

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



Faculté des Sciences  
Département de Science de la nature et de la vie

## **Mémoire**

Pour l'obtention du Diplôme de Master en Biologie Option : microbiologie appliqué Présenté par :

**M<sup>elle</sup> BELABBES Amina Chaimaa**  
**M<sup>elle</sup> AKERMA Mériem**

---

**ETUDE DE LA THERMORESISTANCE DE BACILLUS CEREUS  
SENSU LATO ISOLEES A PARTIR DES EPICES DE HRIRA DANS LA  
REGION DE AIN TEMOUCHENT**

---

Encadrant :

**M. Ziane Mohamed**

Maitre de conférences classe A  
à C.U.A.T

Soutenu en 2019

Devant le jury composé de :

---

Président : M. BOUAMRA Mohamed

Examineurs : M. MOUADDEN Riad

Encadrant : M. Ziane Mohamed

---

Introduction.....	01
-------------------	----

## Partie I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. 1. Généralités sur les épices	
I. 1. 1. Histoire d'épices.....	03
I. 1. 2. Définition des épices.....	03
I. 1. 3. Épices d'assaisonnement de Döner Kabab.....	04
I. 1. 3. 1. Cardamome (هال).....	04
I. 1. 3. 2. Cannelle (قرفة).....	04
I. 1. 3. 3. Clou de girofle (القرنفل).....	05
I. 1. 3. 4. Coriandre (كزبرة).....	05
I. 1. 3. 5. Cumin (كمون).....	05
I. 1. 3. 6. Curcuma (الكرم).....	06
I. 1. 3. 7. Gingembre (زنجبيل).....	06
I. 1. 3. 8. Paprika (فلفل أحمر).....	06
I. 1. 3. 9. Poivre blanc (فلفل ابيض).....	07
I. 1. 3. 10. Poivre noir (الفلفل الأسود).....	07
I. 1. 4. Production des épices.....	07
I. 1. 4. 1. Récolte de végétale.....	07
I. 1. 4. 2. Nettoyage.....	07
I. 1. 4. 3. Séchage.....	08
I. 1. 4. 4. Classement.....	08
I. 1. 4. 5. Broyage des épices.....	08
I. 1. 4. 6. Conditionnement.....	08
I. 1. 5. Propriétés chimiques des quelques épices d'assaisonnement de Döner Kabab.....	09
I. 1. 6. Propriétés fonctionnelles des épices.....	09
I. 1. 6. 1. Propriétés nutritionnelles.....	10
I. 1. 6. 2. Propriétés antioxydants.....	10
I. 1. 6. 3. Propriétés antimicrobiennes.....	10
I. 1. 7. Qualité microbiologiques des épices.....	11
I. 2. Généralités sur <i>B. cereus sensu lato</i> .....	12

I. 2. 1. Classification de groupe <i>B. cereus</i> .....	12
I. 2. 2. Affiliation de groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	12
I. 2. 3. Caractère morphologique et structure cellulaire de <i>Bacillus cereus</i> .....	15
I. 2. 4. Étapes et mécanismes de la sporulation (étapes morphologique).....	17
I. 2. 5. Température et germination sporale.....	17
I. 2. 6. Généralités sur les problèmes causés par <i>Bacillus cereus</i> dans les industries agro-alimentaires :.....	18
I. 2. 7. Pouvoir pathogène des <i>Bacillus cereus</i> :.....	18
I. 2. 8. Thermo-résistance des spores bactérienne.....	19
I. 2. 9. Survie des spores et résistance de la spore à divers agents.....	19
I. 3. Thermo résistance.....	20
I. 3. 1. Définition.....	20
I. 3. 2. Thermo résistance des spores <i>Bacillus cereus</i> .....	20
I. 3. 3. Facteurs influençant la thermo-résistance.....	21
I. 3. 4. Origine de la résistance thermique.....	22

## Partie II Partie expérimentale

### II. 1. MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel et méthodes.....	23
II. 1. 1. Description de la région d'étude.....	23
II. 1. 2. Échantillonnage, prélèvement et transport des échantillons des épices.....	23
II. 1. 3. Recherche, dénombrement <i>Bacillus cereus sensu lato</i> .....	24
II. 1.3. 1. Préparation des échantillons des épices et leurs dilutions.....	24
II. 1. 3. 2. Dénombrement et isolement des <i>Bacillus cereus sensu lato</i> .....	25
II. 1. 3. 3. Purification des isolats de <i>B. cereus sensu lato</i> .....	25
II. 1. 3. 3. 1. Confirmation de la pureté des isolats.....	26
II. 1.3. 3. 2. Confirmation de l'authentification d'appartenance au groupe <i>B. cereus</i> .....	26
II. 1. 3. 3. 2. 1. Recherche de catalase.....	26
II. 1. 3. 3. 2. 2. Test mannitol-mobilité.....	26
II. 1. 4. Production et conservation des spores de <i>Bacillus cereus sensu lato</i> .....	27

II. 1.4. 1. Préparation de pré-cultures.....	27
II. 1.4. 2. Récupération et lavage de culot des spores de <i>B. cereus sensu lato</i> .....	27
II.1. 5. Étude de la thermorésistance de spores des isolats.....	27
II. 1. 5. 1. Dénombrement de spores de <i>Bacillus cereus sensu lato</i> .....	28
II. 1. 6. Détermination des paramètres de la thermorésistance.....	28
<b>II .2. RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
II .2. 1. Isolements et purifications souches :.....	31
II .2. 2. Dénombrement de <i>Bacillus spp.</i> .....	32
II .2. 2. 1. Prévalence et dénombrements .....	32
II .2. 2. 2. Niveau de contamination d'épices par les spores de groupe <i>B. cereus</i> .....	33
II .2. 3. Étude de la thermorésistance des spores bactériennes.....	34

### Liste des tableaux

<b>N°</b>	<b>titre</b>	<b>pages</b>
<b>01</b>	Propriétés chimiques des épices	<b>09</b>
<b>02</b>	Températures de croissance et degrés de thermorésistance de différents groupes de <i>B. cereus</i>	<b>14</b>
<b>03</b>	Caractéristiques des groupes phylogénétiques de <i>Bacillus cereus</i>	<b>15</b>
<b>04</b>	Thermorésistance de diverses espèces	<b>21</b>
<b>05</b>	Différentes villes de prélèvement des épices d'assaisonnement de Shawarma « Région de Ain Témouchent »	<b>23</b>
<b>06</b>	Prévalences des échantillons de différentes villes de la région	<b>34</b>
<b>07</b>	Valeurs des paramètres de thermorésistance (D- value (min) et Z value (°C)) des isolats testés à différentes températures	<b>37</b>

## Liste de figures

N°	titre	page
<b>01</b>	Différentes formes de <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579) : (a) cellules végétatives et (b) spores dormantes (corps réfringent) ou spores en germination (corps opaque) sous microscopie optique (10 X 10	<b>16</b>
<b>02</b>	Spore de <i>Bacillus cereus</i> en microscopie électronique	<b>16</b>
<b>03</b>	Illustration de points de ventes et de prélèvement des épices de la région de Ain Témouchent. points de prélèvement	<b>24</b>
<b>04</b>	Dilutions des épices analysées à partir de dilutions traitées à 80°C pendant 10 min, pour l'échantillon de SHB 10 prélevé le 25/03/2019 de la ville d'Ain Témouchent	<b>25</b>
<b>05</b>	Aspect macroscopique des isolats de <i>Bacillus</i> spp sur milieu mossa nutritif gélosé. a : isolats (SHB 08)	<b>31</b>
<b>06</b>	Résultat d'observations microscopiques après la coloration de Gram (a) et de vert de malachite (b) (Observation par microscope optique G×100 à immersion)	<b>32</b>
<b>07</b>	Concentrations (log ufc/mL) de <i>B. cereus</i> Échantillons de différentes villes de la région d'Ain Témouchent	<b>34</b>
<b>08</b>	Cinétiques de destruction des isolats de <i>B. cereus</i>	<b>35</b>
<b>09</b>	Cinétiques de destruction de <i>B. cereus</i> (les valeurs de z)	<b>37</b>

**"Une herbe est un ami des médecins est un éloge des cuisiniers"**

**Lempereur Charlemagne.**

**Au 9<sup>ème</sup> siècle.**



## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes très chers parents pour leurs sacrifices et leurs encouragements durant  
toutes mes années d'étude ;*

*À tous mes chers amis et mes collègues du centre universitaire BELHADJE  
Bouchaib de Ain Témouchen ;*

*Enfin à toutes les personnes qui comptent pour moi ;*

*A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin et qui m'ont accompagné ;*

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

*Amina*



## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à ;*

*Mon père Mokhtar et Ma mère Mme BELAILI Aicha ;*

*Que j'aime tant, sans lesquels je ne serai jamais arrivée là où j'en suis ;*

*A mon très cher frère Mohamed et mes charmantes sœurs Amina et Marwa, à ma  
famille.*

*A mon fiancé Othmane*

*Ainsi qu'à mes chers amis de ma promotion 2018/2019*

*A tous ceux que j'aime.*

*AKERMA Meriem*



## *Remerciements*

*Tout d'abord, nous remercions le Dieu, notre créateur de nos avoir donné les forces, la volonté et le courage afin d'accomplir ce modeste travail.*

*Nous adressons le grand remerciement à notre encadreur Monsieur ZIANE M, Maître de conférences A, centre universitaire de Ain Témouchent, qui a proposé ce thème et a accepté de nous encadrer, également pour ses conseils et sa disponibilité.*

*Nous tenons également à remercier messieurs les membres de jury M. BOUAMRA M, Maître de conférences B et M MOUEDDEN R, Maître de conférences A au centre universitaire de Ain Témouchent pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'examiner notre travail, également pour l'intérêt que vous avez porté à notre travail et pour vos précieux conseils et remarques.*

*Finalement, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à nos familles qui nous ont toujours soutenues ainsi que pour l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation.*

*Amina et Meriem*

# **INTRODUCTION**

### Introduction

Le début de l'ère moderne est un saut dans le monde vers le progrès et le développement technologique, qui a imposé à la vie humaine un nouveau style de vie. Son ancienne vie, qui reposait sur un travail ardu, était une vie simple, sans anxiété ni complexité de besoins. C'est ce qui manque à notre monde actuel dont le progrès et l'évolution est très rapide. A cet effet, l'homme était obligé d'abandonner et/ou de changer ses habitudes et ses coutumes. Après avoir mangé des plats frais et préparé à la maison, cela semblait dépendant de Fast Food imposé par la vie quotidienne. L'un des plats à forte consommation au restaurant type Fast Food, est Döner Kabab (ou Shawarma). Le Döner Kabab est une préparation orientale à base de viande, pour laquelle du poulet, de l'agneau, du bœuf, du veau ou une combinaison de ces viandes, marinés avec un mélange des épices puis rôtis sur une broche verticale jusqu'à une heure ou plus. La viande est marinée pendant 24h au maximum puis apporté à la rôtisserie.

Cette préparation se rôtissait à des températures et durant un temps ne laissent survivent que les microorganismes thermorésistants et principalement les spores microbiennes. Ces microorganismes sont issus principalement des épices utilisées pour assaisonner le Döner Kabab. En effet, ces microorganismes étaient rarement rencontrés dans les viandes, cependant, ils sont souvent isolés des épices (faible activité d'eau : inférieures à 0,85) comme les spores fongiques (*Aspergillus*, *Penicillium*), bactériennes aérobies (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*) et anaérobies (*Clostridium*).

Tenant compte la durée de marinage et le temps d'attente après le rôtissage, les spores bactériennes aérobies peuvent présenter un challenge à la santé publique à cause de leurs paramètres de croissance plus pratique pour une meilleure croissance par rapport aux champignons. En effet, pour les champignons le temps de latence est dépassé 24h. Par ailleurs, les bactéries anaérobies se développent rarement à ces conditions de préparations. Par conséquent, les spores bactériennes aérobies sont probablement plus dominantes dans les épices de Döner Kabab assaisonné. En effet, plusieurs auteurs ont isolé des spores de *B. cereus* à partir des épices.

*Bacillus cereus*, est un groupe de bactéries sporulées aérobies qui peuvent causer deux types des intoxications d'origine alimentaire, en particulier, lorsque le Döner Kabab épicé est mal réfrigéré, mariné pour long temps ou mal cuit et/ou stockés pendant plusieurs heures. Dans ce contexte, nous tenterons de rechercher et déterminer le niveau de contamination de

groupe de *B. cereus* dans les épices utilisées pour assaisonner le Döner Kabab dans la région d'Ain Témouchent à 2,3% ainsi que leur thermorésistance.

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

- Une première partie, synthétise des généralités sur les épices et le groupe de *B. cereus*.
- Deuxième partie expérimentale, décrire la méthodologie suivie puis exposé et discuté les résultats obtenus.

## **Partie I**

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

### I. 1. Généralités sur les épices

#### I. 1. 1. Histoire d'épices

Les épices et les herbes ont une longue histoire d'utilisation culinaire, thérapeutique et agroalimentaire (conservation). En effet, les papyrus égyptiens antiques (datant de 1555 av.) enregistrent l'utilisation de coriandre, fenouil, genévrier, cumin, ail et thym dans leur vie quotidienne. Ainsi, selon *Ian Hemphill and Lynne Cobiac*, ils avaient utilisé des gousses d'ail en bois dans leurs tombeaux pour préserver la qualité des repas.

Par ailleurs, les Sumériens et les Assyriens utilisaient le thym et le safran pour leurs propriétés thérapeutiques dès le 5000 av.. En Inde, également les épices ont été fortement utilisées en médecine traditionnelle (*Hemphill and Cobiac, 2006*).

Traditionnellement, les Chinois ont intégré, les herbes et épices dans leur alimentation, leur nutrition et leur thérapie. Par exemple, Ginseng et le Ginkgo biloba était utilisés pour améliorer l'endurance et performances cognitives, respectivement. D'autres exemples incluent l'utilisation de Galanga, noix de muscade et cannelle respectivement pour soulager les douleurs abdominales, guérir de la diarrhée et contre le rhume et la grippe (*Hemphill and Cobia, 2006*).

La propagation de la civilisation islamique en Afrique du Nord a eu de profonds effets sur la région, alliant leurs connaissances à celles de la Chine et de l'Inde. Au 11<sup>ème</sup> siècle, la connaissance de la médecine arabe filtre en Europe ainsi que le commerce avec l'Afrique et l'Asie introduisait également de nouvelles herbes et épices (*Hemphill and Cobiac, 2006*).

#### I. 1. 2. Définition des épices

Le mot épice provient du latin « species » signifiant espèce ou substance Les épices sont des parties séchées ou non des plantes aromatiques : feuilles, boutons floraux, graines, écorces, fruits, racines (*Tapsell et al., 2006*). Elles sont utilisées seules ou mélangées. D'après *Nevellier and Jolivet (1965)*, le terme « épice » s'applique aux produits naturels végétaux ou mélange de ceux-ci, sans matières étrangères qui sont utilisés soit en entier, soit en poudre pour donner de la saveur et de l'arôme et pour assaisonner les aliments. Cette définition s'accorde avec celle du petit Larousse qui définit l'épice comme une substance aromatique d'origine végétale utilisée pour assaisonner les mets.

Le codex *alimentarius* (CAC/RCP 42-1995 révisé en 2014) a défini 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 ».

En plus d'être utilisé comme aromatisants et épices, elles sont également réputées par leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et propriétés médicinales (Shylaja et *al.*, 2001).

### I. 1. 3. Épices d'assaisonnement de Döner Kabab

Selon les spécialistes de Shawarma, les épices utilisées pour assaisonner le Döner Kabab sont composées souvent de poivre blanc, poivre noir, cannelle, coriandre, cumin, clou de girofle, cardamome, paprika, Curcuma et Gingembre.

#### I. 1. 3. 1. Cardamome (هال)

La cardamome (*Elettaria cardamomum*) est une plante herbacée vivace à rhizome appartenant au genre *Elettaria*, de la famille des zingibéracées, originaire d'Asie du Sud-Est (Guillaume, 2010). Le parfum de la cardamome est très fort, il faut donc l'utiliser avec parcimonie. On retrouve des saveurs citronnées et poivrées mais non piquante et un goût de sève de pin. En arrière-goût, on peut également retrouver une légère saveur mentholée. La cardamome est une plante utilisée depuis la nuit des temps dans la médecine ayurvédique. Elle est reconnue pour son efficacité dans le traitement des troubles digestifs, mais aussi pour ses propriétés anti-inflammatoires et analgésiques (Nevellier and Jolivet, 1965).

#### I. 1. 3. 2. Cannelle (قرفة)

Cette ancienne épice se décline en deux variétés - *Cinnamome zeylanicum* (cannelle de Ceylan) et *Cinnamomum cassia* (cassia) (Nevellier and Jolivet, 1965).

La cannelle est l'intérieur d'écorce d'un arbre tropical à feuilles persistantes. L'écorce est récoltée pendant la saison des pluies, quand il est plus flexible. Elle prend la forme incurvée après séchage vendue en bâtons de cannelle, ou moulu en poudre. La cannelle de Ceylan est de couleur chamois et légèrement sucré en saveur ; tandis que cassia cannelle est une sombre, rougeâtre couleur brune, plus piquante et légèrement aigre-doux saveur. Elle est

utilisée pour la préparation de Döner Kabab sous forme de poudre (Nevellier and Jolivet, 1965).

### **I. 1. 3. 3. Clou de girofle (القرنفل)**

Le giroflier ou girofle (*Syzygium aromaticum*) est un arbre de la famille des *Myrtaceae* originaire d'Indonésie (Nevellier and Jolivet, 1965). Il est considéré comme l'une des épices les plus importantes au monde en forme de clou et de couleur Brun rougeâtre. Ils sont les boutons floraux séchés et non ouverts des plantes tropicales Giroflier à feuilles persistantes. Les clous de girofle sont vendus entiers ou moulus et peuvent être utilisés pour parfumer une multitude de plats allant du sucré au salé (Nevellier and Jolivet, 1965).

### **I. 1. 3. 4. Coriandre (كزبرة)**

La coriandre ou coriandre cultivée (*Coriandrum sativum*) est une plante herbacée annuelle de la famille des Apiacées (Ombellifères) (Nevellier and Jolivet, 1965). Les feuilles de coriandre sont aussi communément appelées coriandre et persil chinois issues de la plante. Les feuilles de coriandre fraîches ont une odeur extrêmement piquante (certains disent fétide) et saveur qui se prête bien aux aliments très assaisonnés (Nevellier and Jolivet, 1965). Les feuilles de coriandre sont utilisées largement dans les cuisines de l'Inde, le Mexique, l'Orient et les Caraïbes.

### **I. 1. 3. 5. Cumin (كمون)**

Le cumin est un fruit séché d'une plante aromatique de la famille du persil (Nevellier and Jolivet, 1965). Ses graines aromatisées aux noisettes se déclinent en trois couleurs: ambre (le plus largement disponibles), en blanc et en noir (les deux Marchés asiatiques). La graine de cumin blanc est interchangeable avec l'ambre, mais la graine noire a un plus complexe, saveur poivrée. Le cumin est disponible en graines et en poudre formes. Le cumin est particulièrement populaire au Moyen-Orient, en Asie et en cuisine méditerranéenne. Entre autres choses, c'est utilisé pour faire des currys, des poudres de chili et de la liqueur Kummel (Nevellier and Jolivet, 1965).

### I. 1. 3. 6. Curcuma (الكركم)

Le curcuma (*Curcuma longa*) est une plante herbacée rhizomateuse vivace du genre *Curcuma* de la famille des Zingibéracées originaire d'Inde et de Malaisie (Noumi, 1984).

Il est originaire d'Inde de couleur jaune-orange. Il est l'un des antioxydants les plus puissants. Il présente plusieurs intérêts thérapeutiques (anti-inflammatoires, ralentir le développement de la maladie d'Alzheimer, récupération des accidents vasculaires cérébraux, traitement du côlon irritable, de la colite ulcéreuse de maladie de Crohn ou encore l'arthrite) et nutritionnelle (favorise la digestion en activant le travail du foie). Elle aurait également des vertus anti-cancéreuses (Noumi, 1984).

### I. 1. 3. 7. Gingembre (زنجبيل)

A l'instar du curcuma, le gingembre est originaire de l'Inde. Le gingembre (*Zingiber officinale*) est une espèce de plantes, du genre *Zingiber* et de la famille des *Zingiberaceae* dont on utilise le rhizome en cuisine et en médecine traditionnelle (Noumi, 1984).

Il est bien connu pour ses vertus aphrodisiaques et antispasmodiques. Il permet aussi de renforcer les défenses immunitaires, de réduire les nausées et vomissements et la douleur et l'enflure de l'arthrite et des douleurs musculaires, de soigner la toux (expectorant efficace) ainsi que le mal des transports et maux de gorge causés par les rhumes et la grippe (Noumi, 1984).

### I. 1. 3. 8. Paprika (فلفل أحمر)

Le paprika, aussi connu sous le terme piment doux, est une épice en poudre de couleur rouge obtenue à partir du fruit mûr, séché et moulu du piment doux ou poivron (*Capsicum annuum*, de la famille des *Solanaceae*) (Noumi, 1984).

Il est obtenu en broyant des aromatiques gousses de poivron rouge. Les poudres sont assez dures, donc plusieurs broyages sont nécessaires pour produire la bonne texture. Le goût du paprika peut varier de doux à piquant et chaud, la couleur allant du rouge orange vif au rouge sang profond. La plupart des Paprika commerciaux proviennent de L'Espagne, l'Amérique du Sud, la Californie et la Hongrie, avec le Variété hongroise considérée par beaucoup comme supérieure. En effet, la cuisine hongroise utilise depuis longtemps le paprika comme arôme principal plutôt que simplement comme une garniture (Noumi, 1984).

### **I. 1. 3. 9. Poivre blanc (فلفل ابيض)**

Le poivre est une épice obtenue à partir des baies de différentes espèces de poivriers, des plantes de la famille des pipéracées (Noumi, 1984).

Il provient des fruits du Piper Negrum cueillis très murs, que l'on fait par la suite bouillir, pour enfin les décortiquer puis les sécher. C'est donc un poivre noir "nettoyé", débarrassé de son péricarpe. Le poivre est vraiment une épice à part, une graine reine des épices, et son histoire ainsi que ses vertus pour la santé sont passionnantes. Certains chefs utilisent du poivre ultra-blanc, afin de ne pas colorer les sauces, et pour lequel la sélection est effectuée à la main, grain par grain. On peut l'employer sur tous les aliments : potages, viandes, légumes, sauces (Noumi, 1984).

### **I. 1. 3. 10. Poivre noir (الفلفل الأسود)**

Le poivre noir est l'une des épices les plus employées dans le monde. C'est le plus piquant et le plus aromatique des poivres. On l'ajoute pratiquement à tous les aliments, toutes les recettes : potages, viandes, légumes, vinaigrettes, sauces. On rajoute toujours le poivre en fin de cuisson, une pincée suffit à relever subtilement un plat. Le poivre noir doit être utilisé modérément comme tous les poivres. Il stimule les sécrétions digestives et facilite donc la digestion, mais il ne faut pas en abuser car il devient alors irritant (Noumi, 1984).

### **I. 1. 4. Production des épices**

Les épices sont des produits délicats qui sont endommagés par la température élevée et extrême traitement, des précautions particulières doivent être prises pour que les produits soient de qualité supérieure. Selon Borget (1993), les étapes de production consistent à :

#### **I. 1. 4. 1. Récolte de végétale**

Il n'est pas possible de produire une épice de haute qualité à partir d'un matériel de qualité inférieure. Il est impératif de récolter les épices au bon stade de maturité pour garantir le bon développement de la saveur et de l'arôme.

#### **I. 1. 4. 2. Nettoyage**

La récolte doit être nettoyée avant le traitement de poussière, saleté, pesticides, les insectes et les poils crottes pesticides. Le premier stade est d'enlever la poussière et la saleté à

l'aide d'un panier de vannage puis lavée à l'eau propre et potable. Le lavage devrait être rapide pour que l'épice ne soit pas trempée dans l'eau, ce qui en réduit la qualité. L'eau de lavage doit être changée régulièrement. Il est essentiel que l'eau utilisée soit propre car les épices ne sont pas traitées thermiquement au cours de leur transformation.

### **I. 1. 4. 3. Séchage**

Les épices contiennent des huiles volatiles affectées par les températures de séchage élevées. Par conséquent, la température de séchage doit être étroitement contrôlée pour assurer un produit séché de haute qualité. La plupart des petits transformateurs sèchent la récolte en l'étalant au soleil. C'est une autre opportunité pour que la culture soit contaminée. Tous les efforts doivent être faits pour que la récolte soit séchée dans un endroit propre, loin des animaux, des insectes et des oiseaux.

Pendant la saison sèche, le séchage au soleil suffit généralement à sécher le produit. La méthode plus simple et moins chère consiste à déposer les produits sur des nattes au soleil. Cependant, il y a des problèmes associés à cette méthode. La poussière et la saleté sont soufflées sur la culture. Il est préférable d'utiliser un séchoir solaire pour vaincre les problèmes de contamination.

### **I. 1. 4. 4. Classement**

Les épices peuvent être classées par taille, densité, couleur, forme et saveur. Des machines sont disponibles pour unités de production à plus grande échelle.

### **I. 1. 4. 5. 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 les épices du bas et en les cassant.

### **I. 1. 4. 6. Conditionnement**

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.

La plupart des épices peuvent être stockées correctement dans des sacs ou bien dans des boîtes si l'humidité n'est pas trop élevée.

### **I. 1. 5. Propriétés chimiques des quelques épices d'assaisonnement de Döner Kabab**

Les produits végétaux renferment tous, en première analyse, de l'eau, des protéines, des lipides, des glucides (amidon et cellulose entre autres) et des composés minéraux divers désignés sous le terme général de «cendres». Les épices, produits végétaux, renferment toutes ces catégories de corps, mais contiennent, en outre, des fractions qui n'existent pas chez tous les végétaux et qui, précisément, leur donnent leurs caractéristiques d'épices.

**Tableau 01** : Propriétés chimiques des épices (Farrel, 1990).

Epices	Eau	Protides	Lipides	Huiles essentielles	Amidon+ sucres	cellulose	cendres
Poivre noir	11	13	08	1.5	41	14	4.6
Poivre blanc	11	13	07	1.6	55	07	2.1
Cannelle	08	04	02	1.1	25	33	5.5
Clous de girofle	09	04	08	14.0	16	08	5.2
Gingembre	09	08	03	1.8	49	04	4.7
Curcuma	10	11	08	2.8	38	09	8.0
cardamome	11	10	02	5.3	33	17	7.5

### **I. 1. 6. Propriétés fonctionnelles des épices**

En plus d'ajouter de la saveur aux aliments et aux boissons, les épices à base de plantes sont appréciées pour leurs propriétés nutritionnelles, antioxydants, antimicrobiennes, insectifuges et médicinales.

### **I. 1. 6. 1. Propriétés nutritionnelles**

La plupart des épices à base de plantes sont riches en protéines, en vitamines, notamment en vitamines A, C et B, et des minéraux tels que le calcium, le phosphore, le sodium, le potassium et le fer (Farrel, 1990).

Le persil est la source la plus riche en vitamine A, tandis que la coriandre est l'une des sources les plus riches en vitamines C et A. Le persil et le cerfeuil sont également des sources riches en vitamine K (Farrel, 1990).

Les effets incluent le curcuma pour la jaunisse, le basilic pour protéger le cœur, le macis pour les infections de l'estomac, la cannelle pour stimuler la circulation et le gingembre comme médicament universel, en particulier pour soulager les nausées et les indigestions. Beaucoup de ces herbes et épices sont utilisées en Inde cuire pour donner du goût, et des quantités significatives peuvent être consommées en un repas (Farrel, 1990).

En raison du feuillage attrayant, quelques herbes sont également utilisées comme épices de garniture dans de nombreuses préparations alimentaires. Les huiles essentielles extraites de tendres les tiges, les feuilles et les sommités fleuries sont utilisés dans les cosmétiques, les parfumeri

es et les articles de toilette, ainsi que pour boissons aromatisants, boissons gazeuses, boissons et préparations pharmaceutiques (Farrel, 1990).

### **I. 1. 6. 2. Propriétés antioxydants**

Des antioxydants sont ajoutés aux aliments pour préserver les composants lipidiques de la détérioration de la qualité.

Antioxydants synthétiques tels que l'hydroxyanisole butylé (BHA), l'hydroxytoluène butylé (BHT), le gallate de propyle (PG) et l'hydroquinone de tert-butyle (TBHQ) sont les plus couramment utilisés antioxydants synthétiques. En raison de leur action suspectée en tant que promoteurs de la cancérogenèse, les antioxydants naturels suscitent un intérêt croissant (Shylaja et al., 2001).

### **I. 1. 6. 3. Propriétés antimicrobiennes**

Les épices à base de plantes sont des sources importantes d'antimicrobiens, et l'utilisation des épices, leur ingrédient essentiel des huiles ou des principes actifs pour contrôler la croissance microbienne dans les aliments constitue une approche alternative aux

additifs chimiques. Certaines des huiles essentielles d'épices (individuelles ou combinées) inhibent fortement les micro-organismes pathogènes et d'altération sélectionnés (Shylaja et al., 2001). Le fractionnement des huiles essentielles et d'autres applications aident à améliorer le niveau d'activité dans certains cas. Les isomères optiques carvone de *Mentha spicata* et d'*Anethum sowa* ont été plus actifs contre un large spectre de champignons et de bactéries pathogènes pour l'homme. Le mélange de composés tels que le carvacrol et le thymol dans des proportions différentes peut avoir un effet total sur la santé par l'inhibition de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus* (Shylaja et al., 2001).

L'inhibition est due à dommages à l'intégrité de la membrane, ce qui affecte également l'homéostasie du pH et l'équilibre des ions inorganiques. Ces connaissances sur le mode d'action aident les extraits et ingrédients d'épices à être appliqués avec succès dans les aliments. En outre, l'application d'ingrédients actifs à la place de l'huile essentielle ne changera pas beaucoup le goût des aliments (Shylaja et al., 2001).

Des extraits de plantes ou des produits de diffusion de semences pourraient être utilisés pour lutter contre les agents pathogènes transmis par les semences et peut remplacer des produits chimiques coûteux pour le traitement des semences. Les extraits de plantes de piment peuvent être utilisés pour contrôler la croissance fongique pendant le stockage des grains de blé (Shylaja et al., 2001).

### **I. 1. 7. Qualité microbiologiques des épices**

L'incorporation des épices dans les aliments « riches » (charcuteries) peut être à l'origine de la mauvaise qualité hygiénique de ces produits (risques d'intoxication, dégradation, accélérées,...). La décontamination microbiologique de ces produits avant incorporation est indispensable. Une bonne diffusion de la chaleur (thermique) ou du gaz (fumigation) n'est pas toujours envisageable ; ainsi, le recours à l'oxyde d'éthylène est interdit depuis le 31 décembre 1990 ; le recours à la vapeur entraîne souvent des dégradations organoleptiques des produits (exemple : décoloration, perte d'arômes des épices). Aussi, le traitement ionisant est, dans ce cas, envisagé comme alternative plus efficace (pénétration à cœur dans le produit déjà emballé) et plus saine (absence de résidus, absence de conséquence organoleptiques) (Shylaja et al., 2001).

La plupart des épices proviennent de pays à climat tropical ou subtropical, particulièrement favorable au développement microbien. De cet état de fait, renforcé dans son

effet par une récolte et un stockage douteux à l'origine sur le plan de l'hygiène, résultera une épice fortement contaminée par des bactéries et des moisissures. Si tous les germes dégradent les aliments et réduisent, par conséquent leur durée de conservation, certaines espèces retrouvées dans les épices présentent de plus un caractère pathogène pour le consommateur. tels que *Salmonella*, *B. cereus*, *Clostridium perfringens* ainsi que des indicateurs d'hygiène tels que *Escherichia coli* (Shylaja et al., 2001).

### **I. 2. Généralités sur *B. cereus sensu lato***

Les espèces du groupe *Bacillus cereus* sont des bacilles de grande taille (>1.0 µm), généralement motiles grâce à une ciliature péritriche (carrera et al., 2007). Elles sont de forme bacillaire à coloration de Gram positive, non encapsulés (carrera et al., 2007). Les extrémités des cellules adjacentes des chaînes courtes sont à angle droit (Kotiranta, et al., 2000). En revanche, les extrémités libres des bacilles sont arrondies (Drobniewski, 1993).

Les espèces du groupe *B. cereus* sont très répandues dans la nature et sont souvent isolées du sol, de la poussière ou de la surface de végétaux, ce qui favorise leur propagation dans les aliments. Certaines espèces sont aussi capables d'infecter des mammifères et/ou des insectes (Drobniewski, 1993 ; Kotiranta, et al., 2000).

#### **I. 2. 1. Classification de groupe *B. cereus***

Règne : *Bacteria*

Division : *Firmicutes*

Classe : *Bacilli*

Ordre : *Bacillales*

Famille : *Bacillaceae*

Genre : *Bacillus*

#### **I. 2. 2. Affiliation de groupe *Bacillus cereus***

Selon l'affiliation de Guinebertière et al. (2008), le groupe de *Bacillus cereus (sensu lato)* peut se divisé en 7 groupes phylogénétiques. Cette affiliation est basée sur le séquençage de gène *panC* qui permet de regrouper les espèces de *B. cereus* leur profile de

thermorésistance. Les tableaux 02 et 03 montrent les principales différences entre les différentes espèces de *B. cereus*.

### Groupe I

Il s'agit d'un groupe mésophile correspondant à l'espèce de *B. pseudomycoïdes* (colonie de type rhyzoïdale). Les souches de ce groupe se distinguent de celles de l'espèce *B. mycoïdes* par l'absence de signature associée à la psychrotolérance sur le gène *cspA* (Francis et al., 1998). Les souches de ce groupe sont généralement non cytotoxiques ou peu cytotoxiques.

### Groupe II

Ce groupe inclut 75% de souches psychrotrophes et 25% de souches mésophiles, correspondant à l'espèce *B. thuringiensis* II ou *B. cereus* II dont la différenciation se fait en cherchant le cristal parasporal typique. Les souches de ce groupe ne contiennent pas la signature associée à la psychrotolérance sur le gène *cspA* (Francis et al., 1998). Elles se distinguent donc des souches du groupe VI par un mode d'adaptation au froid probablement différent. Ce groupe peut contenir des souches cytotoxiques.

### Groupe III

Il s'agit d'un groupe mésophile correspondant à l'espèce *B. thuringiensis* III ou *B. cereus* III ou *B. anthracis* (porte les gènes de toxines impliquées dans l'anthrax). Les souches de ce groupe sont généralement cytotoxiques, beaucoup d'entre elles peuvent être très cytotoxiques. Ce groupe contient notamment les souches émétiques.

### Groupe IV

Il s'agit d'un groupe mésophile correspondant à l'espèce *B. thuringiensis* IV ou *B. cereus* IV. Il est représenté typiquement par la souche ATCC 14579. Les souches de ce groupe n'ont pas pour l'instant de caractère phénotypique spécifique mis en évidence pour les identifier de manière simple. Les souches de ce groupe sont généralement cytotoxiques.

### Groupe V

Il s'agit d'un groupe intermédiaire correspondant à l'espèce *B. thuringiensis* V ou *B. cereus* V. Ce groupe peut contenir des souches cytotoxiques.

### **Groupe VI**

Il s'agit d'un groupe psychrotolerant correspondant à l'espèce *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* ou *B. thuringiensis* VI. Les souches de ce groupe sont facilement identifiables par la présence de la signature associée à la psychrotolérance sur le gène *cspA*. De plus, *B. mycoides* se distingue des deux autres espèces par la production de colonies 'rhizoïdales' et *B. thuringiensis* par la production du 'cristal parasporal'. Les souches bactériennes de ce groupe sont généralement non cytotoxiques ou peu cytotoxiques.

Selon certains auteurs, un nombre extrêmement faible des souches de ce groupe pourraient contenir des gènes similaires à ceux impliqués dans la synthèse du cereulide (toxine émétique). Il est donc conseillé d'effectuer le test PCR décrit par Ehling-Schulz et al. (2005) pour s'assurer de l'innocuité de la souche.

### **Groupe VII**

Il s'agit d'un groupe thermotolérant correspondant à la nouvelle espèce *B. cytotoxicus*. Les souches de ce groupe sont facilement identifiables par l'absence de croissance en milieu minimum sans tryptophane. Les souches de ce groupe sont généralement très cytotoxiques (Ehling-Schulz et al., 2005).

**Tableau 02 :** Températures de croissance et degrés de thermorésistance de différents groupes de *B. cereus* (Cadel Six, 2012).

<b>Groupes</b>	<b>Températures de croissance (°C)</b>	<b>Thermorésistance</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	+++	+++

**Tableau 03 :** Caractéristiques des groupes phylogénétiques de *Bacillus cereus*.

Caractéristique	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. weihenste phanensis</i>	<i>B. mycodes</i>	<i>B. pseudo mycodes</i>	<i>B. cytotoxines</i>
T° <sub>min</sub> de croissance (°C)	10	10	>10	5	5	10	20
T° <sub>max</sub> de croissance (°C)	45	45	<50	37	37	40	50
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-
Production d'Indole*	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	+	+	-	+	-	-	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-
Lécithinase de jeune d'œufs	+	+	+	+	+	+f	+f
Amidon**	+	+	+	+	+	+	-
Hémolyse	+	+	-	ND	+	+	ND
croissance en anaérobiose	+	+	+	+	+	+	+F
Réduction de nitrates *	+	+	+	+	+	+	+
Colonie rhizoidale	-	-	-	-	+	+	-
Cristal prasporal	-	+	-	-	-	-	-

\*tests API 20

\*\*test API

ND : non déterminé

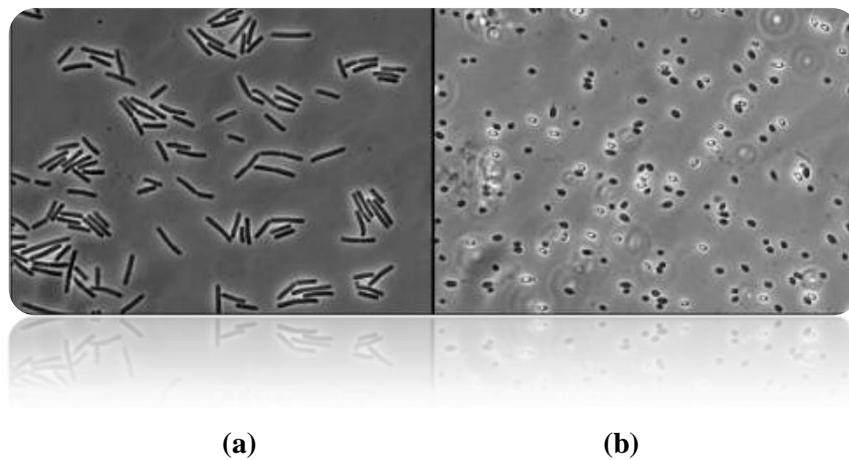
f :faiblement

positive

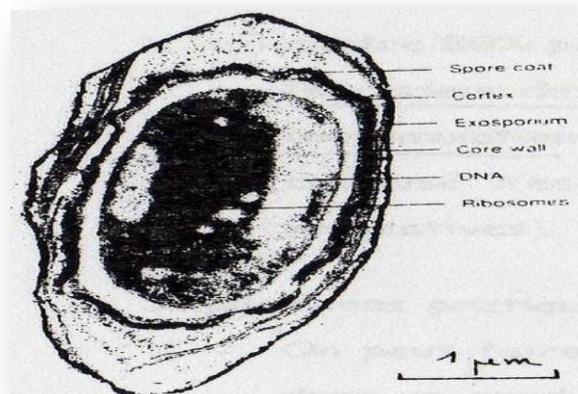
### I. 2. 3. Caractère morphologique et structure cellulaire de *Bacillus cereus*

La capacité à produire des spores leur permet de résister à des environnements extrêmes tels que la pasteurisation ou l'acidité rencontrée dans l'estomac mais aussi à adhérer aux matériaux utilisés au cours de la chaîne de fabrication des plats cuisinés. La gamme de température de croissance varie en fonction des souches et s'étend de 5°C à 50°C (Lequette, et al., 2011, Mols and Abee, 2011, Ceuppens, et al., 2012).

Les spores de *Bacillus* ont une forme ovale à sphérique, voire cylindrique ; elles sont terminales ou non, mesurant en moyenne 1 µm par 2 µm (Lequette, et al., 2011, Mols and Abee, 2011, Ceuppens, et al., 2012).



**Figure 1** : Différentes formes de *Bacillus cereus* (ATCC 14579) : (a) cellules végétatives et (b) spores dormantes (corps réfringent) ou spores en germination (corps opaque) sous microscopie optique (10 X 10).



**Figure 02** : Spore de *Bacillus cereus* en microscopie électronique.

### I. 2. 4. Étapes et mécanismes de la sporulation (étapes morphologique)

Le processus de sporulation se déclenche à la fin de la croissance exponentielle et dure de 7 à 10 heures. On distingue, d'un point de vue morphologique, 6 principaux stades :

- Le stade I ou stade du filament axial se caractérise par la présence d'un matériel nucléaire qui s'étend sur toute la longueur de la cellule et qui correspond à 2 génomes ;
- Au stade II, les deux génomes se séparent et en même temps la membrane cytoplasmique s'invagine près d'un pôle de la cellule pour former un septum de sporulation qui partage la cellule en deux parties inégales ;
- Ce septum de sporulation va envelopper le cytoplasme de la plus petite partie pour former une préspore caractéristique du stade III ;
- Entre les deux membranes limitant la préspore se forme la paroi sporale puis apparaît rapidement le cortex dont la présence est caractéristique du stade IV ;
- Aux stades V et VI, les tuniques sont élaborées et, après maturation, la cellule mère se lyse et libère la spore mature (BTS QIABI, 2004).

### I. 2. 5. Température et germination sporale

Les spores de *B. cereus* sont formées lorsque les conditions environnementales de la bactérie sont défavorables. Inversement, lorsque ces mêmes conditions redeviennent viables pour le microorganisme, la spore va entamer son retour à l'état végétatif via la germination.

La germination est une série d'événements entraînant la perte de propriétés spécifiques des spores et est déclenchée par des solutés spécifiques (germinants), par la variation de certaines grandeurs physiques ou parfois spontanément (Foster and Johnstone, 1990).

Cette transition de l'état de spore à celui de cellule végétative implique 3 étapes : l'activation, la germination et le développement.

- aucune germination n'aura lieu à plus de 46 °C et moins de 18 °C
- à 44 °C, la germination commence à 12 heures, et est entièrement terminée à 16 heures
- à 42 °C, la germination commence à 3 heures et est entièrement terminée à 6 heures
- à 37° C, la germination commence à 2 heures et est entièrement terminée à 6 heures.
- à 25 °C, la germination commence à 10 heures et est entièrement terminée à 12 heures (Dromingy, 2008)

### **I. 2. 6. Généralités sur les problèmes causés par *Bacillus cereus* dans les industries agro-alimentaires :**

Les bactéries appartenant aux genres *Bacillus* et *Clostridium* sont capables de former des spores qui sont une forme de résistance et de dormance, les cellules végétatives de *B. cereus* forment des spores lorsqu'elles se trouvent en conditions environnementales défavorables. Ces spores peuvent rester à l'état latent pendant de nombreuses années voire des milliers d'années, attendant ainsi le retour des conditions favorables (Abbas, 2014).

Ce pathogène alimentaire peut ainsi causer de sérieux problèmes tels que le changement de texture et le développement de saveurs indésirables dans l'industrie alimentaire. Aussi, compte tenu de sa psychrotolérance, cette bactérie constitue un potentiel pathogène émergent des produits réfrigérés prêts à la consommation (Merzougui et *al.*, 2013).

Concernant la filière des ovoproduits, les bactéries du groupe *B. cereus* occupent une place de premier plan parmi les microorganismes préjudiciables. En effet, si les salmonelles sont maintenant bien maîtrisées par l'application de traitements thermiques adéquats, l'élimination des bactéries du groupe *B. cereus* pose problème en raison de leur ubiquité et surtout de leur capacité à sporuler. Les traitements thermiques peuvent, de plus, déclencher la germination des spores et favoriser leur multiplication dans les ovoproduits (Merzougui et *al.*, 2013).

### **I. 2. 7. Pouvoir pathogène des *Bacillus Cereus* :**

Dans le cas des toxi-infections diarrhéiques, la quantité de cellules ou spores de *B. cereus* pathogènes retrouvée dans les aliments incriminés est généralement égale ou supérieure à  $10^5$  par gramme ou millilitre et dans de très rares cas égale ou supérieure à  $10^3$  par gramme ou millilitre (Kramer and Gilbert, 1989; EFSA, 2005; Stenfors Arnesen et *al.*, 2008).

Dans le cas des intoxications émétiques, les toxines peptidiques sont très stables et peuvent persister dans l'aliment même si les bactéries ont disparu (EFSA, 2005). Un minimum de  $10^5$  cellules de *B. cereus* par gramme ou millilitre de l'aliment à un stade de sa production est nécessaire pour produire suffisamment de toxines et provoquer une intoxication (Kramer and Gilbert, 1989).

Toxi-infection : *B. cereus* provoque deux types de maladies d'origine alimentaire émétique et diarrhée (Kramer and Gilbert, 1989).

### Le syndrome émétique

C'est une intoxication provoquée par l'ingestion d'un cyclique. toxine peptidique appelée cereulide qui est préformée dans l'aliment au cours de sa croissance par *B. cereus*. Ce syndrome a une courte période d'incubation et de récupération. Les symptômes de nausée, des vomissements et des crampes abdominales surviennent dans les 1 à 5 heures suivant l'ingestion, avec récupération généralement dans les 6 à 24 heures (Kramer and Gilbert, 1989).

### Le syndrome diarrhéique

C'est causé par des entérotoxines produites par *B. cereus* à l'intérieur de l'hôte. La période d'incubation avant l'apparition de la maladie est de 8 à 16 heures et la maladie dure généralement 12 à 14 heures, bien que cela puisse durer plusieurs jours. Les symptômes sont généralement légers avec crampes abdominales, diarrhée aqueuse et nausée).

Dans un petit nombre de cas, les deux types de toxines sont produits, ainsi que les symptômes émétiques et diarrhéiques. Des symptômes apparaissent. Aucune des deux formes de maladie n'est considérée comme une menace pour la vie normale et en bonne santé, avec peu de cas mortels signalés (Kramer and Gilbert, 1989).

### **I. 2. 8. Thermo-résistance des spores bactérienne**

La spore est donc une entité de structure et de composition complexes douée d'une résistance thermique exceptionnelle. Mais, il ne faut pas perdre de vue que la spore est dormante et qu'elle possède tous les mécanismes lui permettant de détecter l'état de l'environnement où elle se trouve et ceux lui permettant de sortir de cette dormance. Il y a donc un subtil équilibre entre résistance, maintien de la dormance et l'activation/germination, équilibre dans lequel les différentes enveloppes ont un rôle à jouer (Gombas, 1983).

### **I. 2. 9. Survie des spores et résistance de la spore à divers agents**

Chez *Bacillus cereus*, la température de destruction des cellules et la température de destruction des spores différent de 44°C, ce qui peut être comparé à la stabilité accrue pour la plupart des enzymes présentes dans la spore à une température qui est 38°C au dessus de la température de destruction des cellules végétatives.

Cela veut dire que le milieu intérieur des spores protège les enzymes de *Bacillus cereus*, ce qui confère aux spores une thermo résistance accrue par rapport aux cellules végétatives, dont les enzymes sont détruites à température plus basse (Warth, 1980).

### I. 3. Thermo résistance

#### I. 3. 1. Définition

Les traitements thermiques, sont des méthodes physiques sûres et bénéficient d'une image nettement plus positive que les traitements faisant intervenir des composés chimiques. Les techniques de décontamination par traitement thermique sont anciennes et bien maîtrisées.

Mais il faut, pour chaque produit, trouver le bon équilibre entre un chauffage en excès (qui réduit les qualités organoleptiques et nutritionnelles et peut produire des composés toxiques et des goûts indésirables) et un chauffage insuffisant (qui ne détruit pas suffisamment les microorganismes) (Dufrenne et *al.*, 1995 ; Andersson et *al.*, 1995).

Il s'agit des propriétés caractéristiques de l'endospore bactérienne liée à plusieurs facteurs dont notamment :

1. La teneur en eau particulièrement faible et l'arrêt de métabolisme par déshydratation et exportation des enzymes vers la périphérie (tunique).
2. Les structures riches en acide dipicolinique (dipicolinate de calcium) et enrichies en soufre.
3. La présence d'enveloppe successive comme le cortex amorphe et les tuniques sporales protéiques successive et d'orientation croisée.

La thermo-résistance selon les espèces, les spores de *Bacillus stearothermophilus* par exemple ne sont détruites que par un traitement de 15min à 120°C (Bugwicourt, 1995).

Selon Janstova et *al.* (2001), elle est liée au taux des bactéries survivant après traitement thermique, à différentes températures et temps d'exposition.

Des indications effectives pour certains traitements thermiques sur les spores détruites et celles encore en vie sont données par la valeur D (D est le temps de réduction décimale c'est-à-dire le temps requis pour tuer 90% des micro-organismes ou des spores dans un échantillon à une température donnée) (Dufrenne et *al.*, 1995, Andersson et *al.*, 1995).

#### I. 3. 2. Thermo résistance des spores *Bacillus cereus* :

La spore de *Bacillus cereus* résistante à la chaleur. Cette résistance est décrite par la mesure de la valeur D, ou temps (en général exprimé en minutes) nécessaire à une

température donnée pour réduire la concentration du germe au  $1/10^e$  ( $10^{-1}$ ) de sa valeur initiale. La valeur Z est l'élévation (ou l'abaissement) de température qui permet de réduire (ou multiplier) D au  $1/10^e$  de sa valeur initiale (ou par 10) (Dromigny, 2008).

Cependant, la thermo résistance de *Bacillus cereus* n'est pas très élevée, comparativement à celle de *Clostridium botulinum*, comme le soulignent. Et qui proposent pour cette raison une température de référence de 100 °C au lieu de 121.1 °C. Pour cette raison, beaucoup des valeurs  $D_{T^{\circ}C}$  de *Bacillus cereus* sont citées à une température allant de 85 °C à 100 °C (Dromigny, 2008).

**Tableau 04 :** Thermorésistance de diverses espèces (Jérôme et al., 2008).

<b>Espèces</b>	<b><math>D_{120^{\circ}C}</math> (en s)</b>
<i>Clostridium tetani</i>	5
<i>Bacillus subtilis</i>	5 à 10
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	4 à 5
<i>Bacillus stéarothermophilus</i>	4 à 5
<i>Desulfotomaculumnigrificans</i>	2 à 3
<i>Bacillus coagulans</i>	0.1
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.1 à 0.5
<i>Clostridium botulinum A ou B</i>	0.1 à 0.2
<i>Bacillus anthracis</i>	1 à 6

### **I.9.3. Facteurs influençant la thermo-résistance**

Divers facteurs peuvent fortement influencer la thermo-résistance des spores. Pendant de nombreuses décennies, seule la température était prise en compte dans le calcul des barèmes de pasteurisation et de stérilisation. La tendance actuelle est l'intégration de nouveaux facteurs environnementaux jouant également un rôle prépondérant tels que le pH et l'activité de l'eau (Merzougui et al., 2013).

- Le pH est connu pour avoir une forte influence sur la résistance thermique des micro-organismes. Un pH acide (pH = 4) du milieu lors du traitement peut provoquer une résistance thermique plus faible de spores, comparé à un pH neutre. Les spores de *B. cereus* ATCC 4342 ont montré une résistance plus faible lorsque le pH de sporulation était de 5.5, par rapport à un pH égal à 7 (Merzougui et al., 2013).
- L'activité de l'eau ( $a_w$ ) est, tout comme le pH, un élément essentiel dans la détermination de la thermo-résistance des microorganismes. A l'inverse d'un pH bas, qui favorise la destruction thermique, une faible  $a_w$  lors du traitement provoquera une augmentation de la résistance à la chaleur. En revanche, une faible activité de l'eau (<0.98) du milieu de récupération a montré une inhibition de la germination et de la croissance de spores de *B. cereus* (Merzougui et al., 2013).

### I. 3. 4. Origine de la résistance thermique

D'après Cazemier et al. (2001), la résistance aux fortes températures serait due à trois facteurs principaux : la déshydratation du protoplaste - la minéralisation et l'adaptation thermique.

Le premier facteur est inhérent au micro-organisme puisque la résistance thermique dépend de la température optimale de croissance. Généralement, les bactéries thermophiles produisent des spores plus thermorésistantes et les bactéries psychrophiles produisent des spores moins thermorésistantes. Le second facteur est lié à l'hydratation de la spore, plus une spore est déshydratée, plus elle est résistante aux traitements thermiques. Le troisième facteur est lié au type de minéralisation de la spore, pour les spores déminéralisées, la valeur de D diminue mais la valeur de  $z_{T^{\circ}C}$  augmente. Ces valeurs dépendent de la composition en sodium, calcium, magnésium, manganèse, potassium,...etc. (Sugiyama, 1951).

## **Partie II**

### **Partie expérimentale**

## **II. 1. MATERIEL ET METHODES**

## II. 1. Matériel et méthodes

La totalité des manipes a été réalisée au laboratoire pédagogique de microbiologie de département SNV, centre universitaire d'Ain Témouchent.

### II. 1. 1. Description de la région d'étude

Aïn Témouchent, située à l'extrémité occidentale de la haute plaine du Sahel oranais se trouve à 504 km à l'ouest d'Alger La ville occupe une situation privilégiée en raison de sa proximité de trois grandes villes de l'ouest de l'Algérie : Oran, Sidi Bel Abbes et Tlemcen.

### II. 1. 2. Échantillonnage, prélèvement et transport des échantillons des épices

Les échantillons des épices utilisées pour assaisonner le Doner Kabeb ont été prélevés de différentes épiceries de la région d'Ain Témouchent (Tableau 05). Pour la ville d'Ain Témouchent (plus grande dans la wilaya), les zones de prélèvement ont été repérées suivant la méthode aréolaire décrite par Grawitz (2011). Elle consiste à encercler des zones d'échantillonnage sur la carte de la ville d'Ain Témouchent (cf. Figure 3) puis prélevé des échantillons des épiceries de la zone repérée. Cependant, pour les autres 4 villes, les prélèvements ont été effectués à partir des épiceries disponibles et/ou ceux vendre les épices de Shawarma. En effet, certaine ville ne présente pas des épiceries.

**Tableau 05 :** Différentes villes de prélèvement des épices d'assaisonnement de Shawarma « Région d'Ain Témouchent ».

Ville	Nombre d'épicerie	Nombre des échantillons
Ain Témouchent	25	13
Hamma Bouhadjar	7	4
Hassi ghala	5	2
Sidi ben Adda	4	3
Targa	1	0
El Malah	2	0



**Figure 03 :** Illustration de points de ventes et de prélèvement des épices de la région d Ain Témouchent. ★ Points de prélèvement.

Comme montre le tableau 05 ; au total 22 échantillons des épices utilisées pour assaisonnement le Shawarma ont été prélevés de certains ville de la région d'Ain Témouchent. Les échantillons ont été prélevés dans leur emballage et conditionnement de vente puis transféré au laboratoire pour l'analyse à la température de vente.

### II. 1. 3. Recherche, dénombrement *Bacillus cereus sensu lato*

La recherche et le dénombrement de *B. cereus sensu lato* ont été effectués selon la procédure d'AFNOR (1995). Le dénombrement des souches de *Bacillus cereus* a été effectué selon les étapes suivantes :

#### II. 1. 3. 1. Préparation des échantillons des épices et leurs dilutions

A l'aide d'une cuillère stérile, une quantité de 25g d'épice ont été pesé aseptiquement puis mise dans 250 mL d'eau peptonée. Cette dilution constitue la dilution  $10^{-1}$ .

Les dilutions étaient ensuite portées au bain marie à  $80^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min. Ce traitement thermique permet d'éliminer la flore végétative omniprésente dans les épices. Ensuite, une série des dilutions décimales ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ ).a été réalisée dans l'eau physiologique stérile (. figure 5).



**Figure 04** : Dilutions des épices analysées à partir de dilutions traitées à  $80^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min, pour l'échantillon de SHB 10 prélevé le 25/03/2019 de la ville d'Ain Témouchent.

### II. 1. 3. 2. Dénombrement et isolement des *Bacillus cereus sensu lato*

La procédure suivie est inspirée de celle décrite par AFONR (1995). Un volume de 0,5 mL de chaque dilution était étalé à la surface de la gélose Mossel (Peptone 10,0 g ;Extrait de viande 1,0 g ; Mannitol 10,0 g ;Jaune d'œuf ;Sulfate de Polymyxine B 0,01 g ; Rouge de phénol 0,025 g et Chlorure de sodium 10,0 g) coulée dans des boîtes de Pétri. Ensuite, les cultures ont été incubées à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 48 h pour tous les échantillons.

### II. 1. 3. 3. Purification des isolats de *B. cereus sensu lato*

La purification des isolats consiste à prélever une öse de colonies repérées puis étaler en strie suivant la technique de cadrant sur milieu nutritif gélosé. Les pré-cultures étaient

incubées à 30°C pendant 48h. Une succession de étalement a été réalisé jusqu'au l'obtention des colonies bien séparées.

### **II. 1. 3. 3. 1. Confirmation de la pureté des isolats**

Pour confirmer la pureté des isolats obtenus, nous nous sommes basés sur l'observation macroscopique de l'aspect des colonies puis par l'observation microscopique des cellules après coloration du Gram.

### **II. 1. 3. 3. 2. Confirmation de l'authentification d'appartenance au groupe *B. cereus***

Les procédures d'AFNOR (1995) et Jeffery Rhodehamel et *al.* (2001) ont été utilisées afin de confirmer l'appartenance de *B. cereus sensu lato* isolé.

La confirmation de l'authentification consiste à réaliser :

#### **II. 1. 3. 3. 2. 1. Recherche de catalase**

La recherche de catalase s'effectuait en déposant une goutte d'eau oxygénée sur une lame, après l'ajout de la colonie on peut déterminer la capacité de la bactérie à dégrader l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### **II. 1. 3. 3. 2. 2. Test mannitol-mobilité**

C'est un test permettant à la fois la détermination de la mobilité de la bactérie ainsi que sa capacité à fermenter le mannitol.

##### Milieu utilisé

Le milieu utilisé est ce de mannitol mobilité en tubes à essai.

##### Ensemencement

L'ensemencement des milieux se réalisait par piqure centrale.

##### Incubation

Les tubes de mannitol mobilité étaient incubés à 30°C pendant 48h.

##### Lecture des résultats

Le virage de la couleur rouge en jaune indique la fermentation du mannitol. La formation de stries autour de la piqure est indiquée la mobilité de cellules de *Bacillus cereus* présumé.

#### **II. 1. 3. 3. 2. 3. Recherche de l'hémolysine**

La recherche de l'hémolysine consiste à :

### Préparation du milieu

La gélose nutritive à 5% du sang de cheval citraté était utilisée pour la mettre en évidence la production de l'hémolysine.

### Ensemencement

Les boîtes coulées précédemment étaient ensemencées par touches et/ou par striées.

### Incubation

Les boîtes ensemencées étaient incubées à 30°C pendant 48h.

### Lecture des résultats

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

## **II. 1. 4. Production et conservation des spores de *Bacillus cereus sensu lato***

### **II. 1. 4. 1. Préparation de pré-cultures**

Les isolats obtenus ont été ensemencés dans un milieu BHI puis incubées à 30°C pendant 48h.

Un volume de 0,5 mL de la pré-culture était étalé sur la surface du milieu nutritif gélosé supplémenté par 40mg/L et 100mg/l de MnSO<sub>4</sub> et de CaCl<sub>2</sub> respectivement en boîtes de Pétri. Ensuite, les boîtes ensemencées étaient incubées à 37°C pendant un temps nécessaire à la sporulation de la population bactérienne (05 jours).

### **II. 1. 4. 2. Récupération et lavage de culot des spores de *B. cereus sensu lato***

Après 05 jours d'incubation, lorsqu'un tapis se forme à la surface de la gélose nutritive, 2 à 3 mL d'eau distillée stérile était versée sur chaque boîte. Le tapi de spores ainsi formées était raclé avec une pipette Pasteur sous forme de râteau, puis récupérées dans des tubes stérile pour subir une série (3 fois) de centrifugations à 4000t/m pendant 5 minutes. Le surnageant était jeté à chaque centrifugation puis relavés les culots. A la fin de série de lavage (3 fois), un volume eau/éthanol (pour détruire les formes végétatives) a été ajouté puis gardé à 4°C pendant une nuit. En fin, le mélange était récupéré puis centrifugé. Ensuite, 500µl de l'eau distillée stérile a été ajoutée au culot pour former un stock de spores de 10<sup>11</sup> spores/mL (estimation faite après dénombrement classique sur gélose nutritive).

### **II. 1. 5. Étude de la thermorésistance de spores des isolats**

Le traitement thermique de spores de chaque isolat a été effectué à trois températures 90°C, 95°C et 98°C. Au total 3 isolats ont été sélectionnés au hasard .

Le traitement consiste à diluer 10µL de spores dans 9mL de milieu BHI. Ensuite, 1mL a été transféré dans 8 tubes à essai stérile. Les 8 tubes étaient ensuite apporté au bain marie à la température désirée. Ensuite, à chaque intervalle du temps (pas de 5 minutes), le tube était retiré puis refroidir rapidement dans la glace. Le tube  $t_0$  était dénombré sans traitement thermique.

A partir de chaque tube traité thermiquement (correspond à un temps fixe), une série de dilution était réalisée dans de l'eau physiologique. Un volume de 1mL était ensemencé par profondeur dans le milieu nutritif gélosé. L'incubation était effectuée à 37°C pendant 24h.

### II. 1. 5. 1. Dénombrement de spores de *Bacillus cereus sensu lato*

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

$$N \left( \frac{ufc}{mL \text{ ou } g} \right) = \frac{\Sigma c}{V(n1 + 0.1n2)d}$$

Où :

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

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

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

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

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

### II. 1. 6. Détermination des paramètres de la thermorésistance

Dans cette étude, le modèle de Weibull non linéaire adapté par Mafart et al. (2002) a été utilisé pour quantifier la thermorésistance des isolats :

$$\text{Eq 1} \quad \log N = \log N_0 - \left( \frac{t}{D_{T^\circ C}} \right)^p$$

$N_0$  (ufc) : représente le nombre initial de spores ;

$N$  (ufc) : le nombre de cellules au temps  $t$  ;

$D_{T^{\circ}C}$  : le paramètre d'échelle représente le temps nécessaire à détruire 90 % de la population initiale ;

$p$  paramètre de forme renseigne sur la courbure de la cinétique. Si  $p > 1$  : la courbe est concave, si  $p < 1$  : la courbe est convexe et si  $p = 1$  la courbe est linéaire.

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

Par ailleurs, l'influence de la température sur la résistance à la chaleur bactérienne a été quantifiée par le paramètre de sensibilité classique  $Z_T$  montré dans l'équation 2 (Bigelow, 1921) :

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

$z_T$  correspond à l'écart de température permet à augmenter ou diminuer la valeur de  $\delta$  en facteur de 10.

---

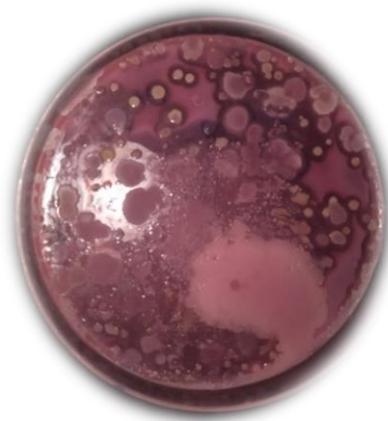
## **PARTIE II**

### **II. 2. RESULTATS ET DISCUSSION**

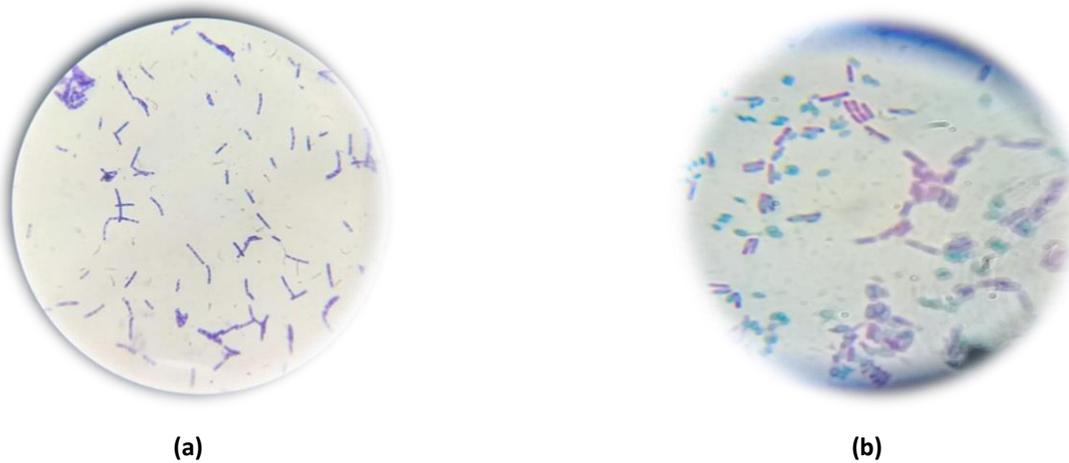
### II. 2. 1. Isolements et purifications souches :

Les colonies à différents aspects macroscopiques étaient apparues. Une colonie, dont l'aspect est différent, de chaque échantillons a été repérée pour éviter l'isolement de même isolat.

Au total 20 isolats ont été retenus selon les critères de sélection correspond au groupe de *Bacillus cereus*. C'est-à dire résistante à la polymixine, ne fermente pas le mannitol (rouge), halo claire (production de la lécithinase (Figure 05), hémolyse positive (Figure 05), catalase positive, Gram positif (Figure 06(a)), de forme bacillaire avec une endospore paracentrale(Figure 06(b)). Par ailleurs, le caractère de la thermorésistance est déjà prouvé par sa présence après traitement thermique à 80°C pendant 10min.



**Figure 05** : Aspect macroscopique des isolats de *Bacillus* spp sur milieu Mossel nutritif gélosé. a : isolats (SHB 08).



**Figure 06 :** Résultat d’observations microscopiques après la coloration de Gram (a) et coloration de vert de malachite (b) (Observation par microscope optique G×100 a immersion).

## II. 2. 2. Dénombrement de *Bacillus* spp

L’un des objectifs était de compter le nombre de *Bacillus cereus* dans les épices de Shawerma vendu dans la ville d’Ain Témouchent. Après traitement thermique à 80°C/10min, 100% des échantillons analysés sont contaminés par *Bacillus* spp. dont le nombre de spores comprise entre 2.9 log et 5.1 log (Tableau 05). Ces résultats sont en concordance avec les résultats montrés par Folly sand Kischnerova (2006). Ces auteurs ont montré une contamination moyenne de 3 log dans les épices.

Les *Bacillus* principalement sont considérés comme les contaminants les plus importants dans les points de vende des épices (Murphy et al., 1999, Ronimus et al., 2003 , Seale et al., 2008, Yuan et al., 2012). Elles sont essentiellement des indicateurs d’hygiène et résulte de non-respect de bonne pratiques de traite et d’hygiène comme expliqué par Meer et al.(1991), Te Giffel et al. (1997). Elles sont responsables d’altérations dues à leur propriété acidifiantes et leur potentiel enzymatique (Burgess et al., 2010).

### II. 2. 2. 1. Prévalence et dénombrements

L’un des objectifs de cette étude était de compter le nombre de *B. cereus sensu lato* dans les épices utilisées pour assaisonner le Shawarma dans la région d’Ain Témouchent. Comme montre le tableau (05) ci-dessous, l’ensemble des échantillons prélevé de différente ville de la région de Ain Témouchent était contaminé par les spores de groupe de *B. cereus*.

Cette prévalence est élevée par rapport à celle (89%) reportée par les travaux de Thomas et Brown (1976). Ces bactéries sont inévitable dans ce type de produits non stérile et à forte contact avec l'environnement.

### II. 2. 2. 2. Niveau de contamination d'épices par les spores de groupe *B. cereus*

Comme montre le tableau (05) les concentrations de *B. cereus* sensu lato s'oscillent entre 1.0 et 5.13 log ufc/g. Malgré que le nombre des échantillons analysés n'est pas le même pour chaque ville pour comparer les résultats, mais des concentrations élevées ont été observées pour la ville de Hassi el ghala contrairement à la ville de Sidi Ben Ada, avec une faible concentration de [1,5 à 3,2].

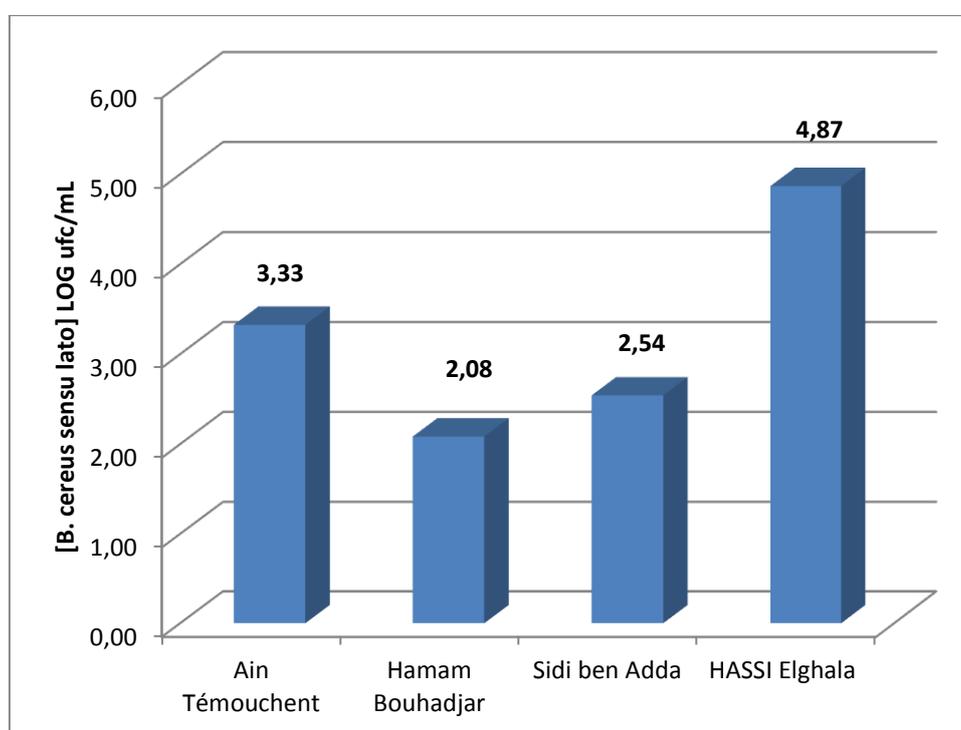
Comme était remarqué durant les prélèvements des échantillons, les épices dont les concentrations de *B. cereus* sensu lato sont très élevées sont issues des épiceries à une activité lente, récession de produit qui dépend de nombre élevé de magasin à la ville de Ain Témouchent, quartier à faible fréquentation, Par ailleurs, récession de produit pendant une long durée, provoque certainement la germination et la croissance de ces bactéries. En plus, pour d'autre ville préfère d'acquérir les épices de centre ville de chef lieu de la wilaya et/ou n'ont pas l'habitude d'utiliser ce type des épices en préférant de le formuler toute seule. D'autre facteur influant probablement la concentration est l'origine des épices et leurs conditions de stockage durant le transport, stockage, distribution...etc.

Le manque d'hygiène de certaines épiceries augmente certainement le niveau et la proportion de ces bactéries ubiquitaires.

La proportion et la concentration de ces spores dans les épices est probablement liés aux étapes de fabrication : plantation et récolte de végétale, procédés de transformation des épices, même si il y a un bon nettoyage, les spores persistent dans les épices surtout qu'il s'agit un produit non stérile et ces microorganismes sont résistants aux conditions hostiles et s'attachent aux surfaces.

**Tableau 06** : Prévalences des échantillons de différentes villes de la région.

Ville	Nombre d'échantillon	Intervalle
Ain Temouchent	13	[1.3-5.1]
Hamem Bouhadjer	4	[1.0-4.0]
Sidi ben ada	3	[1.5-3.2]
Hassi el Ghala	2	[4.7-4.9]



**Figure 07** : Concentrations (log ufc/mL) de *B. cereus* Échantillons de différentes villes de la région d'Ain Témouchent

### II. 2. 3. Étude de la thermorésistance des spores bactériennes

Comme montre la figure 08, les cinétiques de la survie ont montré des formes non log linaires pour les isolats (04 et 08) et linaires pour la souche de *Bacillus cereus* 03. Ces cinétiques ont été décrites par le modèle de Weibull développé par Mafart et *al.* (2002). La courbure des cinétiques concave ou convexe est quantifiée par le paramètre de la forme « p ».

L'isolat de *Bacillus cereus* 03 a une cinétique de destruction linéaire dont  $p=1$ . Cependant les cinétiques non linéaire ont un  $p$  différent de 1. Pour  $p$  supérieurs à 1, la courbe prend une forme concave comme celles des souches *Bacillus cereus* 04. Cependant pour  $p$  inférieure à 1, la courbe est de forme convexe comme celle obtenue pour la souche *Bacillus cereus* 08. Les résultats montrent que la forme de la cinétique ne dépend pas de l'espèce mais plutôt de l'isolat traitée avec des coefficients d'ajustement sont satisfaisants qui compris entre 0,80 et 0,90. Ces résultats sont en concordance avec les résultats de Ziane *et al.* (2014, 2016).

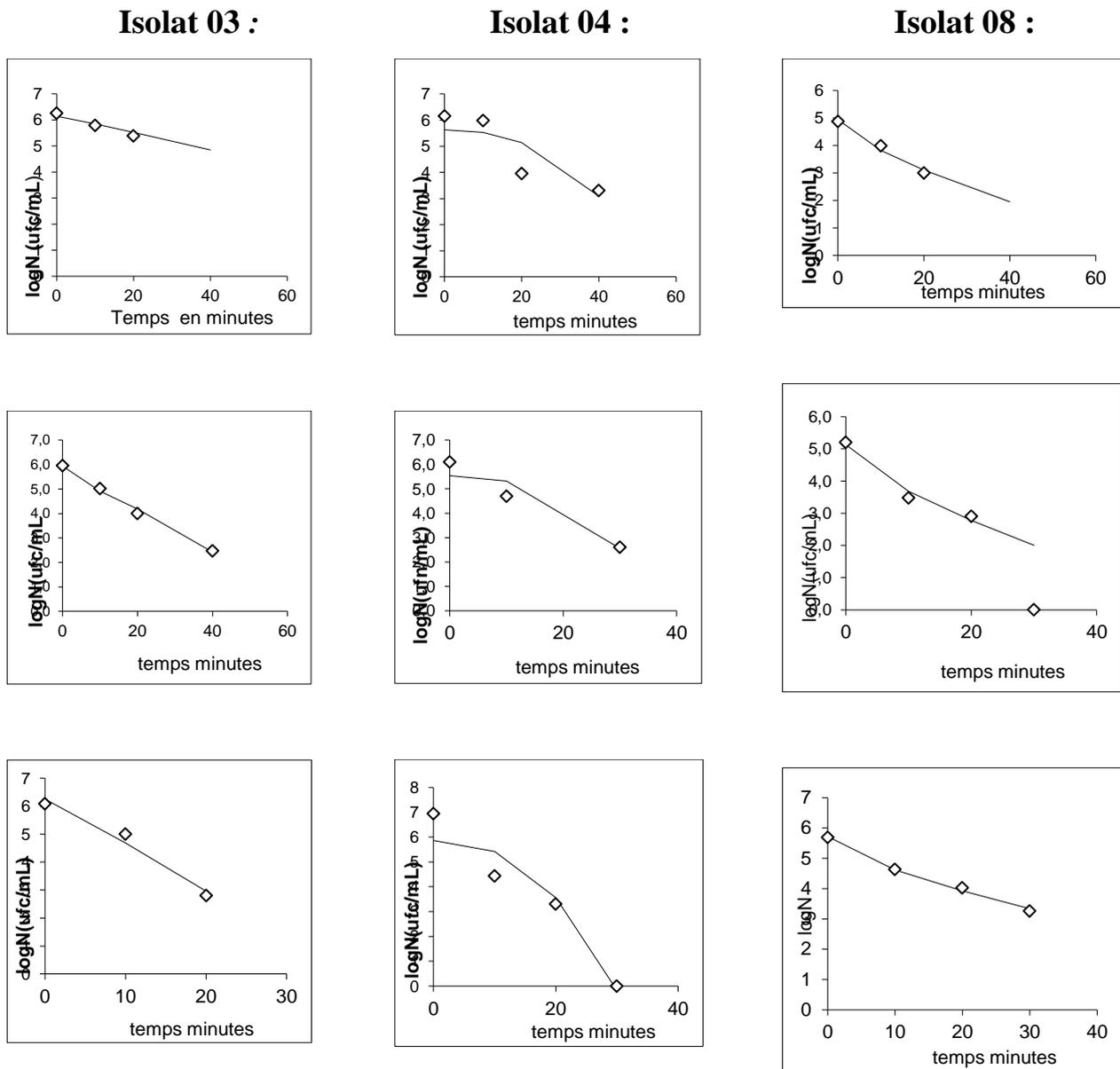


Figure 08 : Cinétiques de destruction des isolats de *B.cereus*.

Parmi les 3 souches sélectionnées, de grandes différences de résistance à la chaleur ont été observées. Les valeurs de  $D_{90^\circ\text{C}}$  étaient comprises entre 8.5 min et 31.5min et  $D_{95^\circ\text{C}}$  de 5.7 min à 19 min et  $D_{98^\circ\text{C}}$  de 4.2 min à 14 min.

La thermorésistance des isolats testés a été étudiée à différentes températures de  $90^\circ\text{C}$ ,  $95^\circ\text{C}$  et  $98^\circ\text{C}$ . Les résultats de la thermorésistance sont illustrés sur le tableau (06). Les valeurs de  $D_{T^\circ\text{C}}$  sont estimées après l'ajustement de courbes  $\log N(\text{ufc/mL})$  versus temps (min) de traitement.

Les valeurs de  $D_{T^\circ\text{C}}$  sont inversement proportionnelles à la température du traitement. Les résultats ont montré également que les valeurs de  $D$  sont dépendantes de l'isolat. En effet, les isolats souche 03 et souche 04 ont montré des valeurs de  $D_{T^\circ\text{C}}$  élevées par rapport à l'isolat souche 08 Quelle que soit la température testée. Dans cette étude, les valeurs de  $D$  sont plus élevées que celle montré par Mazas et *al.* (1999) et Ziane et *al.* (2014, 2016). Ces auteurs ont montré que les valeurs de  $D_{T^\circ\text{C}}$  comprise entre 0,90 et 2 minutes. Cependant ces valeurs sont beaucoup plus faibles par rapport aux valeurs montrées par Brerendsen (2006) et Benamarra et *al.* (2016), Par ailleurs, Janstova et Lukasova (2001) ont montré des valeurs de  $D_{T^\circ\text{C}}$  concorde avec Les valeurs reportées pour les isolats souches 03et 04.

Par ailleurs, les valeurs  $z_{T^\circ\text{C}}$  de la sensible au traitement thermique étaient comprise entre  $28.58$  et  $11.52^\circ\text{C}$ . La plus haute valeur était observée chez l'isolat 04 avec  $28.58^\circ\text{C}$ , tandis que pour la souche 08 et 03,  $26.78^\circ$  et  $26.76^\circ\text{C}$  respectivement.

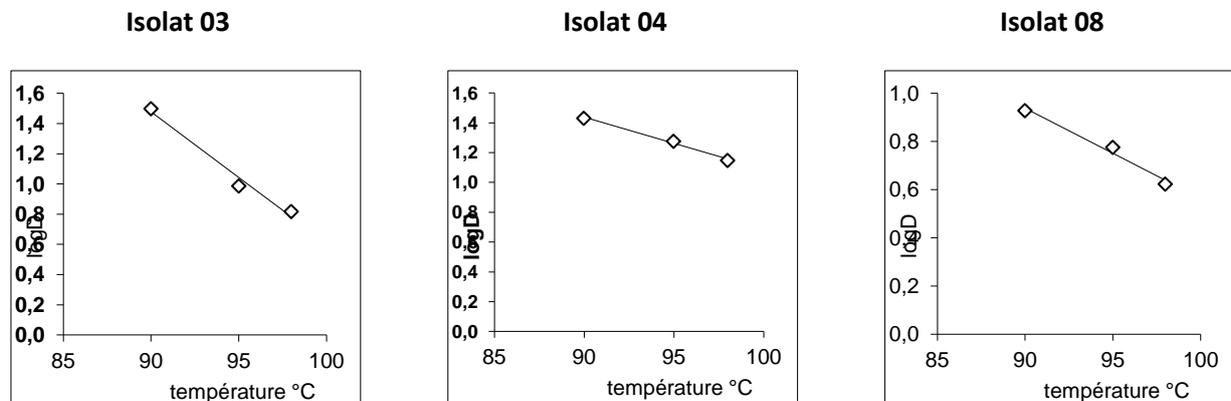
Les résultats sont comparables aux valeurs  $z$  rapportées par Berendsen et *al.* (2015) et Benamarra et *al.* (2016), tandis que Luu-Thi et *al.* (2014) ont reporté des valeurs faibles.

Par contre la valeur de  $z$  rapportée par Ziane et *al* (2014, 2016) de *B. cereus* isolées de couscous est élève entre  $16.13$  à  $22.15^\circ\text{C}$ .

**Tableau 07 :** Valeurs des paramètres de thermorésistance (D- value (min) et Z value (°C)) des isolats testés à différentes températures.

	Isolat 03		Isolat 04		Isolat 08	
	D (min)	R <sup>2</sup>	D (min)	R <sup>2</sup>	D (min)	R <sup>2</sup>
<b>90</b>	31.5	0.97	27	0.83	8.5	0.995
<b>95</b>	9.7	0.99	19	0.941	5.7	0.941
<b>98</b>	6.6	0.98	14	0.954	4.2	0.997
<b>P</b>	1.07		2.369		0.7	
<b>z</b>	11.52		28.58		26.78	
<b>R<sup>2</sup></b>	0.99		0.996		0.99	

:



**Figure 09 :** Cinétiques de sensibilités ( $z_{T^{\circ}C}$ ) de *B. cereus* au traitement thermique.

## **CONCLUSION**

### Conclusion

La flore thermorésistante telle que le groupe de *Bacillus cereus* est très souvent rencontré dans les produits subit un traitement thermique et/ou déshydraté (à faible activité d'eau). Après, germination de ces microorganismes dans la denrée alimentaire, elles peuvent provoquer des intoxications.

Les objectifs de cette étude étaient de rechercher et dénombrer les *B. cereus* sensu lato dans les épices d'assaisonnement des épices ainsi que d'étudier la thermorésistance de certains isolats.

L'ensemble des échantillons analysés étaient contaminés par *B. cereus* sensu lato ont les concentrations comprises entre  $10^{-1}$  et  $10^{-4}$ . Une forte concentration ont été observé à la ville Ain Témouchent. Par ailleurs, la thermorésistance de trois isolats ont été réalisé sur le total de 21 isolats obtenus. Les résultats montrent la dépendance de la thermorésistance à l'isolat.

En effet, Les résultats montrent que ces bactéries présentent à des concentrations élevées qui peuvent atteindre des concentrations critiques durant la préparation et la consommation de Döner Kabeb « Shawarma ».

Comme perspective à ce travail, les isolats de spores de *Bacillus cereus sensu lato* doit être identifiée par le séquençage de gène panC. Puis validé leur thermorésistance et leur croissance dans cette matrice alimentaire pour établir un modèle d'évaluation d'exposition à ce pathogène.

## **Annexe 01 : les milieux de culture**

**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
Émulsion de jaune d'oeuf .....	10ml
Solution de polymixines B .....	1ml

### **Mossel de base :**

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

### **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 distilliez 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 surnagent et

Ajouter stérilement 10ml dans chaque flacon contenant le milieu Mossel de base stérile en

Surfusion.

### **BHI: (Brain Heart Infusion agar)**

Pour 1 litre de milieu :

Extrait cœur-cervelle .....	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

**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.

**Gélose nutritif:**

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

**GN de sporulation :**

GN.....	1L
Mnso4.....	40mg/l
Cacl2.....	100mg/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 :**

#### **Prélèvement :**

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 un 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
- réalisé 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 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

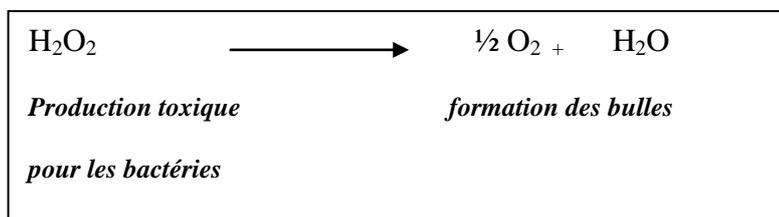
## Annexe 03 :test de catalase

### 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 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 –**

## **REFERENCES**

1. Abbas A.A. (2014). Effet de l'absence d'oxygène sur la capacité de sporulation et les propriétés des spores de *Bacillus cereus*. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et des pays de Vaucluse. 12-29.
2. Benamara R.N., Ziane M., Medjahdi K. and Moussa- Boudjemâa B. (2016). Identification et caractérisation de spores de *Bacillus cereus* isolées de fromages fondus fabriqués en Algérie. *African Journal of Microbiology Research*. 10, 1173-1181.
3. Berendsen E.M., Zwietering M.H., Kuipers O.P. and Wells-Bennik M.H. (2015). Two distinct groups within the *Bacillus subtilis* group display significantly different spore heat resistance properties. *Food Microbiology*. 45, 18-25.
4. Borget M. (1993). Spice Plants . *CTA/MacMillan*.
5. Bryan F.L. (1972). Emerging foodborne diseases. Factors that contribute to outbreaks and their control. *Journal of Milk and Food Technology*. 35, 632-638.
6. Chirane N., Frenette Y., Sari-Minodier I. and Gérin M. (2009). Evaluation du risque à la santé lié à l'exposition des travailleurs aux poussières d'épices. 2, 28-31.
7. De Boer E.W., Spiegelberg M. and Janssen E.W. (1985). Journal of Microbiology of spices and herbs. *Antonie van Leeuwenhoek*. 51, 435-438.
8. Drobniowski F.A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Journal of Clinical Microbiology Reviews*. 6, 324-338.
9. Dromigny E. (2008). *Bacillus cereus* . *Edition Lavoisier*. 1-233.
10. Dufrenne J., Bijaward M., Te Giffel M. and Nothermans R. (1995). Characteristics of some psychrotrophic *B. cereus*. *International Journal of Microbiology*. 27, 75-183.
11. Ehling-Schulz M.N., Vukov A., Schulz R., Shaheen M., Andersson E., Märklbauer D. and Scherer S. (2005). Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 71, 105-113.
12. Fakhry S.S., Jessim A.I., Alwash S.J. (2015). Characterization of *Bacillus spp.* isolated from spices collected from Iraqi markets. *International Journal of Advanced Research*. 3, 290-295.

13. FAO (1995). Quality assurance for small-scale rural food industries. Chapter 2.4 Herb and spice products. agricultural services bulletin 117, [www.fao.org/docrep/v5380e/v5380e09.htm](http://www.fao.org/docrep/v5380e/v5380e09.htm).
14. Foster S.J. and Johnstone K. (1990). Pulling the trigger: The mechanism of bacterial spore germination. *Journal of Molecular Microbiology*. 4(1), 137-41.
15. Francis K.P. Mayr R. von Stetten F. Stewart G. and Scherer S. (1998). Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. *Journal of Environment and Microbiology*. 64, 3525-352.
16. Goepfert J.M., Spira W.M. and Kim H.U. (1972). *Bacillus cereus*: food poisoning organism. A review. *Journal of Milk Food Technology*. 35, 213-227.
17. Gombas D. ( 1983). Bacterial spore resistance to heat. *Food Technology*. 105-110.
18. Guinebretière M.H., Thompson A., Sorokin P., Normand P., Dawyndt M., Ehling-Schulz B., Svensson V., Sanchis C., Heyndrickx M. and De Vos P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Journal of Environmental Microbiology*. 10,851-865.
19. Harrigan W.F. and McCance M.E. (1966). Laboratory methods in microbiology. Academic Press. London and New York . 133.
20. Kotiranta A., Lounatmaa K. and Haapasalo M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*. 2, 189-198.
21. Kramer J.M ., Gilbert R.J. (1989) .*Bacillus cereus* and other Bacillus species. *Journal of Food borne Bacterial Pathogens (Doyle MP, ed)*. 21-70. Marcel Dekker, New York.
22. Lequette Y., Garenaux., Tauveron G . (2011). Role Played by Exosporium Glycoproteins in the Surface Properties of *Bacillus cereus* Spores and in Their Adhesion to Stainless Steel. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 77, 4905-4911.
23. Merzougui S., Lkhider M. and Cohen N. (2013) .*Bacillus cereus*, un réel problème pour l'industrie agro alimentaire?. *ScienceLib Editions Mersenne*. 5, 130915.
24. Nevellier P. and Jolivet H. (1965). Epices, aromates, herbes et condiments. Modificateurs des caractères organoleptiques des denrées. *Annale de la nutrition et de l'alimentation*. 19(5), 449-480.

25. Noumi E. (1984). Les plantes à épices, à condiments et à aromes du Cameroun : Thèse de Doctorat 3<sup>e</sup> cycle en sciences biologiques. Faculté des sciences, Université de Yaoundé, Cameroun. 165.
26. NRI. (1993) .Ground and Packaged Spices : Options and Difficulties in Processing at Origin. Marketing Series 7 .
27. Powers E., Lawyer M.R. and Masuoka Y. (1975). Microbiology of processed spices. *Journal of Milk Food Techno.* 38,683-687.
28. Tapsell L.C., Hemphill I., Cobiac L., Sullivan D.R., Fenech M ., Patch C.S., Roodenrys S., Keogh J.B., Clifton P.M .,Williams P.G., Fazio V.A. and Inge K.E. (2006). Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *Medical Journal of Australia.* 185 (4), 1-24.
29. Turnbull P.C.B., Kramer J.M., Jorgensen K., Gilbert R.J. and Melling J . (1979) . properties and production characteristics of vomiting, diarrheal , and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. *American Journal of Clinical Nutrition.* 32, 219-228.
30. Ziane M., Couvert O., Le Chevalier P., Moussa-Boudjemaa B. and Leguerinel I. Identification and characterization of aerobic spore forming bacteria isolated from commercial camel's milk in south of Algeria. *Small ruminant research.* 137, 59-64.

### Résumé :

*Bacillus cereus* est connu pour être à l'origine de TIA dans les restaurants et notamment des Fast-Food. Leurs spores, sont thermorésistance et peuvent survenir dans les aliments cuits comme Doner Kabab « Shawarma ». Dans cet aliment, les épices sont de sources importantes en spores de *B. cereus*. Ce travail consiste à rechercher, dénombrer les cellules de *B. cereus* dans les épices d'assaisonnement de Shawarma ainsi que d'étudier leur thermorésistance. Les résultats montrent que l'ensemble des échantillons (20) analysés était contaminé. Par ailleurs, les concentrations s'oscillent entre 1 et 5,1 log (ufc/g).

Quant à la thermorésistance des spores traitées à différentes températures de 90°C à 98°C, les cinétiques de survie sont variable (linéaire, concave et convexe). L'isolat 03, plus thermorésistante était caractérisée par la valeur  $D_{90^{\circ}\text{C}}=31.5\text{min}$ ,  $D_{95^{\circ}\text{C}}=9.7\text{min}$ , et  $D_{98^{\circ}\text{C}}=6.6\text{min}$  respectivement et une valeur de  $Z_{T^{\circ}\text{C}}$  de 11.52°C. En revanche, l'isolat 03, le plus thermosensible, est caractérisée par la valeur  $D_{90^{\circ}\text{C}}=8.5\text{min}$ ,  $D_{95^{\circ}\text{C}}=7.5\text{min}$ , et  $D_{98^{\circ}\text{C}}=4.2\text{min}$  respectivement et une valeur de  $Z_T$  de 26.78°C.

Les résultats de ce travail peuvent être utilisés pour maîtriser le développement microbien dans le « Shawarma » et présente un outil de l'évaluation de l'exposition.

### Abstract:

*Bacillus cereus* is known as a causal agent of food poisoning at restaurants and especially fast food restaurant. Their spores are heat resistant and can occur in cooked foods like Döner Kabab "Shawarma". In this food, spices are important sources of *B. cereus* spores. This work consists of looking for and counting the *B. cereus* cells in spices using for Shawarma's as well as studying their thermo-resistance. The results show that all the samples (20) analyzed were contaminated. In addition, the concentrations belong between 1 and 5.1 log (cfu / g).

As for the heat resistance of spores treated at different temperatures from 90 °C to 98 °C, the survival kinetics are variable (linear, concave and convex). Isolate 03, more heat-resistant was characterized by the value  $D_{90^{\circ}\text{C}} = 31.5\text{min}$ ,  $D_{95^{\circ}\text{C}} = 9.7\text{min}$ , and  $D_{98^{\circ}\text{C}} = 6.6\text{min}$  respectively and a value of  $Z_{T^{\circ}\text{C}}$  of 11.52°C. On the other hand, isolate 03, the most thermosensitive, is characterized by the value  $D_{90^{\circ}\text{C}} = 8.5\text{min}$ ,  $D_{95^{\circ}\text{C}} = 7.5\text{min}$ , and  $D_{98^{\circ}\text{C}} = 4.2\text{min}$  respectively and a value of  $Z_{T^{\circ}\text{C}}$  of 26.78 °C.

The results of this work can be used to control microbial development in "Shawarma" and present a tool for exposure assessment.

### خلاصة:

من المعروف في المطاعم وخاصة مطاعم الوجبات السريعة. جراثيمها TIA هو أصل *Bacillus cereus* من المعروف أن مقاومة للحرارة ويمكن أن تحدث في الأطعمة المطبوخة مثل دونهر كباب "شاورما". في هذا الطعام ، تعد التوابل مصدرًا في توابل الشاورما والتوابل ودراسة *B. cereus* يتكون هذا العمل من البحث عن خلايا *B. cereus* مهمًا لجراثيم مقاومتها الحرارية. أظهرت النتائج أن جميع العينات (20) التي تم تحليلها ملوثة. بالإضافة إلى ذلك ، تتأرجح التركيزات (cfu / g) بين 1 و 5.

أما بالنسبة للحرارة المقاومة للجراثيم المعالجة في درجات حرارة مختلفة من 90 درجة مئوية إلى 98 درجة مئوية ، فإن درجة مئوية = 31.5 D90 حركة البقاء متغيرة (خطية ، مقعرة ومحدبة). عزل 03 ، يتميز أكثر مقاومة للحرارة بقيمة من 11.52 درجة  $Z_T^{\circ}\text{C}$  = 6.6 دقيقة على التوالي بقيمة D98 درجة مئوية = 9.7 دقيقة ، و D95 دقيقة ،  $D_{90^{\circ}\text{C}} = 8.5\text{min}$  ،  $D_{95^{\circ}\text{C}} = 7.5\text{min}$  ،  $D_{98^{\circ}\text{C}} = 4.2$  ، و  $Z_T^{\circ}\text{C}$  = 26.78 دقيقة على التوالي ، وقيمة 4.2 ، و D98 ° C ، و 7.5min . يمكن استخدام نتائج هذا العمل للتحكم في تطور الميكروبات في "الشاورما" وتقديم أداة لتقييم التعرض