association européenne des épices a établi une liste de plus de 80 types des épices et des herbes culinaires fréquemment commercialisées en Europe (Hendrik, 2017). Cette liste n'est pas exhaustive, et peuvent être élargie selon les pays et les continents ainsi que selon les habitudes culinaires.

#### I. 1. 4. Variétés des épices et leurs utilisations

Les épices et les herbes sont utilisés depuis longtemps non seulement comme arômes des aliments, mais aussi comme produits de cosmétiques (ex. le curcuma) (Julia, 2016) et parfums Opium d'Yves Saint Laurent (1977), parfum oriental envoûté par le clou de girofle et la noix de muscade (Giron, 2013). Les épices ont été également utilisées à des fins médicales, comme indiqué par les anciens écrits grecs et chinois (Mckee, 1994).

A titre d'exemple, l'Egypte ancienne utilisait les épices comme premier remède naturel de l'histoire, ex. les clous de girofle pour l'embaumement (Claire et Floriane, 2017). Par ailleurs les Romaine sont les premiers à les utiliser en cuisine pour améliorer le goût. En plus, ils ont découvert certains de ses bienfaits thérapeutiques suite à la consommation régulière de ces épices qui empêcherait l'apparition de certaines maladies (Claire et Floriane, 2017).

En plus de leurs importances thérapeutiques, cosmétiques et culinaires, ils ont également des propriétés antioxydants, Ce sont surtout des phénols et polyphénols (Hubert, 2004). Il nous aide à lutter contre le vieillissement de nos cellules (Fernandes, 2016). Les tableaux 3a, b et c, montrent les différentes utilisations des épices (Peter, 2004).

Tableau 03a : variété des épices et leurs utilisation (Raghavan,2007; Bpooygak,2011;Bruneton,1999; Le Coquil, 2017; LUCBOR, 2016; CODEX ALIMENTAIRE, 2015)

Epices et herbes	Forme d'utilisation	Description	Origine	Propriété chimique	Utilisation et intérêt
<b>Anis vert</b>	Graine	un goût sucré de réglisse et est chaleureuse, fruitée etcamphoraceous. Ses feuilles sont également aromatiques.	Grèce, Egypte, Crète, Turquie Liban. Mexique	1,5% à 6% huile essentielle, trans-anéthole (80%), méthyl chavicol, iso-anéthole (2%) Elle contient 8% à 20% d'huile fixe.	les Romains utilisaient l'anis pour parfumer un gâteau spécial appelé Mustaceum, le sirop contre la toux, calmer les piqûres d'insectes mâché pour aider à dormir.
<b>Badiane (anis étoilé)</b>	arbuste vert feuilles fleurs fruits	Il se compose de 6 à 8 ampoules brun rougeâtre disposées en étoile	Chine du Sud Vietnam du Nord	3 à 8% d'HE • 85 à 95% de trans-anéthol accompagné d'estragol • 1,4-cinéole 8.5% d'Acide shikimique dans les carpelles -Sesquiterpènes laconiques convulsivants,	condiment .elle inhibe la fermentation intestinale.L'anis étoilé a des propriétés anti diarrhéiques, entre dans la chaîne de fabrication de l'acide shikimique utilisé contre le virus de la grippe.
<b>Cannelle</b>	écorce séchés	obtenir de petites bobines ou des bâtons de cannelle.	Inde occidentale Sri Lanka	cinnamaldéhyde; *eugénol *coumarine *alcool cinnamylique ; * benzoate de benzyle.	sucreries tonique pour le cœur et les voies respiratoires.soulager le rhume et contre la diarrhée

**Tableau 2b** : (suite...) (Ait Braham et Messaoudi, 2013; Hombourger,2010; Peter, 2004; Escartin et Lacoste,2010; Peter,2011; Frédérique et al ,2009)

Curcuma	herbe vivace à grandes feuilles Engainantes elliptiques rhizome séché	Saveur douce	Sud de l'Asie. l'océan Indien Madagascar l'Inde	sesquiterpène, zingibérène et ses dérivés cétoniques : la turmérone et l'ar-turmérone (déhydroturmérone)	maintenir la saveur et la valeur nutritive. anti-inflammatoire et stimulant. tissu alimentaire et de teinture activité anticancéreuse est utilisé sous forme de masque pour blanchir la peau.
Cumin	graines Cuminum cyminum L. de la famille des Apiaceae	Saveur forte, chaude, lourde et poivrée, légèrement amère	Moyen Orient Egypte.	d'huile volatile huile dure, l'aloé vera tannique , de la gomme composés protéiques	assaisonnement classique stimulants, inhalants, diurétiques, anticonvulsivants ou anti- diarrhéiques
Coriandre	feuilles fraîches s'utilisent en assaisonnement famille des Apiacées	Saveur fraîche et douce	Europe du Sud-Est Asie Grecs Romains de l'Antiquité	de protéines matières grasses, de glucides minéraux.	assaisonner les plats
Fenugrec	Graines	Les feuilles se composent de trois folioles ovales Fleurs jaunes blanches Les fruits en forme de cornes contiennent 10 à 20 graines appelé aussi « <i>Trigonella foenum- graecum L</i> »	La Syrie sud de la Turquie Iran Irak, centre méditerranéen comprenant l'Espagne, le Maroc et la Turquie	alcaloïdes (trigonelline gentianine, choline), salicylés, des polyphenols (flavonoïdes) fibres mucilagineuses : saponines, protéines : vitamines A, B1, C,	sublimation du kari.  Un effet apaisant sur la peau et les muqueuses, soulage les irritations de la peau désinfectantes

**Tableau 3c** :(suite...)(Annou Gh,2018 ;LUCBOR. 2016; Ajaikumar et al,2009; Raghavan Sh.2007; Palomares, 2015)

Gingembre	Racines	Le gingembre est obtenu à partir des racines du gingembre, une plante tropicale vivace de la famille des Zingibéracées.	Inde	<b>Zingibérène :</b> camphène betaphallandrène <b>:Monoterpènes</b> béta-phellandrène	stimulant, un cholagogue et un antiémétique. condiment
Quatre-épices « allspices »	Mélange de différents parties de la plante	La combinaison de différentes épices qui sont propres, saines et sèches	Mélangé en France		traitement des flatulences, de la diarrhée et pour le traitement des arrêts cardiaques, des tensions, des douleurs nerveuses et du stress
Poivron noir	Graines	Le poivre noir est obtenu à partir des fruits naturels de Piper nigrum L., a feuilles persistantes. Leur gout est Acre et piquant	Inde	protéines, lipide totale, carbohydrate, fibre, Ca++, vitamine A, d'acides gras saturés d'acides gras insaturés	l'assaisonnement (odeur et de son goût piquant.  antihypertenseur et anti-inflammatoire.  contre la morsure de l'épilepsie et des serpents
Paprika	Fruits	le paprika appartient à la famille des Solanacées .doux, piquant ou demi-doux, de couleur orange ou rouge	d'Amérique centrale	d'huile essentielle, caroténoïdes capsanthine capsorbine, d'alpha et de bêtacarotène, zéaxanthine,	aliments pour son goût et sa couleur prévenir Rhumes,grippe et problèmes circulatoires
Safran	Fleurs	Le crocus à safran est une plante à bulbe de 10 à 30 cm de haut	Iran Maroc, Espagne, l'Inde (Cachemire)	d'huile essentielle, aldéhydes, terpènes l'isophorone. 2,2,6-triméthyl-4,6-cyclohexidienal	Le safran contenu dans le safran agit comme analgésique sur le système nerveux.et utilisé réduire les douleurs au niveau des gencives et menstruelles.

### **I. 1. 5. Transformation des épices**

Azam (2008), a décrit la transformation des épices dans son livre « Small-Scale Spice Processing, ». Elle consiste à plusieurs étapes :

#### **Etape 1 : Récolte du végétal**

La récolte des épices après sa maturation (développement des composés aromatiques), est très importante pour avoir des épices de bonne qualité.

#### **Etape 2 : Nettoyage**

Les cultures d'épices sont souvent polluées par la poussière et la saleté. Donc, le nettoyage est nécessaire avant le traitement qui commence par l'élimination de la poussière par tamisage. Ensuite, le végétal récolté est lavé à l'eau claire et potable pour éviter la re-contamination des épices. Le lavage doit être rapide pour ne pas faire tremper les épices dans l'eau car cela réduirait la qualité.

#### **Etape 3 : Séchage du végétal**

C'est l'étape la plus importante du traitement qui garantit des épices de bonne qualité. En plus, le séchage aboutit à la diminution d'activité d'eau qui empêche la prolifération de bactéries et limite la croissance des moisissures et des bactéries de formes sporulées malgré ne nie pas leur présence.

#### **Etape4 : Broyage des épices**

Les épices peuvent être vendues entières ou en poudre. Le broyage peut ajouter de la valeur au produit, mais elle peut également affecter la qualité du produit. Il n'y a pas de moyen facile de déterminer si les épices assaisonnées sont pures ou adultérées. En général, les épices assaisonnées sont préparées en broyant à l'aide de broyeur.

#### **Etape 5 : Emballage et stockage**

Ensuite, l'épice doit être remplie rapidement dans des sacs en polypropylène épais et propres pour éviter l'accumulation d'humidité. Les épices doivent être refroidies avant de remplir les sacs et entreposées à l'abri de la lumière directe du soleil.

Les exigences d'emballage dépendent :

- du type d'épice ;
- qu'il soit moulu ou intact ;
- de l'humidité de stockage.

### I. 1. 6. Origine de contamination des épices

Les épices font partie de produits alimentaires les plus contaminés contenant principalement des champignons toxiques et des toxines fongiques, en particulier des champignons fongiques et des aflatoxines (El mahgubi et *al.*, 2013).

Par ailleurs, ce type de produits est très sensible à la contamination par l'aflatoxine en raison de conditions climatiques caractérisées par une température élevée et un stockage insuffisant. L'aflatoxine a été clairement identifiée comme toxique, mutagène, cancérogène (Azzoune et *al.*, 2015).

Les champignons sont les contaminants dominants dans les épices et la plupart de ces polluants peuvent être pris en compte en raison des processus de séchage et de stockage. Cependant, le sol et l'air restent la principale source de contamination des épices au champ (Mandeel, 2004).

La contamination bactérienne représente un risque énorme, en particulier lors de l'ajout d'épices à un aliment sans conservation ultérieure, car le nombre de bactéries peut augmenter de manière significative jusqu'à la consommation. En outre, les bactéries de la bourrache peuvent endommager les aliments en conserve et les produits de viande transformés (Schweiggert et *al.*, 2004).

Conformément aux normes Algériennes, elles recommandent la recherche d'*E. coli* (M=3log ufc/g), Sulfite réducteur (M= 4log ufc/g), levures et moisissures (M= 5log ufc/g) Staphylococcus à coagulase positive (M= 3log ufc/g), *B. cereus* (M= 4 log ufc/g) et Salmonella (absence) (JORAD N°39 de 2017). M : c'est le seuil d'acceptabilité de produits.

### I. 1. 7. Décontamination des épices

D'une façon générale, la qualité microbiologique des épices et des herbes reflète souvent l'état hygiénique de la zone de production et de transformation. Les épices sont sujettes à la contamination bactérienne à différents stades, tels que de nombreux autres produits agricoles, en raison d'agents pathogènes comme : *B. cereus*, *C. perfringens* et *Salmonella spp.* Par conséquent, diverses procédures ont été utilisées pour stériliser ou réduire la charge microbiologique de manière significative (Kneifel et Berger, 1993).



Les méthodes de décontamination les plus couramment utilisées sont la fumigation d'oxyde d'éthylène. Avec cette méthode, la plupart ou la totalité des microorganismes contenus dans les épices peuvent être éliminés. L'oxyde d'éthylène peut réagir avec l'eau pour donner de l'éthylène glycol. Les niveaux de résidus de ces composés dans les épices peuvent varier fortement en fonction des conditions de fumigation, de la nature des épices, de la quantité d'humidité, de la ventilation, de la température, ...etc. (Boer, 1983).

Cependant, cette méthode présente de nombreux inconvénients liés au détriment de la qualité sensorielle et aux difficultés d'éliminer les résidus toxiques. La radiation est une moyenne appropriée à la décontamination des épices. La désinfection par rayonnement gamma est très affirmative en raison de sa grande capacité à perturber les microorganismes infectieux, sans perte de qualité de la saveur (Juri et *al.*, 1986 ; Alam et *al.*,1992).

### **I. 1. 8. Propriétés des épices**

#### **I. 1. 8. 1. Activité antimicrobienne des épices**

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

A titre d'exemple, l'épice japonaise connue sous le nom de **Japonica wasabi**, traditionnellement utilisée dans la consommation de poisson cru, telle que le sushi au Japon (Yano et *al.*,2006). Les épices sont connues pour avoir un effet antimicrobien contre de nombreuses bactéries, y compris *V. parahaemolyticus*, contribuent également à la sécurité de la consommation de produits de la mer crus (Yano et *al.*,2006).

#### **I. 1. 8. 2. Activité antioxydant des épices**

Les épices ou les produits végétaux aromatiques sont utilisés dans les aliments et les sauces cuits ou semi-cuits. Les principes des épices tels que la curcumine et la cassinine inhibent l'oxydation des huiles et des graisses. Les principes efficaces des épices tels que l'eugénol (clou de girofle), le linalinol (coriandre), la biparine (poivre noir), le zingers

(gingembre) (Shobana et Naidu, 2000) et le quinaldéhyde (cumin) ont été rapportés pour inhiber la peroxydation des lipides. Les épices sont généralement ajoutées comme agents d'assaisonnement pour les préparations alimentaires (Shobana et Naidu, 2000).

### I. 1. 9. Toxicité des épices

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

Par contre, il est soupçonné que les épices et leurs huiles essentielles jouent un rôle dans l'induction du cancer plusieurs fois. Cette incertitude dépend en partie du grand nombre de composés "exotiques" présents dans les épices et les arômes (Buchanan, 1979). Les composés à base de plantes et les épices sont bien connus, les composés présents naturellement dans les épices et les doses d'utilisation les plus toxiques sont également limitées (Kneifel et Berger, 1993). Le tableau 04, expose quelques composés toxiques et leurs effets.

Tableau 04 : Composés toxiques des épices et leurs effets (Kneifel et Berger, 1993).

Plantes	Composés	Effet
Anis vert, badiane, fenouil	(Z)-anéthole	Neurotoxique
Persil	Apiole	Psychotrope
Acore	Asarones	Cancérogène
Citrus (Bergamote)	Bergaptène	Mutagène
Piment	Capsaïcine	Inflammation
Laurier, eucalyptus	1,8-cinéole	Brûlure (gorge)
Cannelle	Cinnamaldéhyde	Allergie
Aneth	Dillapiole	Psychotrope
Basilic, cerfeuil, estragon	Estragole	Hépatotoxique

### **I. 2. 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*.

De 1947 à 1949, Steinar Hauge en Norvège enquêta sur quatre cas de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) affectant environ 600 personnes. Le véhicule alimentaire était une sauce à la vanille préparée à partir d'amidon de maïs riche en spores de *Bacillus cereus*.

#### **I. 2. 1. Principaux caractères de *B. cereus***

##### **I. 2. 1. 1. Caractères morphologiques**

Le genre-espèce de *Bacillus cereus* est affecté aux cellules bactériennes aérobies ou aëronaérobies facultatives de forme bacillaire à Gram positive (Drobniowski, 1993). Il est mobile grâce à une ciliature péritriche (Drobniowski, 1993). La cellule végétative mesure de 3 à 5 µm de long pour un diamètre de 1 à 2 µm (Gaillard, 2003). Elle donne des spores non déformantes d'une taille de 0,2 à 2 µm, centrales ou paracentrales (Sutra *et al.*, 1998), thermorésistantes et acido-résistantes (Wijnands *et al.*, 2007).

##### **I. 2. 1. 2. Caractères physiologiques**

Les cellules végétatives de *B. cereus* peuvent croître entre 5 et 55°C avec une température optimale entre 30 et 37°C (Andersson, 1995). Leur temps de génération est court entre 18 et 27 min (Johnson *et al.*, 1982). Elles peuvent se croître à des basses températures (3°C) (Drobniowski, 1993).

##### **I. 2. 1. 3. Caractères biochimiques**

Les cellules de *Bacillus cereus* produisent la lécithinase et le catalase, mais pas l'oxydase. Elles produisent une hémolyse de type β sur gélose à base de sang (Sutra *et al.*, 1998), fermentent le glucose, réduisent les nitrates, Voges- Proskauer (+), et hydrolysent la Gélatine (Zwietring *et al.*, 1996 ; Notermans *et al.*, 1997).

**I. 2. 2. *Bacillus cereus* et espèces proches**

L'analyse des gènes 16S rRNA montre que les genres espèces *B. cereus*, *B. thuringiensis* et *B. mycoides* sont plus proche (Bouali waffa,2017). Le tableau 05 regroupe les principales caractéristiques bactériologiques permettant de différencier entre ces espèces. Ces deux espèces de *B. cereus* et *B. anthracis* sont génétiquement très similaires par rapport aux autres populations de *Bacillus*(Vilas-Boas et al., 2002).

En plus, *Bacillus anthracis* se distingue par son immobilité, l'absence d'hémolyse sur gélose au sang de mouton, la lyse par le phage gamma et la formation de colonies non-rhizoïdes. Les espèces *Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycoides* sont aussi immobiles, faiblement hémolytiques sur gélose au sang de mouton et sont caractérisées par l'aspect rhizoïde de leurs colonies.

Tableau 05 : Principaux caractères bactériologiques permettant de différencier les espèces du "groupe *Bacillus cereus*" (Carlin et Nguyen-the, 1998 ;Denis et al., 2007).

	<i>B. cereus</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B.thuringiensis</i>	<i>B. mycoides</i>
<b>Chainette</b>	+	+	+	+
<b>Mobilité</b>	+	-	+	-
<b>Culture en anaérobiose</b>	+	+	+	+
<b>Lécithinase</b>	+	+	+	+
<b>Hémolyse sang de mouton</b>	+	-	+	-
<b>Sensibilité à la pénicilline</b>	-	+	-	-
<b>Réduction des nitrates</b>	Variable	+	+	+
<b>Forme des colonies</b>			Identique à <i>B. cereus</i>	Avec rhizoïdes
<b>Cristal parasporal</b>	-	-	+	-

### **I. 2. 3. Classification de *B. cereus***

Selon Bergey (1995), *B. cereus* appartient à la famille de bacillaceae comme suite :

Règne : *Bacteria*

Division : *Firmicutes*

Classe : *Bacilli*

Ordre : *Bacillales*

Famille : *Bacillaceae*

Genre : *Bacillus*

Espèce : *Bacillus cereus*

Selon Guinebertière et *al.* (2008), *B. cereus sensu lato* a été récemment subdivisé en sept groupes génétiques. Cette affiliation est basée sur le séquençage de gène *panC*. Elle permet de regrouper les différentes espèces selon leurs caractéristiques écologiques (température de croissance et thermo-résistance) (Tableau 06).

Tableau 06 : Caractéristiques physiologiques de croissance et de thermorésistance de différents groupe de *B. cereus* (Cadel et *al.*, 2012).

<b>Groupes</b>	<b>Températures de croissance (°C)</b>	<b>Thermo résistance</b>	<b>Association avec des TIAC</b>
<b>I</b>	10-43	Non renseigné	-
<b>II</b>	7-40	++	+
<b>III</b>	15-45	+++	+++
<b>V</b>	10-40	++	+
<b>IV</b>	10-45	++	++
<b>VI</b>	5-37	+/-	-
<b>VII</b>	20-50 °C	+++	+++

### I. 2. 4. Structure de spores de *B. cereus*

Les bactéries appartenant aux genres *B. cereus* sont capables de former des spores qui sont une forme de résistance et de dormance (Kennedy et al. 1994).

Comme montre la figure 01, la structure des spores de *B. cereus* se constitue de plusieurs couches. La disposition de couches est décrite comme suite :

#### **a) Cœur ou corps sporal (core : Cr)**

Le cœur de la spore renferme le patrimoine génétique et les outils de la synthèse protéique. Il est très fortement déshydraté (sa teneur en eau n'excède pas 15 à 20 %) (Gaillard, 2003).

#### **b) Membrane interne (Inner Forespore Membrane : IM ou IFM)**

C'est une membrane en double couche classique qui deviendra la membrane cellulaire de la forme végétative (Gaillard, 2003).

#### **c) Paroi porale (Primordial Germ Cell Wall: PCW ou PGCW)**

Cette paroi contient du peptidoglycane qui deviendra, après germination de la spore, la paroi de la cellule végétative (Meyer *et al.*, 2004).

#### **d) Cortex (ctx ou Cx)**

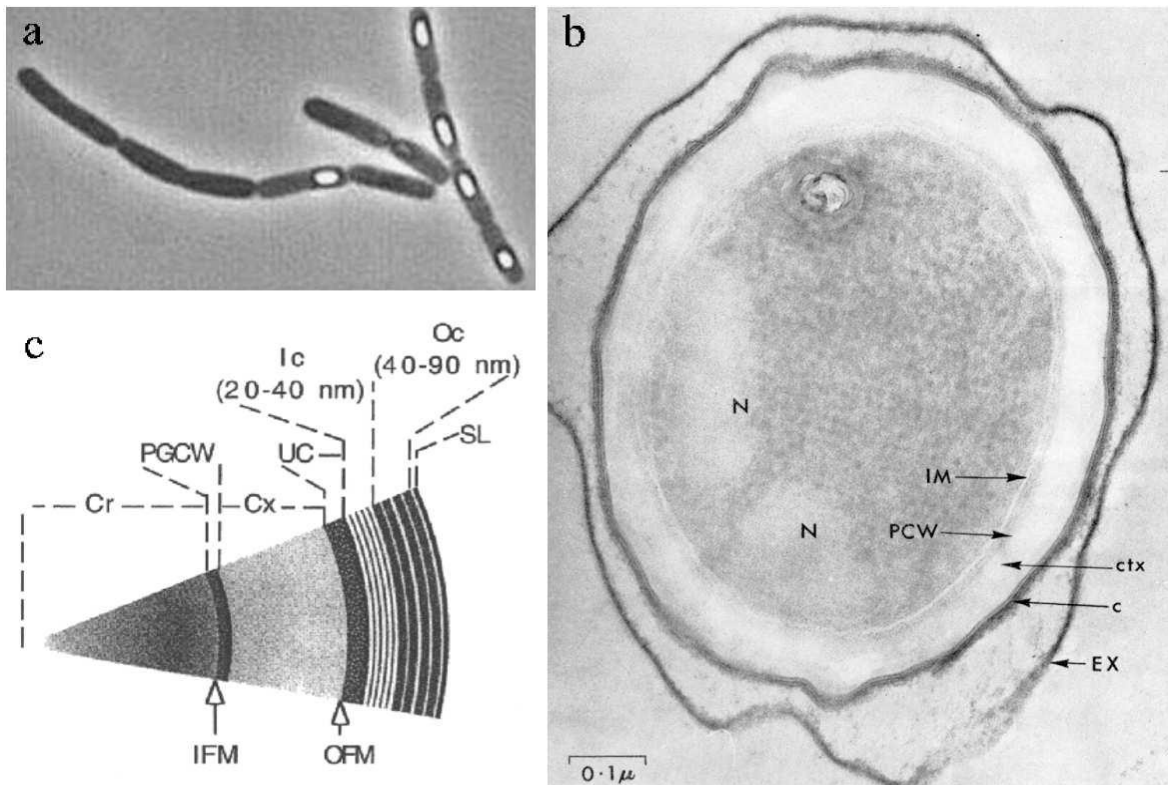
C'est une couche épaisse d'aspect monomorphe, qui représente 10 à 20 % de la spore (Gaillard, 2003). Il est très sensible au lysozyme. Il contient une forte proportion de dipicolinate de calcium (Meyer *et al.*, 2004). L'autolyse de cortex constitue une étape déterminante de la germination (Couvert, 2002).

#### **e) Tuniques interne (Ic et externe Oc (« coats », c, UC,])**

Elles représentent 20 à 35 % de spore (Gaillard, 2003). Elles sont composées de kératine riche en liaisons disulfures (Couvert, 2002). Elles sont imperméables et responsables de la résistance aux agents chimiques (Meyer *et al.*, 2004).

#### **f) Exosporium (SL)**

C'est une membrane externe de nature lipoprotéinique (Gaillard, 2003). Elle contient 20 % de sucres (Couvert, 2002).



**Figure 01**

(a) photographie en microscopie de *Bacillus cereus* en phase stationnaire de croissance ; (b) photographie en microscopie électronique d'une spore de *Bacillus cereus* (Gaillard, 2003) ; (c) schéma d'une coupe de spore de *Bacillus subtilis*(Gaillard, 2003).

(N) Nucléoïdes ; (Cr) cœur ou corps sporal, « core » ; (IM, IFM) membrane interne, « Inner Forespore Membrane » ; (PCW, PGCW) paroi sporale, « Primordial Germ Cell Wall » ; (CTX, Cx) Cortex ; (OFM) membrane externe, « Outer Forespore Membrane » ; (c) tunique, « coat » ; (UC) Sous-tuniqu, « Under Coat » ; (Ic) tunique interne, « Inner coat » ; (Oc) tunique externe, « Outer coat » ; (EX, SL) exosporium, « Surface Layer ».

### I. 2. 5. Mécanismes de sporulation des cellules végétatives de *B. cereus*

La spore bactérienne est une structure cellulaire multicouche dormante issue d'un processus appelé sporulation qui intervient lorsque certaines bactéries sont placées dans un environnement défavorable (Abbas, 2014). Elle prend naissance à l'intérieur même de la cellule végétative.

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).

Le processus consiste à :

### **Stade 1 :**

Ce stade est se caractérise par l'arrêt de la synthèse d'ADN, d'ARN (Prescott *et al.*, 2006). Le matériel nucléaire de la spore se dispose en bâtonnet axial (Meyer *et al.*, 2004).

### **Stade 2 :**

Après la séparation du bâtonnet axial, le septum est formé (par invagination de la membrane cellulaire) (Lambin et German, 1969).

### **Stade 3 :**

La *préspore* intra cytoplasmique est formée. Elle est entourée de 2 membranes et pourvue d'un noyau (Lambin et German, 1969).

### **Stade 4 :**

Il se caractérise par la formation du *cortex* et des protéines. C'est une structure à couches lamellaires imperméable aux colorants. Elle se produit entre les 2 feuillets limitant la préspore (Lambin et German, 1969).

### **Stade 5 :**

Ce stade est caractérisé par la formation des tuniques interne et externe (Lambin et German, 1969).

### **Stade 6 :**

Il se caractérise par une phase de déshydratation accompagnant la formation de picolinate de calcium (Lambin et German, 1969). La phase de déshydratation dure quelques heures (Lambin et German, 1969). La spore arrive à *maturité*.



### I. 2. 6. Germination des spores de *B. cereus*

Lorsque les conditions favorables reviennent, ces spores sont réactivables et peuvent revenir à un état végétatif via la germination : phénomène complexe et multifactoriel qui passe par deux phases :

- 1) proprement dit la spore perd sa thermorésistance, réhydratée et remet en fonction la machinerie de synthèse des acides nucléiques et protéine (Couvert, 2002) ;
- 2) émergence de la cellule de l'enveloppe de la spore et la croissance de la cellule jusqu'au stade de la première division. La germination non spontanée des spores exige l'apport de composé de faible poids moléculaire et plus ou moins spécifique de l'espèce et de la souche, tels que le glucose et certains acides aminés (comme la L-alanine) (Couvert, 2002).

### I. 2. 7. Pouvoir pathogène de *B. cereus*

Les affections attribuables à *B. cereus* sont couramment observées dans les régions où les aliments sont manipulés de façon inadéquate. Le *B. cereus* peut produire six types de toxines, à savoir cinq entérotoxines et une toxine émétique, qui peuvent être thermostables ou thermolabiles, selon les souches. Actuellement, trois entérotoxines (Hbl, Nhe et CytK) ont été décrites chez *Bacillus cereus* (Anses, 2011).

- entérotoxines Hbl (hémolysine BL) et Nhe (entérotoxine non hémolytique) sont chacune composées de trois protéines.
- cytotoxine K (CytK) existe sous deux formes, CytK1 et CytK2, la première étant plus cytotoxique que la seconde.

Cette bactérie est impliquée dans deux types de cas : syndrome diarrhéique et syndrome émétique (Anses, 2011).

- Les symptômes de la maladie diarrhéique commencent à se manifester 8 à 12 heures après avoir mangé *Bacillus cereus*, par ingestion de cellules ou de bactéries de *Bacillus cereus*, puis par la production de toxines gastro-intestinales. Les symptômes de cette maladie abdominale grave et de cette diarrhée sont similaires à ceux provoqués par *Clostridium perfringens*
- Pour les syndromes émétiques qui survient après 1 à 5 heures de consommation de la substance toxique le cèrèulide produite dans l'aliment au cours de la croissance de

*Bacillus cereus*, caractérisée par des symptômes de nausée et de vomissements similaires aux symptômes de *Staphylococcus aureus* chronique, et pouvant également être responsable d'empoisonnement du sang et d'inflammation de la plaie, de méningite, de pneumonie et de système nerveux Endocardite centrale, péricardite, infections respiratoires et infections périphériques

### **I. 2. 8. Thermorésistance de spores de *B. cereus***

Le phénomène de la thermorésistance est sensiblement lié à la fameuse structure de spores formées au moment de traitements thermiques.

#### **I. 2. 8. 1. Origine de la thermorésistance de spores de *Bacillus cereus***

D'après Prescott *et al.* (2006), la thermorésistance peut être attribuée à la présence de l'acide dipicolinique (DPA), absent chez les cellules végétatives. Il constitue près de 15 % du poids sec de la spore. Il se forme exclusivement au cours de la sporulation. Il se trouve en association avec les ions calcium. Il est responsable de la stabilité des composés comme l'ADN.

Aussi, l'acide N-succinyl-glutamique se produit dès les premiers stades de la sporulation. Il est également susceptible de jouer un rôle dans la thermorésistance (Meyer *et al.*, 2004).

En plus, la déshydratation des spores au cours de maturation constitue un des critères majeurs assurant la propriété de thermorésistance (Meyer *et al.*, 2004).

#### **I. 2. 8. 2. Paramètre de la thermorésistance de spores de *Bacillus cereus***

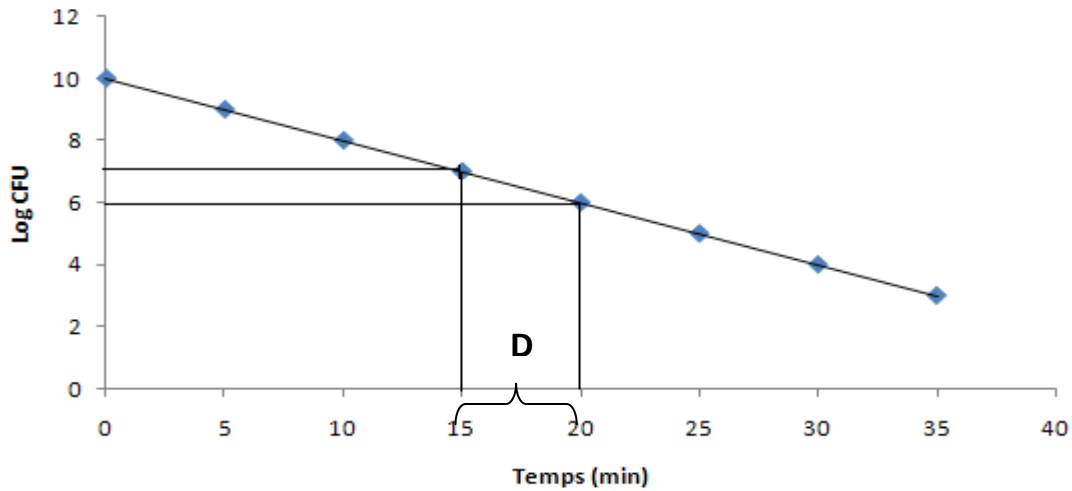
La thermorésistance d'une espèce microbienne est caractérisée par les deux paramètres complémentaires D et z.

##### *Temps de réduction décimale*

La thermorésistance de spores de *Bacillus cereus* est évaluée directement par la détermination de temps de réduction décimale (D). Par définition, le temps de réduction décimale est : le temps de chauffage nécessaire pour inactiver 90% des microorganismes revivifiables présents au début du traitement à une température T (Bonnefoy *et al.*, 2002).

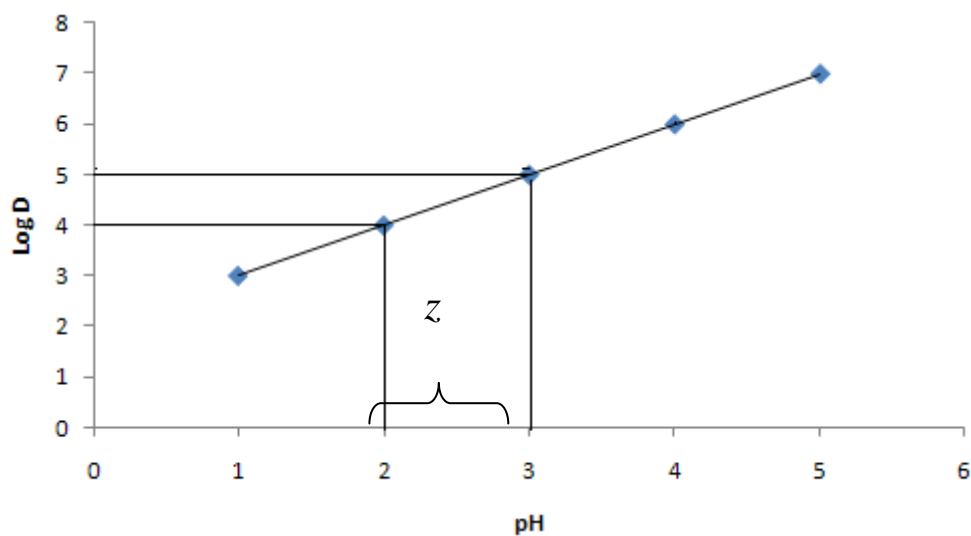
Comme montre la figure 02, la valeur de D est calculée à partir de traçage Log UFC en fonction du temps (t).

Par exemple pour atteindre un taux de réduction décimal de 6 signifie que l'on a réduit la population de survivants d'un facteur  $10^6$ .



**Figure 02**  
Cinétique de destruction thermique.

C'est l'écart de facteur étudié (exemple de température) pour réduire le temps de réduction décimale d'un facteur de 10 c'est-à-dire à 1/10 de sa valeur. Il est déterminé à partir du graphique Log D en fonction du T°C (Figure 03) (Prescott et *al.*, 2006).



**Figure 3**  
Calcul de la valeur  $z_{T^{\circ}C}$  (exemple établi pour la température).

## **Partie II**

### **EXPERIMENTALE**

## **II. 1. MATERIELS ET METHODES**

Cette partie expérimentale a été accomplie dans sa totalité au laboratoire pédagogique de microbiologie département SNV du centre universitaire d'Ain Témouchent.

### II .1.1. Echantillonnage et prélèvement des épices de la soupe

Les échantillons ont été prélevés directement auprès des foyers de différentes villes de la région d'Ain Témouchent. Au total, 11 foyers ont été sélectionnés d'une manière au hasard de l'ensemble des villes étudiées (Tableau 07).

Tableau 7 : Points de prélèvement des échantillons des épices utilisées pour assaisonner « Hrira ».

Epice Foyer	E1 bnf	E2 AT	E3 Hbh	E4 Hbh	E5 Sbd	E6 Eaek	E7 Mlh	E8 Atb	E9 Chbt	E10 AT	E11 Atb	Nombre d'échantillon
<b>Cannelle</b>	*			*			*	*				4
<b>Coriandre</b>			*									1
<b>Cumin</b>	*				*			*				3
<b>Curcuma</b>		*	*	*	*		*		*			8
<b>Gingembre</b>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	11
<b>Carvi</b>	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	10
<b>Poivron noir</b>	*	*	*	*	*	*		*		*	*	9
<b>Poivron rouge</b>	*	*	*	*	*					*	*	7
<b>Raç Hanut</b>		*			*	*		*			*	5
<b>Safran</b>			*		*	*		*				4
<b>Fenugrec</b>									*			1
<b>Cubèbe</b>						*						1

### II .1.2.Recherche, isolement et purification de *B.cereussensu lato*

La procédure utilisée pour la recherche et le dénombrement de *B. cereus sensu lato*, est celle préconisée par la norme AFNOR (1995).

#### Préparation des échantillons

Les cellules de *B. cereus* ont été isolées à partir des épices utilisées pour préparer la soupe dans la région d'Ain Témoüchent. Une quantité de 1g de chaque épice a été déposée dans 9 mL de l'eau peptonée (annexe 01). Ensuite, le mélange était apporté au bain marie à 80°C pendant 10min. Après traitement thermique une série des dilutions était réalisée, puis un volume de 500µL de chaque dilution était étalé sur milieu Mossel complet (annexe 01).

#### Incubation et isolement des colonies présumés

Après séchage des boites, les cultures étaient incubées à 30°C pendant 24h à 48h.

Les colonies présumées de *B. cereus sensu lato* sont celles :

- Rose : ne fermente pas le mannitol (mannitol-)
- Précipité entourées par un halo opaque qui indique l'hydrolyse de lécithine de jaune d'œuf par la lécithinase produit par cellules de *B.cereus*

#### Purification des isolats de *B. cereus sensu lato*

Les colonies présumées de *B. cereus sensu lato* étaient réensemencées par striés sur boites de Pétri contenu milieu nutritif gélosé (Annexe 01). Les cultures étaient incubées à 30°C pendant 24h

### II .1.3.Confirmation de l'authentification d'appartenance des isolats au groupe *B. cereus*

Après la sélection des isolats développés sur Mossel (résistance à la polymixine) et donnant un aspect rouge (absence de fermentation de mannitol) avec un halo opaque (production de lécithinase), d'autre tests complémentaires ont été réalisés à savoir la vérification de la mobilité, la recherche de catalase (annexe 02), la coloration de Gram (Annexe 02) et vert de malachite(annexe 02) et la recherche de l'hémolysine (AFNOR, 1995).

### II .1.4. Mise en évidence de l'hémolyse

Quant à la recherche de l'hémolysine, elle consiste à ensemencer par touche la gélose nutritive à 5% du sang de sang humain citraté. Ensuite, les cultures étaient incubées à 30°C pendant 24h.

Les colonies à hémolyse positive sont caractérisées par une zone de lyse claire.

### II. 1. 5. Vérification de la pureté des isolats de *B. cereus sensu lato*

Pour confirmer la pureté de la souche de *B. cereus* présumé, nous nous sommes basés sur l'observation macroscopique et microscopique des colonies après coloration de Gram.

### II .1. 6. Conservation des isolats de *B. cereus sensu lato*

Pour utilisation de routine, les isolats de *B. cereus sensu lato* ont été conservés en double sur milieu nutritif gélosé à 4°C.

Par ailleurs, pour conservation à long terme, les isolats ont été conservés sous forme des spores dans l'eau distillée à 4°C.

### II. 1. 7. Etude de la thermorésistance des isolats de *B. cereus sensu lato*

#### II .1. 7. 1. Production de spores de *B. cereus sensu lato*

La production des spores de *B. cereus* a été réalisée selon la procédure décrite par Ziane et *al.* (2014). Au total, 9 stocks ont été produits pour 9 isolats dont chacun était sélectionné au hasard d'une épice étudiée. La procédure consiste à :

#### Préparation de pré-cultures de *B. cereus sensu lato*

Des pré-cultures de *B. cereus sensu lato* étaient préparées à partir de 5 mL de bouillon cœur-cerveau (BHI) (annexe 01). Les pré-cultures étaient incubées à 30°C pendant 24h.

#### Production de spores de *B. cereus sensu lato*

Un volume de 1mL de la pré-culture était étalé sur la surface de milieu nutritif gélosé supplémenté par MnSO<sub>4</sub> et CaCl<sub>2</sub> à 40mg/l et à 100mg/l respectivement.

Ensuite, les boîtes ensemencées étaient incubées à 30°C pendant 5 jours. Cette période permet à la sporulation de 99% de la population bactérienne.



### Récolte et lavage 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 l'eau distillée stérile. La suspension des spores était ensuite lavée trois fois par l'eau distillée à 4000g pendant 20min. 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 20mn, puis lavé (culot) deux fois dans l'eau distillée. (Ziane et al.,2014)

### Calibrage de l'inoculum

La concentration des spores était déterminée par dénombrement en milieu nutritif gélosé après avoir activé par choc thermique. Un volume de 1mL de chaque dilution étaitensemencé sur milieu nutritif gélosé. Les pré-cultures étaient incubées à 30°C pendant 24h.(Ziane et al.,2014)

### Conservation des spores

Après dénombrement les stocks des spores ont été ajustés par l'eau distillée stérile à 8 log (ufc/mL). La suspension des spores était conservée dans l'eau distillée stériles à 4°C.

## **II .1.7.2. Traitement thermique des spores**

La thermorésistance des isolats était étudiée dans des tubes à essais. La méthode consiste à préparer une dilution de spores à 6 log (ufc/mL). Un volume de 10µL de stock de spores (8log) était dilué dans 10mLde milieu BHI. Ensuite, un volume de 1mL était réparti dans des tubes à essais puis apportés au bain marie à différentes températures (90°C, 95°C et 98°C).Les tubes à essai étaient retirés à chaque 10 mn puis on les prolongeait directement dans un bain glacé pendant 30 secondes. (Dufrenne et al.,1995).

### Dénombrement des bactéries après traitement thermique

Le contenu de tubes a été additionné à 9mL de L'eau peptonnée. Ensuite, des dilutions décimales successives étaient réalisées dans le même diluant.

Le dénombrement des cellules survivantes était effectué en milieu nutritif gélosé.. Un volume de 200µL de chaque dilution étaitensemencé en masse dans le milieu nutritif gélosé. L'incubation des boites a été réalisée à 37°C pendant 24h.

Expression des résultats de dénombrement en ufc/mL

Le dénombrement était effectué sur compteur de colonies ordinaire. Les résultats du dénombrement sont exprimés suivant la norme AFNOR, (1995) :

$$N(\text{ufc/mL}) = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0.1 n_2) d}$$

D'où :

$\sum C$  somme des colonies comptées sur une boîte retenue des dilutions effectuées ;

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

$n_1$  nombre des boîtes retenues à la première dilution;

$n_2$  nombre des boîtes retenues à la seconde dilution;

d facteur de dilution correspondant à la première dilution retenue.

**II .1.7.3.Détermination de paramètres de thermo-résistance de *B.cereus sensu lato***

Les paramètres de thermorésistance (notés  $D_{T^\circ C}$  et  $z_{T^\circ C}$ ) ont été déterminés après ajustement de modèle de l'équation 1 et 2.

Calcul du temps de réduction décimale ( $D_{T^\circ C}$ )

La valeur de  $D_{T^\circ C}$  était calculée après l'ajustement de modèle de Mafart et *al.* (2002) (équation 1). La valeur de  $D_{T^\circ C}$  représente également l'inverse négatif de la pente de la partie linéaire du courbe log N (de spores survivante) vs le temps de traitement :

$$\log N(\text{ufc} / \text{mL}) = \log N_0 - \left( \frac{t}{D_{T^\circ C}} \right)^p \tag{Eq. 01}$$

Calcul de  $z_{T^\circ C}$

La valeur de  $z_{T^\circ C}$  était estimée à l'aide de l'équation 2. Elle représente l'inverse ( $z=1/\text{pente}$ ) de la pente de la droite tracée de log  $D_{T^\circ C}$  en fonction de la température de traitement.

$$\log D_{T^\circ C} = \log D_{T^\circ C}^* - \left( \frac{T - T^*}{z_{T^\circ C}} \right) \tag{Eq. 02}$$

II .1.8. Schéma récapitulatif des manipes

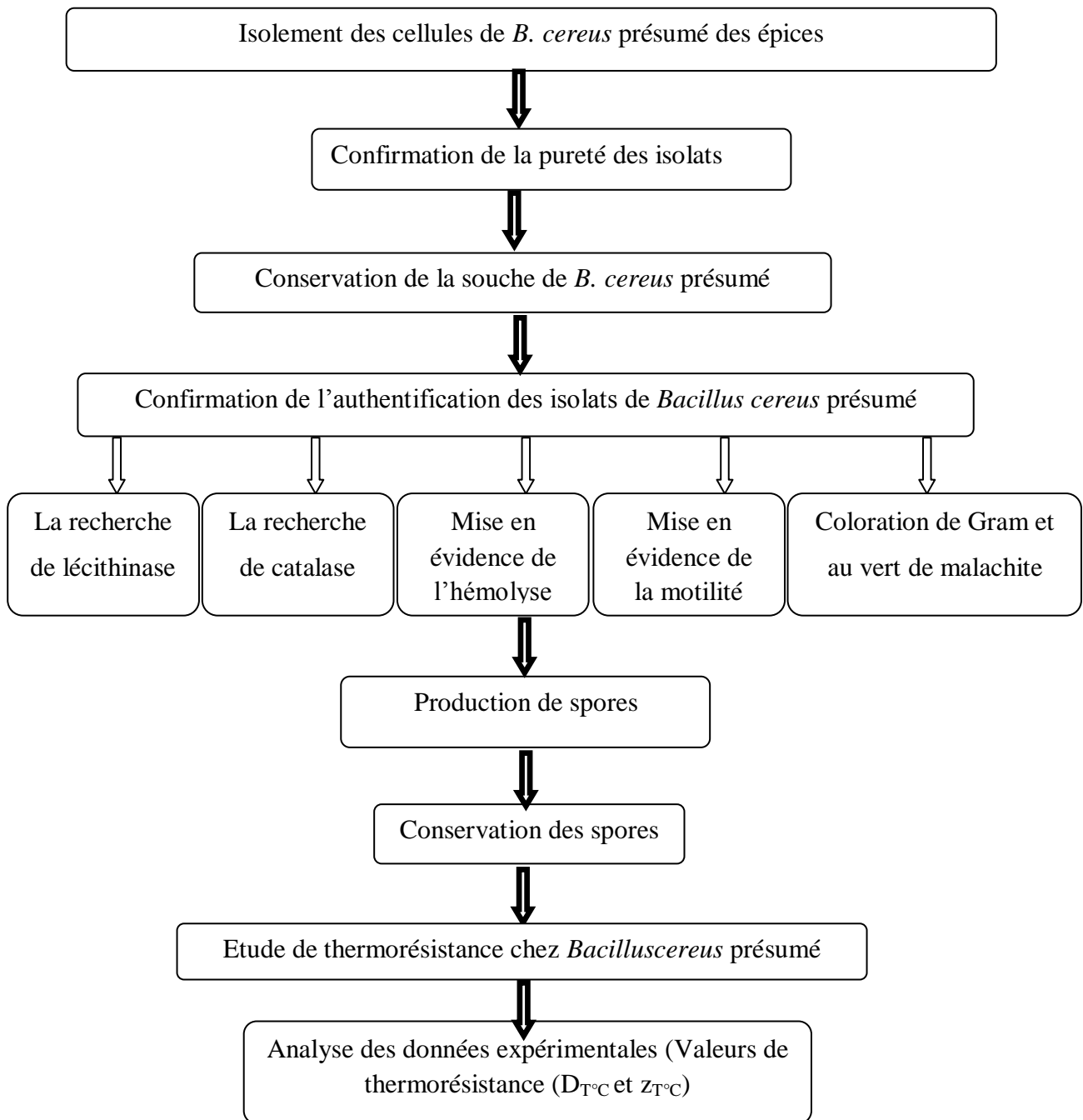


Figure 04 : Logigramme des manipes réalisées.

## **II. 2. RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### II. 2. Résultats et discussions

#### II. 2.1. Obtention des isolats de *B. cereus sensu lato*

Les isolats de *B. cereus sensu lato* étaient isolés à partir des épices utilisées pour la préparation de la soupe « Hrira » dans la région de Ain Témouchent.

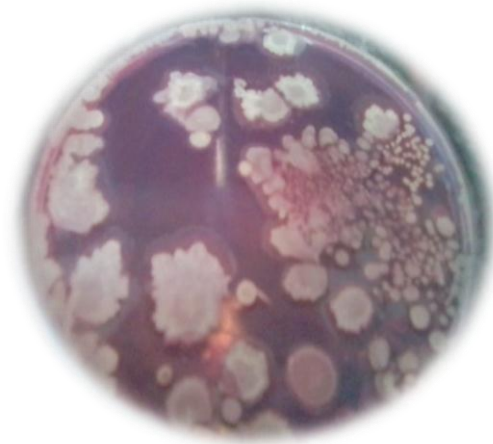
Les échantillons des épices étaient chauffés à 80°C pendant 10 min afin d'éliminer tous les cellules végétatives et thermosensibles.

Après ensemencement sur milieu Mossel à émulsion de jaune d'œuf puis incubation à 30°C/ 24h. Les colonies présumées de *B. cereus* sont de couleur rose (ne fermentent pas mannitol) et entourées par une zone opaque. Cette zone indique l'hydrolyse de la lécithine de jaune d'œuf suite à la production de la lécithinase par les cellules de *B. cereus* (Figure 06).

Ensuite la colonie est re-purifiée par étalement sur milieu nutritif gélosé (voire figure 2).

**Figure 05 :** l'isolat de *B. cereus sensu lato* sur gélose Mossel à émulsion de jaune d'œuf entourée par une zone claire.

Boite de dénombrement à partir de curcuma prélevé de Chabat

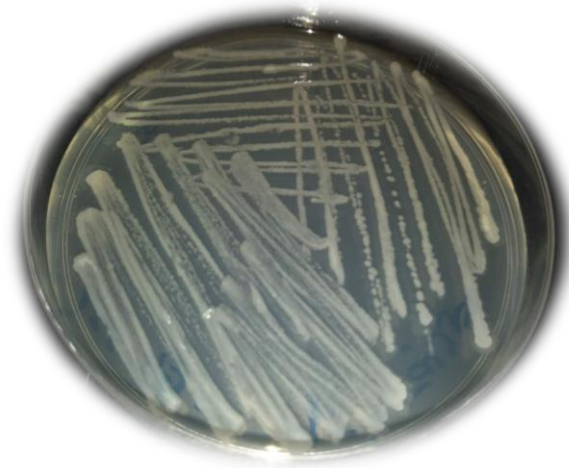


#### II. 2. 2. Test de confirmation de la pureté de la souche de *B.cereus sensu lato*

Comme montre la figure 06, la purification des isolats obtenus donnaient de colonies de *B.cereus sensu lato*. de même isolat sur milieu nutritif gélosé. Elles sont de grande taille granuleuse et d'autre ondulés.

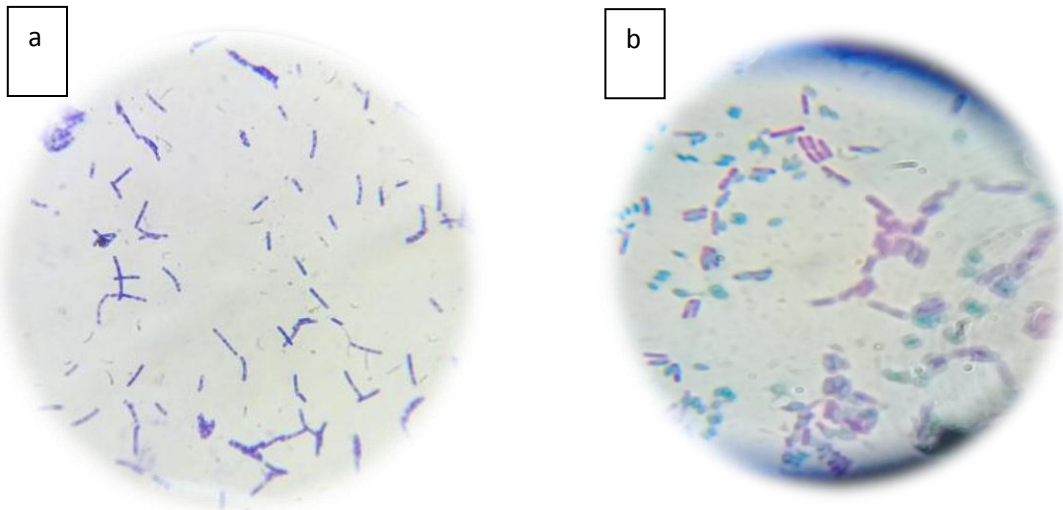
**Figure 06 :**

Culture pure sur milieu nutritif gélosé de l'isolat E3 *Bacillus cereus* obtenu à partir de Safran prélevé de Hamam Bouhdjar sensu lato.



Quant à l'observation microscopique, les cellules des isolats de *B. cereus sensu lato* sont des bacilles à Gram positif (Figure 07a), aux extrémités arrondies et renferment des spores centrales (non coloré) non déformante (Figure 07a et b) qui était confirmé par la coloration au vert de malachite (Figure 07b). Elles sont rassemblées en chaînette.

Les cultures pures des isolats de *B. cereus* étaient conservées en double sur gélose nutritive et sous forme de spores en eau distillée.



**Figure 07**

Observation microscopique de cellules de *Bacillus cereus* isolat E9 obtenu à partir de Safran prélevé de Hamam Bouhadjer (10x100). a) après coloration de Gram, b) après coloration au vert de malachite

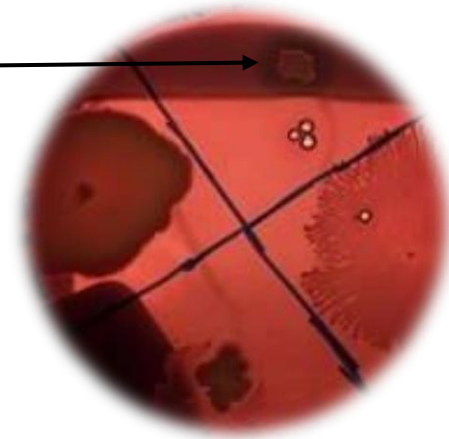
### II. 2. 3. Tests de confirmation de l'authentification

Les résultats de test de confirmation suivant la norme AFNOR (1996) montrent que les isolats de *B.cereus sensu lato* sont mobile, catalase positive et de l'hémolysine positive (figure 08). A cet effet, les isolats obtenus des épices appartiennent au groupe *B. cereus sensu lato*.

#### **Figure 08**

Culture de l'isolat carvi à partir de Sidi Benadda de *B. cereus*, ensemencée sur gélose au sang, entourée par une zone claire.

*Zone claire indique l'hydrolyse des hématies (présence d'hémolysine).*



### II. 2. 4. Production et conservation de spores de *B. cereus sensu lato*

La présence des cations de  $Ca^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  favorise le processus de formation de spores chez *Bacillus* (Hugo et Russell, 1998). La période de récolte de spores était déterminée par l'observation microscopique à l'état frais.

### II. 2. 5. Prévalence et dénombrement et de *B. cereus sensu lato* des épices de Hrira

#### II. 2. 5. 1. Prévalence de *B. cereus sensu lato* dans les échantillons analysés

Comme montre le tableau 08, la prévalence de *B. cereus sensu lato* est dépend de l'épice. En effet, les épices chaudes (21) semblaient les moins contaminés (80%) par rapport aux autres épices analysé. Cependant, tous les autres échantillons des épices douces (14) et aromatiques (18), analysés sont contaminés (100%). Cette variabilité de prévalence due probablement à la composition chimique des épices chaudes. En effet, d'après les travaux de

Sucheela (2007), les épices chaudes tels que le gingembre, le poivron rouge et poivron noir présentent tous une forte activité antimicrobienne. Selon le même auteur, cette activité est due à sa composition riche en composé bioactif à savoir aldéhydes, sulfure, terpènes et ses drivés, phénols et alcools.

Ces résultats de prévalence sont en concordance avec les résultats de Wolfgang Kneifel et Erika (1993) montré à 95% sur 160 échantillons (55 épices). Cependant, Aksu et al. (2000) montraient une faible prévalence (63% sur 93 échantillons de 11 épices) par rapport aux résultats de cette étude (96%).

Ces variations par rapport aux autres études, semblaient être dues aux conditions de cultures, de production et de transformation des épices. En effet, il est clair que, comme beaucoup d'autres produits agricoles, les épices sont exposées à la contamination bactérienne à différents stades (Kneifelet Berger, 1993).

**Tableau 08 :** Prévalence (%) et concentrations (log ufc/g) de *B. cereussensu lato* dans les épices utilisées pour l'assaisonnement de « Hrira » dans la région de Ain Témouchent.

Classification des épices	Epices	Nombre des échantillons	Prévalence (%)
Epices et les herbes aromatique	Cannelle	4	1
	Coriandre	1	1
	Curcuma	8	1
	Fenugrec	1	1
	Safran	4	1
Epices chaudes	Gingembre	11	0,91
	Poivron noir	3	0,89
	Poivron R	7	0,86
Epices douces	Carvi	10	0,9
	Cumin	3	1
	Cube	1	1
Toutes les épices (quatre épices)		5	1



En pratique, les consommateurs utilisent un mélange des épices étudiées pour préparer leur soupe « Hrira ». À cet effet, et malgré la non-contamination de certains échantillons analysés des épices chaudes (Gingembre, poivron noir et rouge), d'autres épices peuvent apporter de *B. cereus* sensu lato dans la préparation finale. Alors l'ensemble de consommateurs qui utilisent les épices sont susceptible de consommer les *B. cereus* mais à des concentrations variables.

### II. 2.5.2. Dénombrement de *B. cereus* sensu lato dans les échantillons analysés

Comme montre le tableau 09, les épices chaudes semblaient en moyenne les moins contaminées [2,6 log] par rapport aux autres épices aromatique [3,5 ufc/g] et douces [3,5 ufc/g].

Les résultats de dénombrement des épices chaudes sont en concordance avec les résultats (2.5 log) de Boar et *al.* (1983), cependant, Antai (1988) montrait une forte contamination [7 log ufc/g]. En revanche, Konuma et *al.* (1988) ont reporté une faible contamination [3log ufc/g].

Pour les résultats des épices douces, Al-jassir (1993) a reporté des concentrations [7log ufc/g] par rapport aux résultats de cette étude. Par contre, Pafumi (1975) montrait une faible contamination [1 log ufc/g].

Par ailleurs le dénombrement des épices aromatique semblait plus contaminé par rapport aux épices analysées [5log ufc/g] par Karapinar et Akutag (1988), cependant, Malmsten et *al.* (1991) montraient une forte contamination [6log ufc/g].

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

Tableau 09 : Concentrations (log ufc/g) de *B. cereus sensu lato* dans les épices utilisées pour la préparation de soupe « Hrira » dans la wilaya de Ain Témouchent.

Classification des épices	Epices	Nombre des échantillons	Concentration en log ufc/g		
			moyenne	intervalle	médian
<b>Epices et les herbes aromatique</b>	Cannelle	4	2,44	2 – 3,3	2
	Coriandre	1	45	//	4,11
	Curcuma	8	4	1-6	4,9
	Fenugrec	1	2,95	2,36-3	2,9
	Safran	4	3,89	2-5,9	3,8
<b>Epices chaudes</b>	Gingembre	11	2,44	0-4	2,3
	Poivron noir	3	2,86	0-5,4	3
	Poivron R	7	2,66	0-5,2	2,4
<b>Epices douces</b>	Carvi	10	2,55	0-5,1	2,6
	Cumin	3	3,73	3-4,6	3,6
	Cube	1	4	4-4	4
<b>Toutes les épices (quatre épices)</b>		5	3,59	2.48-5,2	3,6

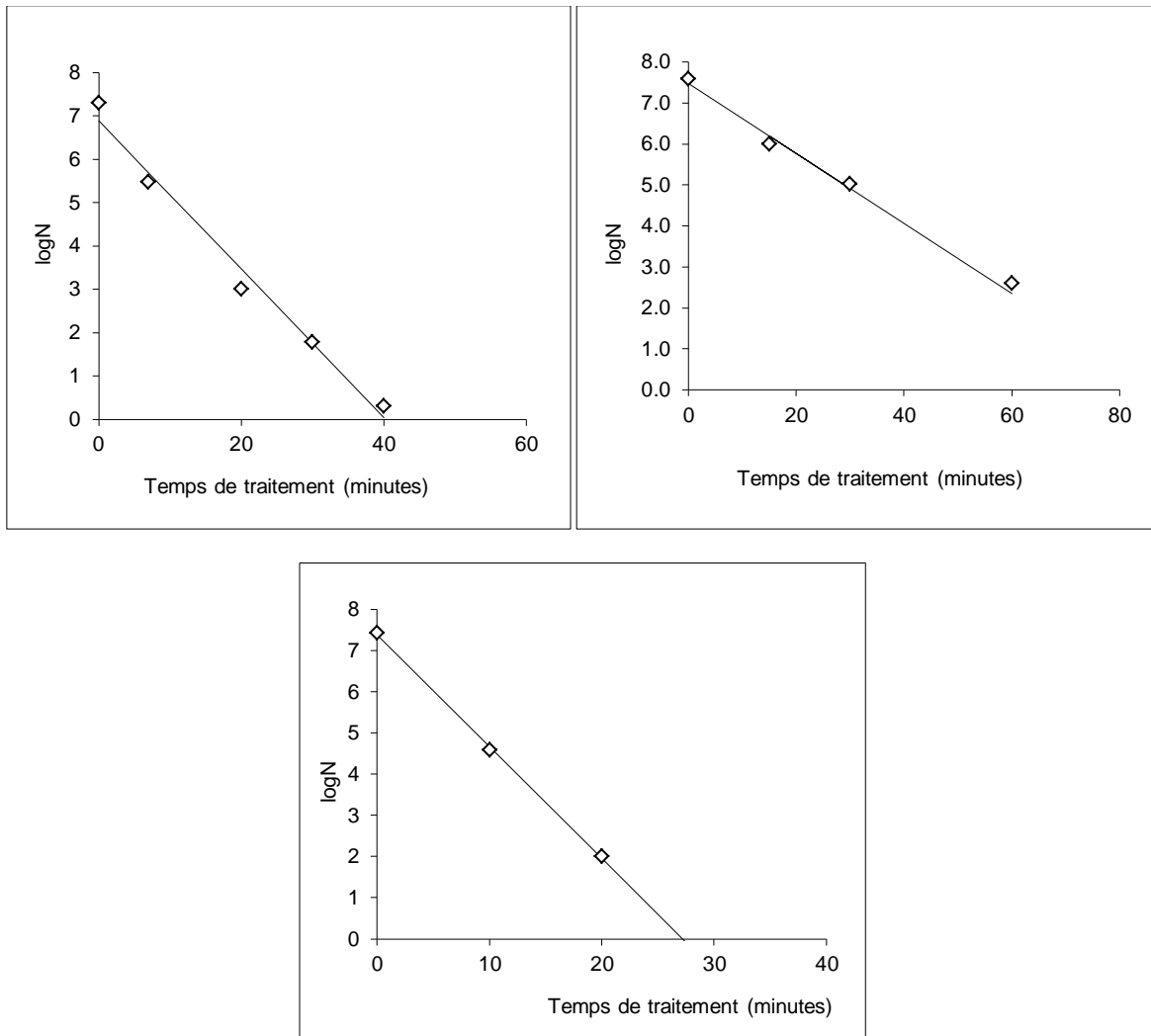
### II. 2. 6. Thermorésistance des isolats de *B. cereus sensu lato*

La suspension de spores de *B. cereus sensu lato* (E9, E10 et E11) a été étudiée à différentes températures de 90 à 98°C. Comme montre la figure 09, les cinétiques de destruction log ufc/mL de spores survivante en fonction du temps (minutes) de chauffage ont été ajustées par régression linéaire ( $p=1$ ) dont le coefficient de détermination  $R^2$  comprise entre 0,88 et 0,98. Les cinétiques de destruction montrent que la destruction est homogène pour l'ensemble de la population traitée. Ces résultats étaient conformément aux courbes observées par Cerf (1977) ; Geeraerd et al. (2000) ; Peleg et Cole (2000) ; Valdramidis et al. (2008).

Ces résultats sont en concordance avec les résultats de Ziane et al. (2014, 2016). En revanche, les mêmes auteurs ont montré des cinétiques non log linéaire :

- avec une courbature concave ( $P>1$ ) : se caractérise par activation (épaulement) des spores puis sa destruction ;
- et courbature convexe ( $P<1$ ) : se caractérise par une destruction rapide de la population microbienne puis un trainé. Cela est expliqué par la présence de deux

populations microbiennes dont une est plus thermorésistante, ou par la présence de forme végétative dans la suspension.



**Figure 09** : Cinétiques de destruction des isolats de *B.cereus sensu lato* (Souche E11).

Les temps de réduction décimale (valeur  $D_{T^{\circ}C}$ ) ont été estimés après ajustement des cinétiques. Les valeurs  $D_{T^{\circ}C}$  sont synthétisées dans le tableau 10.

Les résultats montrent une similitude de thermo-résistance des isolats à partir de même épices « gingembre » malgré sont issus de deux régions différentes. En effet, les valeurs de  $D_{90^{\circ}C}$  étaient de 21,63 et 21,42 minutes respectivement pour les isolats E9 et E11 obtenus à partir de gingembre. Par ailleurs, pour les  $D_{95^{\circ}C}$  sont comprises entre 6.23 et 11,7 minutes et pour  $D_{98^{\circ}C}$  entre 3,7 et 4.2 minutes. Ces valeurs de thermo-résistance étaient en concordance avec les résultats de Janstova et Lukasova (2001) et en discordance avec ceux de Montville et al. (2005).

Par ailleurs, l'isolat obtenu à partir de poivre rouge semblait moins résistante par rapport aux autres isolats de gingembre. D'après les résultats obtenus la thermo-résistance est liée à la matrice alimentaire, contrairement à l'étude effectuée par Ziane *et al.* (2014 ; 2016). Cette hypothèse reste à confirmer par l'expansion de nombre des isolats testés.

Tableau 10 : Paramètres de thermo-résistances de *B. cereus sensu lato* des épices commercialisées dans la région d'Ain Témouchent.

Température (°C)	D <sub>T°C</sub> (minutes)		
	Isolat E9	Isolat E10	Isolat E11
<b>D<sub>90°C</sub></b>	21,628	9.38	21.42
<b>D<sub>95°C</sub></b>	11,685	6.23	11.35
<b>D<sub>98°C</sub></b>	3,689	3.68	4.2
<b>P</b>	1,000	1,00	1,00
<b>z<sub>T°C</sub></b>	5,99	13.08	6.96
<b>Épices</b>	Gingembre	Poivre rouge	Gingembre
<b>Ville</b>	Chabat	Temouchent	Ain tolba

## **CONCLUSION**

La plupart des aliments cuits et même contenant des épices dans leurs composants de base sont susceptibles d'être contaminés par divers types de bactéries notamment sporulées résistante aux traitements de cuisson à *Bacillus cereus*.

Les objectifs de ce travail étaient de rechercher et énumérer les spores de *B. cereus sensu lato* dans les épices utilisées pour assaisonner la Hrira ainsi de évaluer leur thermorésistance.

Les résultats de cette recherche montraient que la contamination est dépend de type des épices. En effet, l'ensemble des échantillons des épices douces et aromatiques étaient contaminés tandis que les épices chaudes présentent une contamination de 86%.

Par ailleurs, les concentrations sont hétérogènes, les épices aromatiques et douces présentent des concentrations élevés par rapport aux épices chaudes.

Quant à la thermorésistance, elle semblait dépendante de l'isolat et non à la matrice analysée. En effet les deux isolats obtenus à partir de même type d'épice gingembre présentent une thermorésistance différentes. Cependant, ils ont la même sensibilité au traitement thermique.

Ce travail présente un intérêt dans la maîtrise de développement microbienne dans les aliments ainsi, est un outil à l'évaluation de l'exposition aux risques microbiologiques dans la Hrira. A cet effet, pour accomplir ce travail, il est nécessaire :

- d'élargir la zone d'étude et le nombre des échantillons analysés ;
- d'identifier au niveau moléculaire les isolats obtenus (séquençage de gène *panC*) ;
- d'approfondir l'étude de la thermorésistance des isolats ;
- d'étudier la croissance des isolats obtenus ;
- valider la thermorésistance et la croissance de *B.cereus* dans la matrice alimentaire « Hrira » ;
- de construire un modèle de l'évaluation d'exposition au *B.cereus* dans la soupe « Hrira » ;
- de communiquer les résultats de cette recherche avec les autorités compétentes.

## **REFERENCES BIBIOLIographiques**

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. Ait Braham K. et Messaoudi S. 2013. Etude de l'activité antioxydante des polyphénols des graines de *Trigonella foenum-graecum* L. (Fenugrec). mémoire de master : Université Abderrahmane Mira De Bejaïa. pp 91.
3. Ajaikumar B. Kunnumakkara., Koca C., Dey S., Gehlot P., Yodkeeree S., Danda D., Sung B. et Aggarwat B. 2009. Traditional Uses of Spices: An Overview. molecular targets and therapeutic uses of spices-Modern Uses for Ancient Medicine world Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. pp 25.
4. Aksu H., Bostan K. and Ergün Ö. 2000. Presence of *Bacillus cereus* in Packaged Some Spices and Herbs Sold in Istanbul. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 3.5. pp 710-712.
5. Alam M., Choudhury N. et Youssouf M. 1992. Decontamination of Spices By Gamma Radiation. *Letters In Applied Microbiology*. 14. pp 199-202.
6. Al-Jassir M. 1992. Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chemistry*. 45. pp 239-242.
7. Andersson, A. (1995) *Bacillus cereus*, strategy for survival. SIK-report 1995.
8. Annou Gh, 2018. Thèse de doctorat : activités biologiques des épices constitutives d'un mélange «Ras el hanout» utilisé par habitants d'Ouargla. université Kasdi Merbah Ouargla. pp 170.
9. Anses (agence nationale de sécurité sanitaire, alimentation, environnement, travail), 2011. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments/*Bacillus cereus*.
10. Antai S. 1988. Study of the *Bacillus* flora of Nigerian spices. *International Journal of Food Microbiology*. 6. pp 259-261.
11. Azzoune N., Mokrane S., Riba A., Boras N., Verhecke., Sabaou N. et Mathieu F. 2015. Contamination of common spices by Aflatoxigenic fungi and aflatoxin B1 in Algeria. *Quality assurance and safety of crops & food*. 8. pp 137-144.
12. Baiba F., Rita G., Olga V. et Aivas B. 2018. Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. *Food Control*. 83. 69-74.
13. Behnaz B., Mohammadreza P. 2017. Evaluating of Heavy Metal Contaminations in the Most Applicable Food Spices and Flavors in Hamedan, Iran. *Arch Hyg Sci*. 6(3), 268-275
14. Boar E., Spiegelberg W. et Janssens F. 1983. *Microbiology of spices and herbs*. Antonie Van Leeuwenhoek. 51. pp 435-43



15. Bonnefoy C., Guillet F., Leyral G. et Bourdais E V., 2002. Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Ed doin/crdp aquitaine. France : doin& CRDP. 250 p. : p 109-114.
16. Bouali waffa.,2017. Contribution à l'élaboration d'un soucier bactérien et caractérisation de la flore *Bacillus cereus* dans le Sud -Ouest Algérien. Thèse de doctorat option microbiologie. Université de Tlemcen, Algérie.pp149
17. BPOOYGAK .2011.Plantes de Kanchanaburi et de Thaïlan de Anis étoilé ou Badiane - *Illicumverum* .in bpooygak. *La Thaïlande Magazine Flore fruits légumes épices Herbes et épices de Thaïlande* .pp 4.
18. Brillhart M., Gysel M. and Emch F. 1986. Das Dampfsterilisieren von Gewürzen. *Food Sci. Technol.* 19.pp405-406.
19. Buchanan R.1979. Toxicity of Spices Containing Methylenedioxybenzene Derivatives. *Journal of Food Safety* .1.pp 275-293.
20. Cadel S.S., De Buyser M.L., Vignaud M.L., Dao T.T., Messio S., Pairaud S., Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation /Spécial Risques alimentaires collectives à *Bacillus cereus* : bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010.
21. Carlin F. et Nguyen-the C., 1998. *Bacillus cereus*. p. 163-181, in Sutra L., Federighi M., Jouve J L., Manuel de bactériologie alimentaire. éd. France : Polytechnica. 308 p.
22. Christelle H. 2010. la These de doctorat : Le Curcuma de l'épice au médicament. in université Henri Poincaré - Nancy, faculté de pharmacie. pp222.
23. Claire M., Floriane C.2017.livret d'hiver : les épices dans l'assiette .*Satim sante*.PP24.
24. Codex Alimentaire.2015. Code d'usages en matière d'hygiène pour les aliments à faible teneur en eau.FAO et OMS.pp 26.
25. Couvert O., 2002. Prise en compte de l'influence du pH dans l'optimisation des traitements thermiques. Thèse de doctorat. Université de Bleretagne occidentale. 182 p.
26. Denis F., Ploy M C., Martin C. et Bingtemps de geberation en E., .2007. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. 1<sup>er</sup> édition. France : Elsevier Masson. 573p.
27. Drobniowski F A., 1993. *Bacillus cereus* and Related Species. *Clinical microbiology reviews*. 6 (4), 324-338.
28. Dufrenne J.,Bijaward M .,Te Giffel M .,et Nnothermans R (1995).Charactersticosos some psychrotrophic B .cereus in int.J.OfMicrobiology. Vol.27,pp175-183.
29. Escartin I. et Lacoste C. 2010. Guide des épics et des aromates, par l'Institut Klorane,Fondation d'Entreprise pour la Protection et la Bonne Utilisation du Patrimoine Végétal. , ppt 52.

30. Fiche Technique Santé-Sécurité-évaluation-risques : Agents Pathogènes – *Bacillus cereus*, 2010. Agence de la santé publique du Canada.
31. Frédérique Ch., Céline G. et Marion S. 2009. le gingembre Des bienfaits prouvés. In Nancy-université Henri Poincaré. pp 41.
32. 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.142 p.
33. Gast M.2011.Épices et condiments. in Gabriel Camps (dir.), 17. Éditeur Peeters Publishers.pp 472-529.
34. Gerhardt, V. 1990. Kontamination der Gewürze. In Gewürze in der Lebensmittelindustrie. Behr's Verlag, Hamburg, Germany . pp 89-126.
35. Giron E.2013. Les épices dans la parfumerie.*Dandy magazine*.
36. Guezlane N., Bouras N .et Ould El Hadj M. 2016. Les mycotoxines: un danger de santé public. *Algerian journal of aridenvironment*.vol 6. n°1.
37. Guinebretière M.H., Thompson F.L., Sorokin A., Normand P., Dawynd P., Ehling-Schulz M., Svensson B., Sanchis V., Nguyen-The C., Heyndrick M. and De-Vos P., (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ. Microbiol.* 10, 851-865.
38. Hendrik F .2017. Detection, characterization and survival of *Bacillus cereus* group members in spices and herbs. these de doctorat.Freie Universitat Berlin
39. Hennekinne J.A., Pihier N. and Brisabois A., (2012). Toxi-infections alimentaires microbiologiques. 50, 57-61.
40. Hubert R.2004. *Épices et herbes aromatiques*374.futura science.pp16.
41. Isabelle Le Coquil.2017. épice-intèret-utilisation.*club cœur et santé*.pp7.
42. Jessica E., Fatma G.et Anne P.,Satinder K. & Khaled B.2015. *Spice Use in Food: Properties and Benefits*.Critical Reviews in Food Science and Nutrition.
43. JORAD.n° 39. 2017. critère microbiologique applicables aux denrées alimentaires. le journal officiel deAlgérie .pp 22.
44. Johnson K.M., Nelson C.L. and Busta F.F. (1982). `Germination and Heat Resistance of *Bacillus cereus* Spores from Strains Associated with Diarrheal and Emetic Foodborne Illness. *J. Food Sci.* 47, 1268-1271.
45. Julia.2016.les épices en cosmétique. *In astuce pratique*.

46. Juri M., Ito H., Watanabe H. et Tamura N. 1986. Distribution of Microorganisms in Spices and Their Decontamination by Gamma-irradiation. *Agric. Biol Chem.* 50 (2).pp 347-355.
47. Karapinar M. & Aktug S. 1986. Microbiological quality of ground cinnamon: incidence of *Bacillus cereus*. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensraitteluntersuchung und Hygiene.* 77. pp 520-527.
48. Kennedy, M.J., Reader, S.L., Swierczynski, L.M., 1994. Preservation records of microorganisms - evidence of the tenacity of life. *Microbiology-Sgm* 140, 2513-2529.
49. Kneifel W. & Berger E. 1993. Microbiological Criteria of Random Samples of Spices.
50. Konuma H., Shinagawa K., Tokumaru M., Onoue Y., Konno S., Fujino N., Shigehisa T., Jurata H., Juwabara Y. And Lopes C. 1988. Occurrence of *Bacillus cereus* in meat products, raw meat and meat product additives. *Journal of Food Protection.* 51. pp 324-326.
51. Lambin S., German A., (1969) Collection Précis de Pharmacie sous la direction de Janot M.M. Précis de Microbiologie Tome I. Masson et Cie. Saint Germain, Paris. 669p.
52. Lejeau J., Bailly E., Chandenier J. & Desoubaux G. 2015. Etude de la contamination fongique alimentaire au CHU. *Journal de Mycologie Médicale.* vol 25. pp 235.
53. Lucbor. 2016. Gingembre (zingiberofficinale). in lucbor.fr. pp2.
54. Malmsten T., Paakkonen K. And Hyvonen L. 1991. Packaging and storage effects on microbiological quality of dried herbs. *Journal of Food Science.* 56. pp 873-875.
55. Mandeel Q. 2004. *Fungal contamination of some imported spices.* *Mycopathologia.* 159. pp 291-298.
56. Marianne R. Le petit guide des 7 épices. in cuisine créole mauricienne. selmour conception . pp22.
57. Mckee L. 1994. Microbial Contamination of Spices and Herbs. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 28, 1-11. pp11.
58. Membres de FEDEMET. 2015. Le paprika une épice qui voit rouge. Newsletter SNPE / SYMTIA n°1. pp 6.
59. Meyer A., Deiana J. et Bernard A., 2004. Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2<sup>ème</sup> éd. Hongrie : Ed doin. 430 p.
60. Notermans S., Dufrenne J., Teunis P., Beumer R., Giffel M T. et Weem P P., 1997. A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. *Food Microbiology.* 14, 143-151.

61. Pafumi, J. Assessment of the microbiological quality of spices and herbs. *Journal of Food Protectio.* 49.pp 958-963
62. Palomares C. 2015. le safran, précieuse épice ou précieux médicament. thèse de doctorat : université de lorraine faculté de pharmacie.pp 142.
63. Peter K. 2004. Handbook of herbs and spice. woodhead pub.2. pp 374
64. Peter K.2001. *in peter introduction :Handbook of herbs and spices.* Published by Woodhead Publishing Limited.pp332.
65. Peter K.2011.Handbook of herbs and spices.Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC,ppt 332.
66. Prescott L M., Harley J P., Klein D A., 2006. Microbiologie. 2<sup>ème</sup> 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.
67. Raghavan S.2007. Handbook of *Spices,Seasonings,and Flavorings*.second edition . Taylor & Francis Group, LLC.ISBN. 10: 0-8493-2842-X (Hardcover).pp352.
68. Raghavan Sh.2007.handbook of spices seasonings and flavorings. CRC Press Taylor & Francis Group. Second edition. pp 352.
69. Rosengarten F. 1969. The Book Of Spices, p. 23–96, Jove Publ., Inc., New York.
70. Schweiggert U., Mix k.,Schieber A.et Carle R.2004. *An innovative process for the production of spices through immediate thermal treatment of the plant material* Innovative .Food Science and Emerging Technologies.6.pp143– 153.
71. Sharma A., Padwal-Desai S. and Nair P. 1989. Assessment of microbiological quality of some gamma irradiated Indian spices. *Food Sci.*54.pp 489-490.
72. Shigemura R., Gerdes D. and Hall W. 1991. Effect of gamma processing on prepackaged black and white pepper (*Piper nigrum* L). *Food Sci.Technol.* 24 .pp135-138.
73. Shobana S., Akhilender Naidu K.2000.Antioxidant activity of selected Indian spices. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 62(2).pp 107–110.
74. Tajkarimi M., Ibrahim S.& Cliver D.2010. *Antimicrobial herb and spice compounds in food.*food control.21.pp199–1218
75. Tapsell, L., Hemphill I., Cobiac L., Sullivan D., Fenech M., Patch , Roodenry S., Keogh J., Clifton P., Williams P., Fazio A. & Inge E. 2006. Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *Medical Journal of Australia*, 185 (4), S1-S2

76. UNIDO et FAO.2005. *Herbs, spices and essential oils Post-harvest operations in developing countries*.pp70
77. Vilas-Boas G., Sanchis V., Lereclus D., Lemos M V. et Bourguet D., 2002. Genetic Differentiation between Sympatric Populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*.*Applied and environmental microbiology*. 68 (3), 1414–1424.
78. Wijman J G E., de Leeuw P P L A., Moezelaar R., Zwietering M H. etAbee T., 2007. Air-Liquid Interface Biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation, and Dispersion. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (5), 1481–1488.
79. Yano Y., Satomi M.,Oikawa H.2006.Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*.111.pp 6–11
80. Zagon J., Dehne L., Wirz J., Binke B .& Bogl K. 1992. Ozon-Behandlung zur Entkeimung von Gewürzen.*Bundesgesundheitsblatt*.35.pp20-23.
81. 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.pp16-21
82. Ziane M., Le Chevalier P., Couvert O Moussa-Boudjemaa B.& Leguerinel I.2016. Identification and characterization of aerobic spore forming bacteriaisolated from commercial camel's milk in south of Algeria. *Small Ruminant Research*.137.pp59-64
83. Zwietering M H., de Wit J C. etNotermans S., 1996. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurized milk at point of consumption. *International Journal of Food Microbiology*. 30, 55-70.

## **ANNEXES**

Annexe 01 : les milieux de culture**1. Milieux MOSSEL :**

La gélose sélective pour *Bacillus cereus* de Mossel est utilisée pour la détection et dénombrement des spores et formes végétatives de *Bacillus cereus* dans les produits alimentaires leur composition c'est :

Mossel complet :

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

Mossel de base :

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

Émulsion de jaune d'œuf :

- Rincer l'œuf à l'alcool, jeter l'excès d'alcool, flamber l'œuf entre deux becs bunsen.
- Récupérer le jaune d'œuf dans un bécher, le diluer avec l'eau distillée stérile pour obtenir une émulsion.
- Porter l'émulsion à 47°C pendant 2h dans un bain marie, le mettre au réfrigérateur pendant 18h-24h jusqu'à l'obtention d'un précipité.
- Récupérer le surnageant et ajouter stérilement 10ml dans chaque flacon contenant le milieu Mossel de base stérile en
- Surfusion.

**2. BHI: (Brain Heart Infusion agar)**

Pour 1 litre de milieu :

- Extrait cœur-cervele .....	17,5 g
- Peptone pancréatique de gélatine .....	10,0 g
- Chlorure de sodium.....	5,0 g
- Phosphate disodique .....	2,5 g
- Glucose.....	2,0 g
- Agar agar bactériologique.....	15,0 g

**pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2.**

**PREPARATION :**

- 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.

**Gélose nutritif:**

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

**GN de sporulation :**

GN.....	1L
CaCl <sub>2</sub> .....	100mg/l
Mnso <sub>4</sub> .....	40mg/l



## 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.

### Matériel Nécessaire :

une lame- du Violet de Gentiane (ou Violet Cristal sous forme sèche)- du lugol - de l'alcool (éthanol à 95°) très peu dilué - de la Fuschine fraîchement préparée - de l'eau distillé - microscope photonique : objectif x 40 et x100

### Technique :

A partir d'un milieu solide : réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine (ou à la pipette stérile)

### Réalisation du frottis:

Étaler sur 1 à 2 cm par mouvement circulaire en partant du centre de la lame. Le frottis réalisé doit être mince et homogène, étendu sur la lame sans toucher les bords réalisés sur une lame propre et dégraissée, une goutte d'eau déposée en surface doit s'y étaler complètement

### Séchage :

à la température du laboratoire, si possible\_ou bien à **chaleur douce** : platine chauffante à 37° ou au-dessus de la veilleuse du bec bunsen, à hauteur suffisante.

### Fixation :

**But** : tuer les bactéries, fixer leur structure cytotologique, et les faire adhérer à la lame.

### Fixation par la chaleur :

à utiliser seulement pour les frottis effectués à partir de **cultures bactériennes**- passer la lame -**frottis situé sur le dessus**- dans la flamme chauffante, **lentement** et 3 à 4 fois de suite (attention de bien tenir la lame avec une pince) et laisser refroidir..

## 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.

### Mise au point :

- Repérer les bactéries à l'objectif x40.
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis
- Faire la mise au point en forte luminosité ( condensateur levé et diaphragme ouvert) objectif x100

### Observations :

On peut noter la morphologie des bactéries et la coloration de celles-ci : les bactéries violettes sont dites Gram positives, celles qui sont roses sont dites Gram négatives

## Coloration de vert de malachite

Certaines espèces bactériennes, en particulier les espèces des genres *Bacillus* et *Clostridium* (2 genres de bacilles à Gram positif) sont capables de former des **spores** quand les conditions deviennent **défavorables** : température, milieu pauvre... Les spores constituent des formes de **résistance**. Elles peuvent être mises en évidence :

- Technique de **Benito Trujillo : vert malachite à chaud**
  - Réaliser un frottis et le fixer.
  - Recouvrir d'une solution de vert malachite à 5%.
  - Chauffer **jusqu'à émission de vapeurs** ; laisser refroidir et chauffer à nouveau. L'opération doit durer 10 minutes au total (rajouter du colorant si nécessaire).
  - Laver soigneusement à l'eau distillée.
  - Recouvrir le frottis de fuchsine basique à 0,25% pendant 1 minute.
  - Laver à l'eau distillée.
  - Sécher et observer à l'immersion.

- Résultats obtenus avec les techniques au vert malachite

**Les spores apparaissent vertes dans des corps bactériens roses**

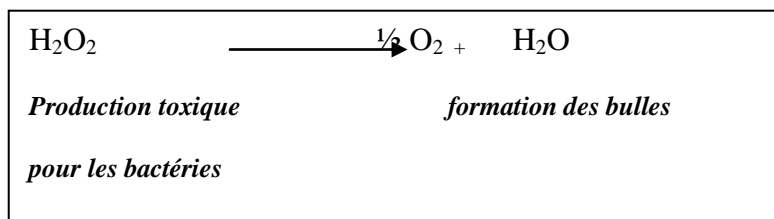
### Annexe 03 : Test de catalase

#### 1. Intérêt

La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram +

#### 2. Principe

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) :



Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). 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-**