



UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEN
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement
يكربولوجيا التطبيقية للاغذية للبيوطبي وللبيئة



MEMOIRE DE MASTER

Option : Science des Aliments

Présenté par

MEDANE Hanifa

Intitulé du mémoire

**Identification et caractérisation de la thermorésistance des
spores *Bacillus Cereus* isolées de la poudre de cacao**

Soutenu le 11-06-2017

Devant le Jury composé de :

**Pr Moussa Boudjemaa B
Dr Bendimerad N
Dr Bellifa S**

**Professeur
Maitres de conférences A
Maitres de conférences B**

**Promoteur
Présidente
Examinatrice**

Année universitaire : 2016-2017

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents pour leurs sacrifices et leurs encouragements

durant toutes mes années d'étude.

Mon frère, et mes sœurs.

Mon fiancé

Tous les membres du LAMAABE

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

MEDANE Hanifa

Remerciements

Je remercie le bon Dieu le tout puissant de m'avoir guidé, aidé et donné la foi et le courage pour accomplir ce travail.

En premier lieu je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon encadreur Monsieur *MOUSSA-BOUDJEMAA.B*, Professeur au département de biologie, pour ses conseils judicieux, sa précieuse assistance et surtout sa patience à mon égard. Sans son appui, ses encouragements et son suivi, ce travail n'aurait pu aboutir.

Un grand merci à *Madame BENDIMERAD. N*, Maitre de conférences classe A au département de biologie, et à *Madame BELLIFA. S*, Maitre de conférences classe B au département biologie, qui ont accepté de lire et d'évaluer ce travail.

Je remercie également tous les membres du laboratoire (*LAMAABE*), les enseignants de leurs très grands dévouements et surtout *Mm BAGHLI.H* et *M^{ll} MEDJJAHDI .K* pour leur aide précieuse.

Je tiens à remercier en outre tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

MERCI !

Résumé

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale 01

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1.Généralité sur le cacao.....03

1.1 Origine et histoire03

1.2 Production et consommation du cacao.....03

1.2.1 Culture de cacao.....03

1.2.2 Production mondiale des fèves de cacao..... 05

1.3 Les principales variétés cultivées de cacaoyer06

1.4 Le traitement post-récolte du cacao07

1.4.1 Récolte et écabossage07

1.4.2 La fermentation08

1.4.3 Séchage.....10

1.4.4 Stockage.....11

1.5 La transformation technologique des fèves de cacao11

1.6 Utilisations du cacao13

1.7 Microbiologie des fèves de cacao13

1.7.1 Maitrise de la charge microbologique initial (étape

fermentation).....	14
2. Les microorganismes et agent pathogènes et d'altération.....	16
2.1 Le genre <i>Bacillus</i> spp	16
2.2 Nomenclature et taxonomie.....	16
2.3 Caractères bactériologiques.....	20
2.4 Caractères physiologiques.....	21
2.5 Contamination et Intoxication alimentaire associées à <i>Bacillus sp</i>	23
2.6 Altérations des aliments	24
3. Groupe <i>Bacillus cereus</i>	24
3.1 Les taxons du « groupe <i>Bacillus cereus</i> ».....	25
3.2 Caractéristiques et classification	25
3.3 Caractère morphologique et structure cellulaire de <i>Bacillus cereus</i>	28
3.4 Généralités sur les problèmes causés par <i>Bacillus cereus</i> dans les industries agro-alimentaires.....	30
3.5 Pouvoir pathogène des <i>Bacillus Cereus</i>	31
3.6 Dose infectieuse	31
4. Thermo-résistance des spores bactérienne	32
A- Etapes et mécanismes de la sporulation (étapes morphologique).....	32
B- Température et germination sporale (<i>Bacillus cereus</i>)	35
C-Survie sporale et résistance de la spore à divers agents	36
5. Thermo résistance.....	36
5.1 Définition	36
5.2 Thermo résistance des spores <i>Bacillus cereus</i>	36

5.3 Facteurs influençant la thermo-résistance	37
5.4 Origine de la résistance thermique.....	38
5.5 Calcul des traitements thermiques.....	39
5.6 Effet du temps d'exposition à la chaleur.....	39

Chapitre II: Matériel et méthodes

1 Prélèvement des échantillons	42
2 la recherche de la flore aérobic sporulée mésophile dans les échantillons de la poudre de cacao.....	42
2.1 Milieux de culture	42
2.2 Préparation des échantillons.....	42
3 Isolement et purification des souches bactérienne	43
4 Conservation de souches	43
5 Caractéristiques de pré-identification des souches.....	44
5.1 Etude morphologique des isolats.....	44
5.2 Etude biochimique.....	45
5.3 Mise en évidence des enzymes respiratoires.....	45
5.4 Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires.....	45
5.5 Caractérisation des souches par la galerie API 20E.....	46
5.6 Étude de la thermorésistance.....	46
5.6.1 Préparation de la suspension sporale.....	46
6. Etude du traitement thermique.....	47
6.1 Description de l'appareil (Thermorésistomètre Mastia).....	47

6.2 Evaluation de la résistance d'une spore sélectionnée vis-à-vis un traitement thermique (Souche de référence)	51
6.3 Application du traitement thermique.....	52
6.4 Dénombrement des survivants.....	52
7 Analyse des données de survie des spores thermorésistantes.....	52

Chapitre III : Résultats et discussion

1 La recherche de la flore aérobie sporulée mésophile dans les échantillons de la poudre de cacao.....	54
1.1 Isolements et purifications souches.....	54
1.2 Pré-identification des souches bactériennes	54
2 Caractéristiques biochimiques des isolats.....	55
2.1 Identification biochimique.....	55
2.2 Résultats des plaques API20E.....	61
3 Etude de la thermorésistance d'une spore de référence de <i>Bacillus cereus</i> (ATCC)	64
Discussion.....	66
Conclusion générale	73

Bibliographie

Annexes

Liste des abréviations

- °C : degré Celsius
- Log : Logarithme
- UFC: unité formant colonie
- EDS : Eau DistilléStérile
- UHT : Ultra High Temperature
- µl : Microlitre
- D : le temps de réduction décimale
- GN : gélose nutritive
- aw : Activité d'eau
- V/V :Volume à volume
- UHT : Ultra Haute Température.
- ATCC :American Type Culture Collection

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux pays consommateurs de cacao	05
Tableau 2: Valeur nutritive de la poudre de cacao.....	13
Tableau 3 : Taxons de la famille des <i>Bacillaceae</i> appartenant au genre <i>Bacillus</i>	18
Tableau 4: Principales caractéristiques distinctives de certaines espèces de <i>Bacillus</i>	22
Tableau 5: Principales caractéristiques des espèces du groupe <i>Bacillus cereus</i> (souches types)	27
Tableau 6: Nouvelle classification du groupe <i>Bacillus cereus</i>	28
Tableau 7: Dimension des spores de bactéries du genre <i>Bacillus</i>	29
Tableau 8: Thermorésistance de diverses espèces.....	37
Tableau 9: Résultats de l'observation macroscopique et microscopique de 33 souches retenues, les résultats de quelques tests biochimiques.....	57
Tableau 10: Résultats des plaques API20E, des 25 souches sélectionnées.....	61
Tableau 11 : Temps de réduction décimale de spore <i>Bacillus Cereus</i> ATCC à différentes températures.....	65

Liste des figures

Figure 1: Cabosses de cacaoyer <i>Nacional</i> d'Equateur.....	04
Figure 2: coupe d'une cabosse de cacao.....	04
Figure 3: Coupe schématique d'une graine de cacao.....	04
Figure 4: Principales variétés de cacaoyer.....	06
Figure 5 : écabossage (détail).....	08
Figure 6 : Bilan des réactions microbiennes dans la pulpe du cacao en fermentation.....	10
Figure 7 : schéma de fabrication de la poudre de cacao et du chocolat.....	12
Figure 8 : phylogénie schématique du domaine de l'eubactérie, fondée sur le séquençage des ARNr 16S.....	17
Figure 9 : Gram variable, rod, <i>Bacillus subtilis</i>	20
Figure 10 : Gram variable, rod, <i>Bacillus cereus</i>	20
Figure 11: infection à <i>Bacillus cereus</i> chez l'homme.....	23
Figure 12: cellule non sporulante de <i>Bacillus cereus</i> microscopie électronique à transmission sur sections fines.....	29
Figure 13: Spore de <i>Bacillus cereus</i> en microscopie électronique à transmission.....	30
Figure 14: Ultrastructure d'une spore.....	32
Figure 15: Cycle de sporulation et germination de <i>B. subtilis</i>	33
Figure 16 : Les étapes de la germination chez <i>B. subtilis</i>	35
Figure 17: Exemple de courbes de réduction obtenues lors d'un traitement thermique.....	40
Figure 18: Thermorésistomètre Mastia : vue entière.....	48
Figure 19 : Thermoresistomètre Mastia : principaux composants.....	49
Figure 20: Générateur d'azote F-DGSi modèle NG3.....	51
Figure 21: Résultats d'observations microscopiques après la coloration de Gram (Observation par microscope optique G×100 a immersion).....	54
Figure 22 : Aspect macroscopique des colonies sur le milieu GN.....	55
Figure 23 : Test de la Catalase : Apparition de bulles de gaz.....	56
Figure 24: Aspect des colonies après 24 h d'incubation à 30 °C sur milieu gélosé de Mossel.....	56

Figure 25: Résultats des plaques API20E de quelques souches sélectionnée après l'ajouter des réactifs.....	63
Figure 26: Evolution de log N (UFC.mL ⁻¹) en fonction du temps de traitement thermique pour <i>Bacillus cereus</i> ATCC ; Température de traitement : 90°C.....	64
Figure 27: Evolution de log N (UFC.mL ⁻¹) en fonction du temps de traitement thermique pour <i>Bacillus cereus</i> ATCC ; Température de traitement : 100°C.....	64
Figure 28: Evolution de log N (UFC.mL ⁻¹) en fonction du temps de traitement thermique pour <i>Bacillus cereus</i> ATCC ; Température de traitement : 105°C.....	65
Figure 29: Sensibilité au traitement thermique de spore <i>Bacillus Cereus</i> (ATCC).....	65

Résumé

Bacillus cereus est connu pour être à l'origine de problèmes dans les industries alimentaires parce qu'il affecte la qualité et la sécurité des aliments. Les spores de *Bacillus cereus* peuvent résister à certains traitements thermiques utilisés dans les processus industriels et donc peuvent persister dans les produits finis. Le contrôle de ces spores reste en effet une opération très difficile. Il faut la maîtriser en ayant connaissance sur leurs origines, leurs caractéristiques et leur thermorésistance.

Les produits alimentaires déshydratés dont la poudre de cacao peuvent contenir des spores bactériennes. La poudre de cacao est soit réhydratée, soit ajoutée à d'autres ingrédients aqueux. Par conséquent, une contamination microbienne résiduelle pourrait évoluer et provoquer des problèmes sanitaires chez l'homme.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons dans un premier lieu isolé, identifié et caractérisé les spores de *Bacillus cereus* à partir de cinq échantillons de poudre de cacao importés et commercialisés en Algérie. 33 isolats ont été obtenus parmi lesquels, 25 se sont révélés appartenant au groupe *Bacillus cereus* dont 32% appartient à l'espèce *Bacillus cereus* 1, 16% à *Brevibacillus choshinensis/Centrosporus/brevis*, 12% à *Bacillus sphaericus/fusiformis/badius* 8% à *Bacillus cereus* 2, 8% à *Bacillus anthracis*, 8% à *Bacillus lentus*, 4% à *Geobacillus thermoglucosidiasus*, 4% à *Aneurinbacillus aneurinilyticus*, 4% à *Bacillus amylolique faciens*, et 4% à *Brevibacillus agri*.

Dans un deuxième lieu, Le thermoésistomètre Mastia a été utilisé pour une étude de la thermorésistance des spores d'une souche de référence de *Bacillus cereus* (ATCC). La suspension de spores a été injectée dans le thermorésistomètre et chauffée dans du BHIB pH7 à trois températures différentes (90, 100, 105°C), des courbes de survie des spores *Bacillus cereus* (ATCC) ont été établies. La spore ATCC 4243 est caractérisée par la valeur D_{90} , D_{100} , et D_{105} de 9.83, 1.69, 0.75 min respectivement et une valeur de Z_T de 13.51 °C.

Mots clés : *B.Cereus*, poudre de cacao, thermorésistance, Thermorésistomètre Mastia, Valeur D, Valeur Z.

Abstract

Bacillus cereus is known to cause problems in the food industry because it affects the quality and safety of food. *Bacillus cereus* spores can withstand some heat treatments used in industrial processes and therefore may persist in finished products. The control of these spores remains a very difficult operation. It must be mastered with knowledge of their origins, characteristics and heat resistance.

Dehydrated food products from which cocoa powder may contain bacterial spores. The cocoa powder is either rehydrated or added to other aqueous ingredients. Consequently, residual microbial contamination could evolve and cause health problems in humans.

As part of this memoir, we have first place isolated, identified and characterized *Bacillus cereus* spores from five cocoa powder samples imported and marketed in Algeria. 33 isolates were obtained, including *Bacillus cereus*, 8% *Bacillus anthracis*, 4% *Geobacillus thermoglucosidiasus*, 8% *Bacillus lentus*, 16% *Brevibacillus choshinensis* / *Centrosporus / brevis*, 32% *Bacillus cereus 1*, 4% of *Aneurinbacillus aneurinilyticus*, 4% of *Bacillus amylolique faciens*, 8% of *Bacillus cereus 2*, 4% of *Brevibacillus agri*, and 12% are *Bacillus sphaericus / fusiformis / badius*.

In a second part, the Mastia thermoesistometer was used for a study of the thermoresistance of spores of a reference strain of *Bacillus cereus* (ATCC). The spore suspension was injected into the thermoesistometer and heated in BHIB pH7 at three different temperatures (90, 100, 105 ° C), *Bacillus cereus* (ATCC) survival curves were established. The ATCC 4243 spore is characterized by the D90, D100, and D105 values of 9.83, 1.69, 0.75 min respectively and a ZT value of 13.51 ° C.

Key words: B.Cereus, cocoa powder, thermoresistance, Mastia thermoesistometer, D value, Z value.

الملخص

Bacillus cereus في صناعة المواد الغذائية فهي تؤثر على جودة وسلامة الأغذية .
Bacillus cereus تستطيع مقاومة الحرارة العالية المستعملة في العمليات الصناعية بالتالي تضل
المنتج النهائي. السيطرة على هذه الأبواغ تظل عملية صعبة وللتمكن منها يجب معرفة أصولها ,خصائصها,
مقاومتها للحرارة.

المنتجات الغذائية المجففة بما في ذلك مسحوق الكاكاو قد تحتوي على الأبواغ البكتيرية . مسحوق الكاكاو مثلا إما يضاف
إليه الماء,إما يتم دمج مع مكونات سائلة و بالتالي تسمّات يمكن أن تحدث نتيجة تطور البكتيريا مما يؤدي إلى مشاكل
صحية للإنسان .

في الجزء الأول من هذه الدراسة قمنا بعزل و تحديد و تمييز خمس عينات من متوجات مسحوق الكاكاو
: تم تحديد 33 سلالة، منها 25 :

8% *Bacillus anthracis*, **4%** *Geobacillus thermoglucosidiasus*, **8%** *Bacillus lentus*, **16%**
Brevibacillus choshinensis /Centrosporus / brevis, **32%** *Bacillus cereus 1*, **4%** des
Aneurinbacillus aneurinilyticus, **4%** des *Bacillus amylolique faciens*, **8%** *Bacillus cereus 2*,
Bacillus sphaericus / fusiformis/ badius. **12%** **4%** *Brevibacillus agri*,

Bacillus "Thermorésistomètre Mastia" ,
, (*4342 cereus*) , « thermorésistomètre » , حيث تم تسخينها في وسط
« BHIB » °C (90,100, 105). إنشاء منحنيات البقاء على قيد الحياة لأبواغ جرثومة
(*Bacillus cereus*) . الأبواغ المختارة تتميز بقيمة $D_{90^{\circ}C}$, $D_{100^{\circ}C}$, $D_{105^{\circ}C}$: 0.75 , 1.69 , 9.83
دقيقة على التوالي .وبقيمة $ZT: 13.5^{\circ}C$

الكلمات المفتاحية: *B.cereus* , , thermorésistomètre Mastia , قيمة D,
قيمة Z

Introduction générale

La chaîne de transformation des fèves de cacao (graines de fruits *Theobroma cacao* L.) pour la production de poudre de cacao commence dans les pays tropicaux, où les agriculteurs, après avoir récolté les cabosses de cacao, soumettent les graines à un processus de fermentation naturelle, [Lima *et al.*, in press; Schwan and Wheals, 2004] Sans ce procédé (fermentation), les fèves de cacao crues et séchées ne développent pas la saveur typique du cacao lors de la torréfaction [Afoakwa *et al.*, 2008].

Après la fermentation, les fèves de cacao sont séchées et expédiées dans des usines industrielles, où les produits intermédiaires ou finaux sont fabriqués [Anon., 1981; Kamphuis, 2009].

Bien que le terme "fermentation de cacao" soit largement utilisé, il ne désigne pas la fermentation des grains de cacao eux-mêmes, mais elle se réfère à l'activité combinée des microorganismes sur la pulpe entourant les graines et les transformations subséquentes dans ces derniers [Ferrão, 2002].

Alors que des microorganismes divers sont présents en grande quantité pendant la fermentation des fèves de cacao, les opérations de post-récolte et de transformation industrielles subséquentes ne permettent que la survie d'un micro biote dominé par le genre *Bacillus* et ses proches [Barrile *et al.* 1971].

La capacité des membres de ce groupe à former des endospores, dans certains cas de résistance à la chaleur extrême, implique qu'ils peuvent survivre aux processus industriels et poser des problèmes de détérioration et de sécurité [Huemer *et al.*, 1998; Oh et Cox, 2009; Oomes *et al.* ., 2007].

Certaines spores du genre *Bacillus* forment des spores hautement résistant à la chaleur qui peuvent survivre à la torréfaction [Barrile *et al.*, 1971], et de cette façon, persistent dans les produits finis dérivés du cacao [Gabis *et al.*, 1970].

Bacillus cereus est la 3ème cause de toxi-infection alimentaire collective. 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

Introduction générale

nombreuses années voire des milliers d'années, attendant ainsi le retour des conditions favorables. [Abbas, 2014]

Dans cette étude, nous déterminerons et identifierons la flore sporulée mésophile aérobie des *Bacillus cereus* dominantes de la poudre de cacao, nous évaluerons leur thermo-résistance.

Afin de réaliser nos objectifs nous avons mené notre travail en trois chapitres. Nous avons consacré le premier chapitre à l'étude bibliographique, dans ce dernier nous avons présenté les processus de production et de transformation post récolte des fèves de cacao jusqu'à l'obtention de la poudre de cacao, nous avons présenté en outre brièvement la microbiologie de la poudre de cacao

L'étude du genre *Bacillus* et notamment l'espèce *Bacillus cereus* fera l'objet de deuxième chapitre. Après un chapitre détaillant les matériels et méthodes mis en œuvre dans ce travail, et les résultats obtenus. Nous avons dénombré et recherché les spores bactériennes aérobies mésophiles dans la poudre de cacao et nous avons identifié les souches de *Bacillus cereus* après les avoir isolées. Enfin, la thermo-résistance des souches a été déterminée et quantifiée

1. Généralités sur le cacao

1.1. Origine et histoire

Le cacaoyer (*Theobroma cacao L*) est une plante pérenne tropicale appartenant à la famille des *Sterculiaceae* dont la culture date bien avant l'arrivée des Espagnols en Amérique centrale. Il est difficile de situer avec exactitude l'origine du cacaoyer. Cependant, l'hypothèse la plus probable situe le cacaoyer dans le bassin amazonien. Ainsi le mot «cacao» dérive du mot indigène « kakaw » issu de la langue des Olmèques (ancêtres des Mayas), selon l'historien anthropologue américain **Michael Coe** de l'université de Yale. [**Diomande, 2014**]. D'après les historiens **Tedlock (1993)** et **Ovied (1994)**, le cacao tenait une place très importante car il était utilisé sous diverses formes et même servait de monnaies d'échange par les Aztèques et les Mayas . D'après les écrits de **Durand (1967)**, les Aztèques avaient une parfaite maîtrise des différentes étapes pour la confection du chocolat. [**Diomande, 2014**].

L'invention en 1828 de la presse hydraulique pour extraire le beurre de cacao ainsi que la mise au point du processus de fabrication du chocolat solide au lait par les Suisses en 1879 ont marqué le début de l'ère de développement du secteur chocolatier actuel, notamment les plantations cacaoyères à l'échelle industrielle. [**ORO, 2011**].

1.2. Production et consommation du cacao

1.2.1 Culture de cacao

Le cacaoyer est un petit arbre haut de 6 à 9 m cultivé dans les forêts tropicales de la zone intertropicale (20° de latitude Nord au Sud de l'équateur). Cette zone tropicale comprend l'Afrique occidentale, l'Amérique centrale et du Sud ainsi que l'Asie et l'Océanie. Les cacaoyers se présentent sous diverses formes à l'état adulte (10 ans) et peuvent atteindre 12 à 15 m de hauteur lorsqu'ils poussent à l'état sauvage. Il atteint son plein développement vers l'âge de dix ans [**Mossu, 1990**].

Les cacaoyers peuvent atteindre près de 10 mètres de haut lorsqu'ils sont abrités par de grands arbres. Le fruit du cacaoyer est appelé chérelle pendant les 5 à 6 mois de sa croissance, puis cabosse lorsqu'il atteint sa taille récoltable.

Les graines, couramment appelées fèves, sont entourées d'une pulpe mucilagineuse, blanchâtre et gélatineuse, un peu sucrée et acidulée et imbriquées dans une seule cavité qui

renferme en moyenne 30 à 40 fèves selon 5 rangées longitudinales. [Diomande, 2014]. La longueur de la cabosse va de 15 à 25 cm. Les fèves sont de forme et de dimensions assez variables mais sont généralement aplaties et ont environ 25 mm de longueur et 8 mm d'épaisseur. [HES, 2014]

Les cabosses poussent à la fois le long de la tige principale de l'arbre et sur sa voûte (voir figures 1, 2 et 3).

Un cacaoyer devient productif quatre à cinq ans après avoir été planté et peut rester productif pendant plusieurs décennies. [Cacao : Guide des pratiques commerciales. CCI, Genève, 2001]



Figure 01: Cabosses de cacaoyer
Nacional d'Equateur



Figure 02 : coupe d'une cabosse de cacao

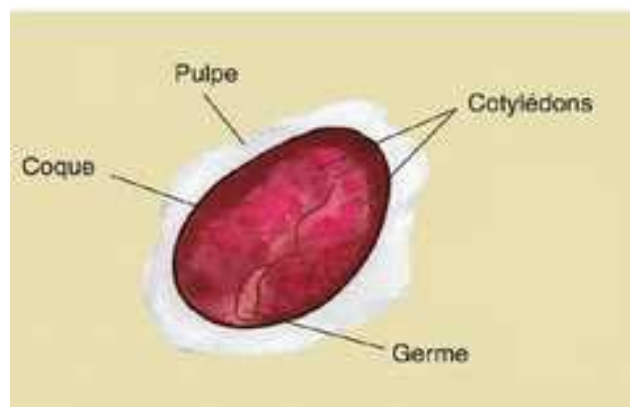


Figure 03: Coupe schématique d'une fève de cacao [Barel, 2013]

1.2.2. Production mondiale des fèves de cacao

Durant la campagne 2014-2015, 4,2 millions de tonnes de cacao (d'une valeur d'environ 12 milliards de dollars américains) ont été produites dans le monde.

73 % de la production mondiale provenait d'Afrique de l'Ouest, 17 % d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud, et 10 % de l'Asie.

Les huit plus grands pays producteurs de fèves de cacao sont la Côte d'Ivoire (42 % de la production mondiale), le Ghana (18 %), l'Indonésie (8 %), l'Équateur (6 %), le Cameroun (5 %), le Brésil (4 %), le Nigéria (4 %) et le Pérou (2 %). [ICCO, 2016c]

Le cacao occupe la 3^{ème} place sur le marché mondial des matières premières, derrière le sucre et le café [Dassonville *et al.*, 2016]

La demande en cacao varie selon les régions. Actuellement, l'Europe et l'Amérique du Nord dominant encore quant à la consommation de cacao. Les pays les plus importants sont les États-Unis, l'Allemagne et la France qui importent respectivement chacun 18 %, 8,4 % et 5,5 % de la récolte mondiale [Hütz-Adams, Friedel, *et al.* 2016]. (voir tableau 01).

Tableau 01: Principaux pays consommateurs de cacao ; source : [ICCO , 2016 c]

Pays	Consommation de cacao en milliers de tonnes en 2014-15
Etats –Unis	736.7
Allemagne	350.0
France	225.0
Royaume-Uni	220.0
Russie	205.0
Brésil	200.0
Japon	176.4
Espagne	115.0
Italie	100.0
Canada	90.0
Chine	77.8

1.3 Les principales variétés cultivées de cacaoyer

Le cacaoyer, *Theobroma cacao L.*, est l'une des quelques 22 espèces du genre *Theobroma* de la famille des sterculiacées. Cette espèce est apparemment originaire de la partie basse équatoriale du versant oriental des Andes où on recense le plus vaste éventail de pousses naturelles [Asiedu, 1991].

Pour la production de cacao, on distingue principalement trois variétés de cacaoyers :

- ❖ Le Criollo de l'Amérique centrale à la Colombie.
- ❖ Le Forastero en Haute Amazonie, avec le groupe amelonados d'origine guyanaise et basse amazonienne.
- ❖ Le Trinitario, variété hybride qui provient d'un croisement naturel entre les variétés criollo et forastero. A l'origine, le trinitario désignait la variété produite à Trinidad bien qu'actuellement ce nom pourrait s'appliquer aux cacaoyers de certains pays comme le Sri-Lanka, l'Indonésie et la Papousie-Nouvelle-Guinée où les variétés criollo et forastero ont été croisées . [Asiedu, 1991].

La Figure 04 représente les cabosses des 3 principales variétés de cacaoyer



Criollo

Forastero

Trinitario

Figure 04 : Cabosses des 3 principales variétés de cacaoyer

1.4. Le traitement post-récolte du cacao

La transformation technologique du cacao en chocolat et produits dérivés nécessite un processus primaire de manutention post-récolte comprenant l'écabossage, la fermentation et le séchage.

Le traitement post-récolte du cacao comprend successivement les différentes opérations suivantes :

- L'écabossage des cabosses pour en extraire les graines ;
- La fermentation pour éliminer le mucilage, provoquer la perte du pouvoir germinatif et développer les précurseurs de l'arôme chocolat ;
- Le séchage des fèves fermentées. Qui permet la réduction de la teneur en eau ainsi que la teneur en acide acétique formé au cours de la fermentation
- Le stockage des fèves en attendant leur expédition [Barel , 2013] .

1.4.1. Récolte et écabossage

La période de la récolte varie d'une région à l'autre. Dans les pays situés au nord de l'Equateur. La récolte principale s'effectue entre septembre et décembre, tandis que la récolte de contre-saison se fait d'avril à juin.

En mûrissant, les cabosses changent de couleur. Les vertes deviennent jaune-orange et les rouges deviennent oranges. Plusieurs types de couteaux sont utilisés pour la cueillette. Ainsi, pour les cabosses suspendues à hauteur d'homme, on utilise la machette, tandis que les cabosses situées plus en hauteur seront récoltées à l'aide d'un couteau spécial à lame recourbé, monté sur une longue perche [Barel , 2013]

Une fois cueillies, les cabosses sont ouvertes en pratiquant une entaille en biais à l'aide d'un couteau que l'on fait tourner pour enlever une partie de la cabosse. Les fèves sont alors extraites à la main (voir figure 5). Cette méthode d'écabossage présente généralement des inconvénients pour les fèves, car la quantité de fèves écorchées au niveau de la coque atteint souvent 5%. Pour éviter la perte, on écabosse sur un tasseau triangulaire fixé sur une table. Un travailleur expérimenté peut traiter plus de 3000 cabosses par jour. [Asiedu, 1991]



Figure 05: L'écabossage manuel [Barel, 2013]

1.4.2. La fermentation

La fermentation est une des principales activités post récolte dans la production des fèves marchandes de cacao dont elle détermine la qualité marchande et organoleptique [Schwan et Wheals ,2004]. Au cours de la fermentation, la pulpe, substrat de la fermentation [Roelofsen, 1958] est dégradée suite à un ensemble complexe de réactions biochimiques auxquelles participent essentiellement les levures, les bactéries lactiques, les bactéries acétiques et les Bacillus [Schwan, 1996 ; Ouattara *et al.*, 2011]. Les métabolites résultant de ces réactions modifient les paramètres tels que le pH et la température du milieu fermentaire. Cela conduit à la mise en place d'un environnement propice au développement ou à l'inhibition de microorganismes impliqués dans le processus fermentaires du cacao. Il s'en suit alors une succession de flores microbiennes qui conduit au développement des précurseurs spécifiques de l'arôme chocolat [Schwan *et al.*, 1995 ; Schwan et Wheals, 2004].

Cette succession microbienne, en rapport avec la séquence des réactions enzymatiques et de métabolites produits, impacte fortement la qualité du cacao [Schwan, 1998 ; Camu *et al.*, 2007]. Cependant, l'ordre d'émergence et de succession des microorganismes peut varier en fonction des changements des conditions climatiques locales [Barker *et al.*, 1994 ; Ardhana et Fleet, 2003], des paramètres physico-chimiques du milieu de fermentation et peut par conséquent influencer positivement ou négativement la qualité de la fève de cacao.

Par ailleurs, les différents modes et techniques de fermentation pratiquées notamment les fermentations en caisse, sur feuilles de bananiers et sur bâche plastique sont susceptibles d'influencer différemment la flore microbienne et entraîner un changement en sa composition

tout comme les paramètres physico-chimiques du milieu fermentaire. La fermentation demeure un processus complexe et difficile à contrôler surtout dans le cas de la fermentation des fèves de cacao de type spontané ou naturel où la contamination microbienne se fait de façon hasardeuse et aléatoire. [*Bankoffi et al.,2013*].

Le processus de fermentation comprend deux phases principales (Voir figure 6). La première transformation a lieu dans la pulpe où les sucres sont transformés en éthanol par les levures. Pendant la seconde phase, l'éthanol est oxydé en acide acétique (fermentation réalisée par les bactéries acétique) qui, en diffusant dans les fèves, provoque la mort du germe et l'activation d'enzymes endogènes importantes pour la production des précurseurs d'arômes.

Pour les fèves de la variété Forastero, il faut arrêter la fermentation au bout de 5 à 8 jours pour éviter la formation de mauvais goûts. Pour d'autres types de cacao, plus pauvres en polyphénols, la fermentation peut durer moins longtemps : 2 à 3 jours pour les Criollo ; 3 à 5 jours pour les Trinitario et le nationale d'Equateur.

Si une fermentation dure trop longtemps, les transformations biochimiques continuent dans la graine : les acides aminés sont eux-mêmes dégradés en acides organiques et en amines, avec l'apparition de goûts de poisson ou même d'urine.

Dans la pulpe qui reste, d'autres fermentations microbiennes incontrôlées peuvent également conduire à des mauvais goûts [*Barel ,2013*].

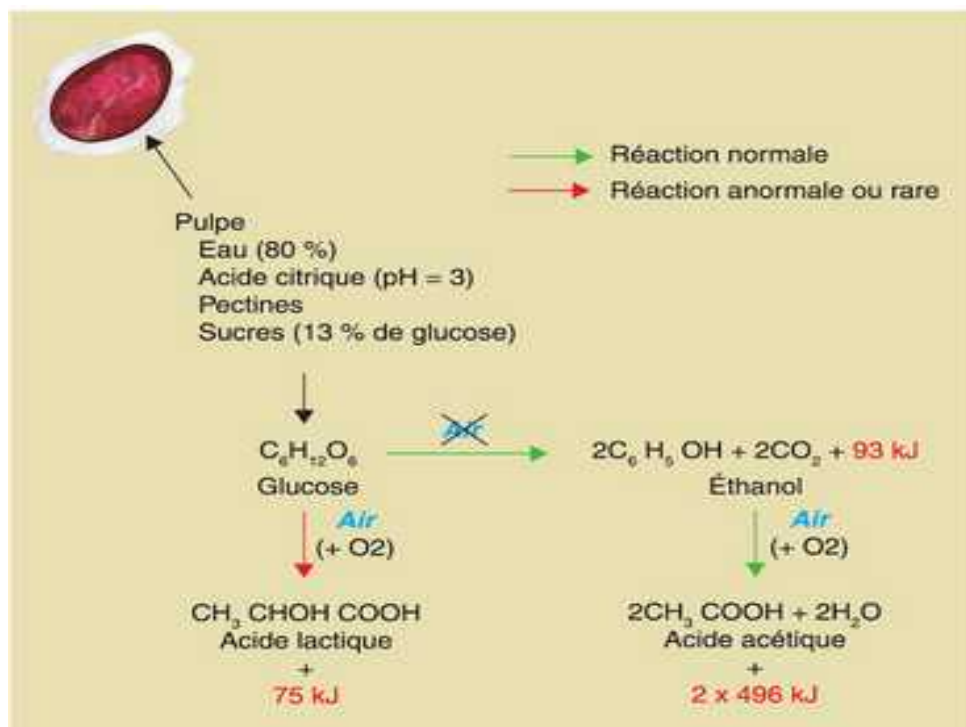


Figure 06: Bilan des réactions microbiennes dans la pulpe du cacao en fermentation

(d'après Barel,2013)

1.4.3. Séchage

Le but du séchage est de diminuer la teneur en eau dans les fèves fermentées d'environ 50-60% à 8% [Djedjro *et al*, 2008], ce qui va bloquer les réactions enzymatiques et éviter le développement de moisissures et permettre la bonne conservation du cacao marchand ainsi obtenu. La température de séchage doit être inférieure à 60°C.

Deux méthodes de séchage sont observées dans le monde du cacao : le séchage solaire ou naturel et le séchage artificiel [Hamdouche, 2015]. Les fèves séchées artificiellement sont plus acides que les fèves séchées au soleil, mais au-delà de 24 à 72 heures , le séchage artificiel a de fortes chances de donner des fèves à l'acidité acceptable [Wood , 1975]. Les fèves fermentées et bien séchées présentent les couleurs rouge clair et chocolat. Elles se fendillent lorsqu'on les frotte dans la main et peuvent facilement être réduites en poudre. [Asiedu , 1991]

1.4.4. Stockage

Le stockage des fèves en zone de production est une opération très délicate, car la moindre contamination par des moisissures affecte la qualité finale du produit. Les fèves doivent être stockées dans des bonnes conditions en évitant la chaleur et l'humidité de l'air qui favorisent le développement des moisissures et des insectes [Barel, 2013]. Pour certains producteurs, le stockage des fèves de cacao séchées se fait généralement dans des sacs de jûte de 60 à 65 kg. Ceux-ci sont solides, mais permettent une reprise de l'humidité. Ils peuvent être empilés les uns sur les autres et ils sont également biodégradables. Pour un stockage adéquat, la teneur en humidité de fèves ne devrait pas dépasser 6 ou 7%, au-delà de 8% le risque du développement des moisissures existe. Au-dessous de 5%, les fèves sont très cassantes. La durée de stockage est indéterminée et variable selon les producteurs. A l'expédition, Les sacs sont transportés dans les cales des navires avec une bonne ventilation pour évacuer l'air humide [Cook, 1982 ; Beckett, 2009].

1.5. La transformation technologique des fèves de cacao

Les fèves de cacao ne sont pas consommées telles quelles. Elles subissent une transformation industrielle avant la consommation. [Tafari *et al*, 2004].

Les fèves décortiquées et torréfiées sont broyées pour obtenir une pâte appelée liqueur de cacao (ou masse ou pâte). Une partie de la liqueur de cacao est pressée pour en extraire la matière grasse, appelée beurre de cacao, le produit restant étant le tourteau de cacao. Celui-ci est ensuite pulvérisé pour obtenir de la poudre de cacao dégraissée, utilisée pour confectionner des boissons et des confiseries. La liqueur et le beurre de cacao sont généralement mélangés avec du sucre, du lait et d'autres ingrédients pour élaborer du chocolat (voir figure 7). Des normes de l'Union européenne et du Codex Alimentarius définissent la composition et l'étiquetage de certains de ces produits de cacao. [Exigence de qualité de l'industrie du chocolat et du cacao ;2015]

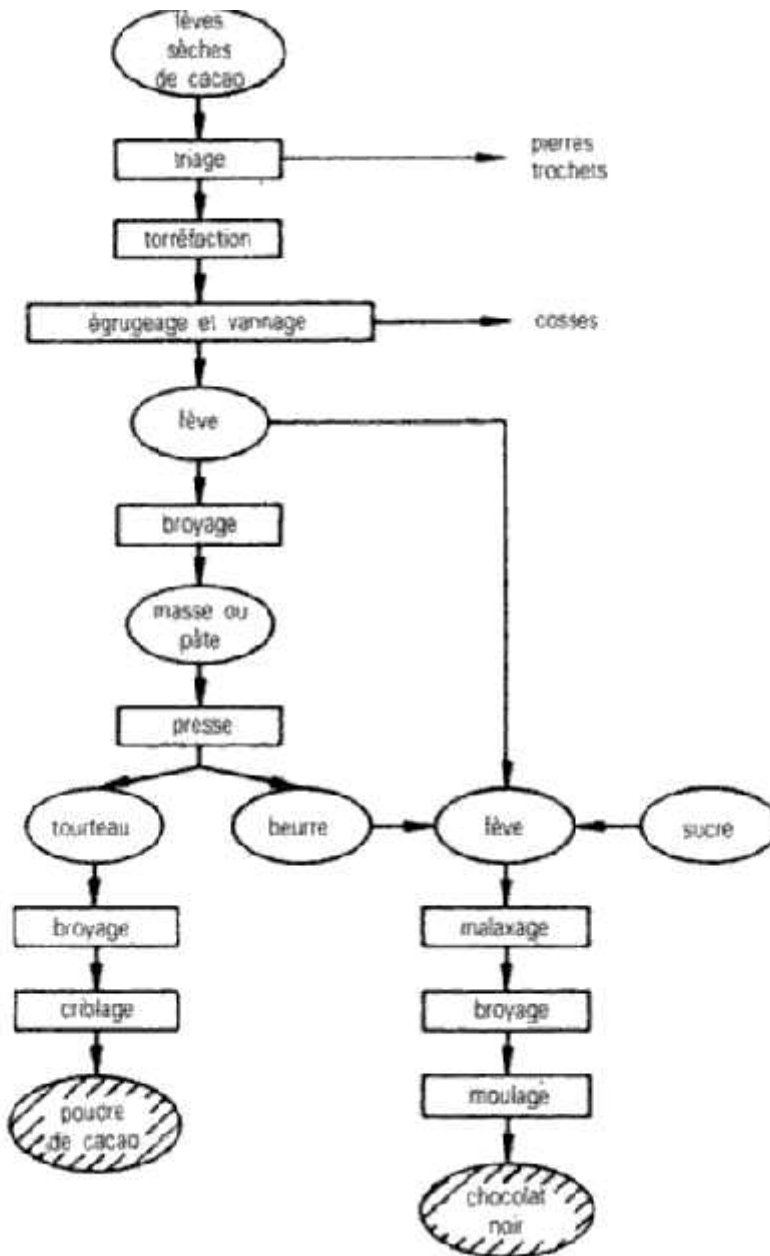


Figure 07: schéma de fabrication de la poudre de cacao et du chocolat [Wood, 1975]

Pour la production de cacao en poudre, on mélange, torréfie et transforme les fèves de cacao de différentes origines, qui sont ensuite partiellement dégraissées à des teneurs minimales de 20% ou de 10 à 20% (matière sèche) et pulvérisées [Anon, 1981., Kamphuis, 2009].

Avant la torréfaction, une étape d'alcalinisation des fèves de cacao permet d'améliorer les caractéristiques organoleptiques et technologiques de la poudre de cacao [Kamphuis, 2009].

Tableau 02: Valeur nutritive de la poudre de cacao. [d'après McCance et Widdowson, 1967]

Élément nutritifs	g/100g	Éléments minéraux	mg/100g
Protéines	20.4	Sodium	650
Matières grasses	25.6	Potassium	534
Hydrates de carbone disponibles sous forme de monohydrates	35	Calcium	51.2
		Magnésium	192
		Fer	14.3
		Cuivre	3.40
		Phosphore	685
		Soufre	160
		Chlorine	199

1.6. Utilisations du cacao

Le terme cacao concerne les fèves disponibles dans le commerce et les produits dérivés alors que le terme anglais cacao concerne le cacaoyer et ses différentes parties, bien que ces deux termes soient dans certains cas interchangeables. [Commission du Codex Alimentarius, 2012]

Le cacao est un produit à base de fruits secs fermentés. Les fèves de cacao ne sont pas consommées telles quelles. Elles subissent une transformation industrielle avant la consommation. Le cacao est un ingrédient très important dans les produits pharmaceutiques ainsi que dans différentes sortes d'aliments, tels que les tourteaux, les biscuits, les confiseries à base de chocolat, le chocolat à tartiner, les boissons au cacao, les aliments pour enfants, les glaces ainsi que les sucreries. [Tafari *et al*, 2004].

1. 7. Microbiologie des fèves de cacao

La qualité du chocolat et celle du cacao marchand sont étroitement liées. La qualité du produit final dépend en grande partie de l'origine génétique de la matière première utilisée, mais aussi des conditions de culture de la plantation (l'environnement) et des différentes étapes du traitement post-récolte (la fermentation et le séchage) jusqu'à la torréfaction.

La qualité du cacao marchand se manifeste à travers des caractéristiques physiques (la taille, le poids, la couleur et le contenu en graisse) et organoleptiques des fèves (le goût, l'arôme). [Diomande, 2014]. Les fèves de cacao peuvent absorber des goûts étrangers provenant d'autres produits comme le coprah, le caoutchouc, les combustibles à base de pétrole, les produits chimiques, les teintures, le ciment, etc., aussi bien dans les entrepôts que dans les navires qui transportent le cacao. La haute teneur en matière grasse des fèves de cacao agit comme un absorbant extrêmement efficace de toutes sortes de défauts. Les fèves de cacao doivent toujours être manipulées et traitées comme du matériel de qualité alimentaire et en règle générale, l'équipement d'ensachage et les entrepôts où les fèves de cacao sont manipulées et stockées doivent être utilisés exclusivement pour cela [Anonyme, 2015].

Les usines de cacao et de chocolat et les processus de fabrication sont conçus pour stériliser les fèves et éliminer les risques de contamination. Ils respectent des règles strictes basées sur le système HACCP décrit dans CAOBISCO Guide to Hygiene [CAOBISCO, 2011].

1.7.1 Maitrise de la charge microbiologique initiale : (étape de fermentation)

La flore responsable de la fermentation est composée de Bactéries lactiques, de bactéries acétiques, de différentes espèces de *Bacillus* et des Levures et moisissures 1 à 2 jours de fermentation : Levure et Bactérie lactique, 2nd aux 5èmes jours de fermentation : Bactérie acétique et du 4 ème au 8 ème jours de fermentation : *Bacillus* [Ait-Boulahsen, 2012]

Les bactéries du genre *Bacillus* sont présentes en faible quantité au début de la fermentation (apportées par l'air et la main d'œuvre). Durant cette étape, elles ne peuvent pas se multiplier car le pH relativement bas. Dès les premières étapes de modifications (remontée de pH et de la température), les *Bacillus* vont devenir prédominants dans la flore des fèves jusqu'à atteindre 10^8 / fèves. Les modifications de la teneur en sucres, l'apparition d'oxygène ainsi qu'une augmentation de la température sont favorable à leur croissance. Parmi les espèces on trouve : *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. pumulus*, *B. coagulans* et *B. stearothermophilus*. Cette dernière espèce étant thermophile (45-50 C°) devient l'espèce bactérienne prédominante

On estime qu'une fève sur deux est contaminée par les Salmonelles [Ait- Boulahsen, 2012]. Les salmonelles proviennent de la contamination fécale dont le réservoir est humain ou animal lors du dépulpage, tassement ou la fermentation (lorsque le tas de fèves est mal protégé par les feuilles de bananier). Divers microorganismes sont présents à un nombre élevé lors de la fermentation des fèves de cacao, les opérations ultérieures de post-récolte et de transformation industrielle permettent seulement la survie d'un microbiote dominé par le genre *Bacillus* et ses proches [Barrile *et al.*, 1971]. La capacité des bacillus à former des endospores thermorésistantes, leur permet de survivre aux processus industriels et poser des problèmes de détérioration et de sécurité [Huemer *et al.*, 1998 ; Oomes *et al.*, 2007., Oh et Cox, 2009].

La composition microbiologique générale de la poudre de cacao commerciale a été étudiée par Gabis *et al.*, (1970) : *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* et *Bacillus subtilis* constituaient respectivement 45, 20, 10 et 8% des isolats.

Dans une autre étude, en plus des microorganismes aérobies totaux, on a analysé les populations de spores survivant à des traitements thermiques de 80 °C et 100 °C pendant 1 et 5 min, ce qui a montré que *B. subtilis* et *B. licheniformis* représentaient 83% des isolats [Mossel *et al.*, 1974].

À l'heure actuelle, la seule référence relative à la qualité microbiologique de la pâte et de coco en poudre consiste en des directives définies par les industriels du cacao [Dijk *et al.*, 2007]. Ces directives, qui sont la seule référence sur laquelle repose l'industrie, comprennent des spécifications pour les mésophiles aérobies totaux (<5000 CFU / g), les moisissures (<50 UFC / g), les levures (<10 UFC / g), Enterobacteriaceae G) et Salmonella (absente dans 25 g). [Lima *et al.*, 2011].

2. Les microorganismes et agent pathogènes et d'altération

2.1 Le genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* a été créé en 1872 par Ferdinand Cohn qui décrit *B. subtilis* comme espèce type. Quinze années plus tard (1887), Frankland isole une nouvelle espèce, *B. cereus* à partir de l'air d'une étable au Royaume-Uni [Frankland et Frankland, 1887]. La bactérie isolée est la souche type de *B. cereus* : ATCC 14579. En 1955, Steinar Hauge est le premier à prouver l'implication de *B. cereus* dans des toxi-infections alimentaires [Hauge, 1955]. C'est en 1975 que la souche diarrhéique F4430/73 de *B. cereus* a été isolée à partir d'une soupe de pois [Spira et Geopfert, 1975].

2.2 Nomenclature et taxonomie

Les bactéries du genre *Bacillus* font partie du domaine des eubactéries (ou Eubacteria) et du phylum (ou division) des firmicutes [Euzéby, 2002], aussi dénommées bactéries à bas G+C % et à coloration positive [Larpent, 2000], ce qui correspond à une branche des eubactéries (voir figure 8).

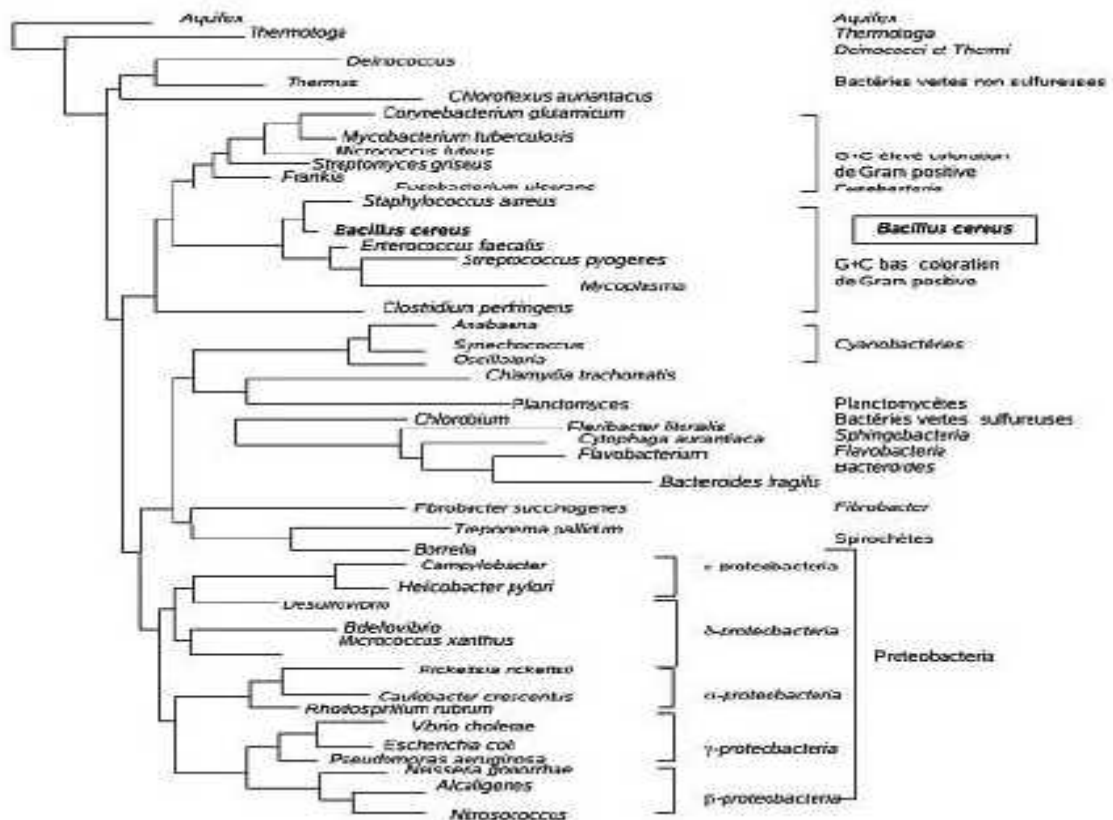


Figure 08 : phylogénie schématique du domaine de l’eubactérie, fondée sur le séquençage des ARNr 16S [Larpen, 2000].

Le genre *Bacillus* est un genre bactérien particulièrement hétérogène. [Dromigny, 2008]

Nombreux sont les chercheurs qui proposèrent la subdivision du genre en six genres différents [Forsyth *et al.*, 1998 ; Priest *et al.*, 2004], mais celui-ci demeura intact jusqu’en 2004, date à laquelle il fut scindé en plusieurs familles et genres de bactéries formant des endospores [Fritze, 2004 ; Todar, 2008].

Toutefois, malgré cette réorganisation et la description de nouveaux taxons [Coorevits *et al.*, 2012 ; Jung *et al.*, 2011], *Bacillus sensu stricto* demeure le genre le plus important de la famille des *Bacillaceae* avec plus de 60 espèces bien définies sur le plan taxonomique [Todar, 2008]

Les *Bacillus* sont des bacilles Gram+(les cultures âgées peuvent apparaître Gram -), généralement mobiles, aptes à la sporulation. La spore ne prend pas la coloration de Gram,

elle est sphérique ou ovale, déformante ou pas selon les espèces. Dans les cas douteux, une coloration spécifique peut être réalisée.

L'aptitude à la sporulation peut aussi être mise en évidence par le test de thermorésistance (10 minutes à 80°C). Les *Bacillus* sont catalases +, aérobies ou aéro-anaérobies. On les classe en fonction de la morphologie de la spore (étudiée par examen microscopique) ou en fonction de critères plus nombreux incluant le caractère respiratoire et fermentaire, la thermophile, etc. (classification numérique) [Guiraud, 2012].

➤ Le genre *Bacillus* est classé dans le Règne des *Bacteria*, embranchement des *Fimicutes*, Classe des *Bacilli*, Ordre des *Bacillales*, Famille des *Bacillaceae*, Genre : *Bacillus*

Les taxons du genre *Bacillus* sont présentés dans le tableau 03 :

Tableau 03: Taxons de la famille des *Bacillaceae* appartenant au genre *Bacillus* [Larpent , 2000].

<i>Bacillus agaradhaeren</i>	<i>Bacillus lentus</i>
<i>Bacillus alcalophilus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus marinus</i> (ex – <i>Bacillus globisporus</i> subsp. <i>marinus</i>)
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus marismortii</i>
<i>Bacillus atrophacus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>Bacillus azotoformans</i>	<i>Bacillus methanolicus</i>
<i>Bacillus badius</i>	<i>Bacillus moiavensis</i>
<i>Bacillus benzoevorans</i>	<i>Bacillus mycoides</i>
<i>Bacillus carboniphilus</i>	<i>Bacillus naganoensis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus niacini</i>
<i>Bacillus chinensis</i>	<i>Bacillus oleronius</i>
<i>Bacillus chitinolyticus</i>	<i>Bacillus pallidus</i>

<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus pasteurii</i>
<i>Bacillus clarkii</i>	<i>Bacillus popilliae</i>
<i>Bacillus clousii</i>	<i>Bacillus pseudalcaliphilus</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus pseudofirmus</i>
<i>Bacillus cohnii</i>	<i>Bacillus pseudomycoides</i>
<i>Bacillus curdlanolyticus</i>	<i>Bacillus psychrophilus</i>
<i>Bacillus dipsosauri</i>	<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>
<i>Bacillus ehimensis</i>	<i>Bacillus pulvifaciens</i>
<i>Bacillus fastidiosus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
<i>Bacillus firmus</i>	<i>Bacillus schlegelii</i>
<i>Bacillus flexus</i>	<i>Bacillus silvestris</i>
<i>Bacillus fusiformis</i>	<i>Bacillus simplex</i>
<i>Bacillus galactophilus</i>	<i>Bacillus smithii</i>
<i>Bacillus gibsonii</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>
<i>Bacillus globisporus</i>	<i>Bacillus sporothermodurans</i>
<i>Bacillus globisporus subsp .globisporus</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
<i>Bacillus glucanolyticus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus halmapatu</i>	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>
<i>Bacillus haloalkaliphilus</i>	<i>Bacillus thermocatentilatus</i>
<i>Bacillus halodenitrificans</i>	<i>Bacillus thermocloacae</i>
<i>Bacillus halodurans</i>	<i>Bacillus thermoglucosidasius</i>
<i>Bacillus halophilus</i>	<i>Bacillus thermoleovorans</i>
<i>Bacillus horikoshii</i>	<i>Bacillus thermosphaericus</i>
<i>Bacilus infernus</i>	<i>Bacillus thermoruber</i>
<i>Bacillus insolitus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>

<i>Bacillus kaustophilus</i>	<i>Bacillus tusciae</i>
<i>Bacillus kobensis</i>	<i>Bacillus vallismortis</i>
<i>Bacillus laevolacticus</i>	<i>Bacillus vedderi</i>
<i>Bacillus lentimorbus</i>	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>

2.3 Caractères bactériologiques

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm), sporulés, à Gram positif ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que pour les très jeunes cultures), généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche (*B. anthracis* et *mycoides* sont immobiles et pour les espèces mobiles, la mobilité est variable selon les souches), parfois capsulés (*B. anthracis*, *licheniformis*, *megaterium* et *subtilis* peuvent élaborer une capsule formée d'un polymère d'acide glutamique), aérobies ou aéro-anaérobies, le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase [Holt *et al.*, 1994]



Figure 09: Gram variable, rod, *Bacillus subtilis*. [Ann . Smith, 2005]

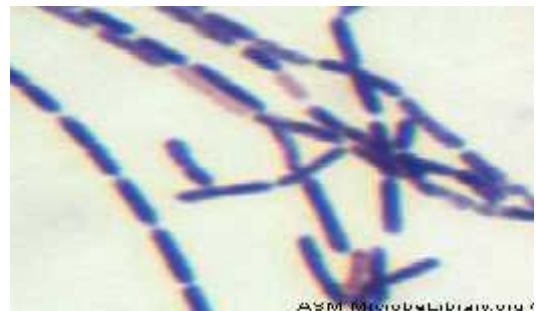


Figure 10: Gram variable, rod, *Bacillus cereus*. [Ann . Smith, 2005]

Les *Bacillus* sont répartis en trois catégories selon la morphologie de leurs spores [Toma, 1992] :

- le groupe I rassemble les bacilles dont les spores d'aspect ovale ou cylindrique ne sont pas déformantes (*B. cereus*, *B. lentus*, *B. megaterium*,...),
- le groupe II comprend les bacilles dont les spores ont une silhouette ovale modifiant

la forme du corps de la bactérie (*B. circulans*, ...),

- le groupe III réunit les bacilles dont les spores rondes déforment le corps bacillaire

(*B. sphaericus*,...).

2.4 Caractères physiologiques

Les caractères physiologiques des *Bacillus* sont impressionnants. Ils peuvent dégrader la plupart de la matière organique animale ou végétale (cellulose, amidon, protéines, hydrocarbures...) par la production d'enzymes extracellulaires, produisent aussi des antibiotiques peptidiques, des molécules peptidiques de signal. Ils sont hétérotrophes, nitrifiants, dénitrifiant, fixateurs d'azote, précepteurs de fer, oxydants le sélénium, oxydants et réduisant le manganèse. Ces microorganismes sont des chimiolithotrophes facultatifs, acidophiles, alcalophiles, psychrophiles, thermophiles, halotolérants, ou halophiles et sont capables de croître à des valeurs de pH, de température et de concentrations de sel où peu d'autres organismes peuvent survivre. A cause de cette variabilité physiologique, nos connaissances sur l'écologie du *Bacillus* sont très insignifiantes [Holt *et al.*, 1994].

2.4.1 Principales caractéristiques distinctives de certaines espèces de *Bacillus*

Tableau 04: Principales caractéristiques distinctives de certaines espèces de *Bacillus*

[Slepecky et Hemphill , 2006]

Thermophile	<i>B. stearothermophilus</i> <i>B. thermodenitrificans</i> <i>B. caldotenax</i>	Hydroxy aromatique composés dégradé Réduction de nitrate à N ₂	<i>B. gordonae</i> <i>B. azotoformans</i>
Acidophiles thermophiles	<i>B. coagulans</i> <i>B. acidocaldarius</i>	Croissance limitée à acide urique, allantoïne ou acide allantoïque	<i>B. licheniformis</i> <i>B. fastidiosus</i>
Psychrophiles	<i>B. psychrophilus</i> <i>B. macquariensis</i> <i>B. globisporus</i> <i>B. insolitus</i>	Croissance à pH élevé et NH ₄ Cl Nécessite de l'acide pantothénique Nécessite la biotine Produit stable à la chaleur glucosidase	<i>B. pasteurii</i> <i>B. pantothenicus</i> <i>B. pumilus</i> <i>B. thermoglucosidasius</i>
Alkalophile Chimiothotrophique -e facultative Fixateurs d'azote	<i>B. psychrosaccharolyticus</i> <i>B. alcalophilus</i> <i>B. schlegelii</i> <i>B. polymyxa</i> <i>B. macerans</i>	Insectes pathogènes	<i>B. thuringiensis</i> <i>B. larvae</i> <i>B. popilliae</i> <i>B. sphaericus</i> <i>B. lentimorbus</i>
Alginate degraders	<i>B. azotofixans</i> <i>B. alginolyticus</i> <i>B. chondrotinus</i>	Humain et animal agent pathogène	<i>B. anthracis</i> <i>B. cereus</i>
Acide aromatique et phénol degrader	<i>B. benzoovorans</i>		

2.5 Contamination et Intoxication alimentaire associées à *Bacillus sp*

La plupart de ces bactéries sont peu pathogènes pour l'homme, à deux exceptions près : *B. anthracis*, qui est responsable du charbon, et *B. cereus* qui est l'espèce la plus fréquemment isolée de produits pathologique . Les infections à *B. cereus* peuvent être classées en trois catégories : les infections digestives, les infections locales et les infections systémiques. [Teyssou *et al*, 1998]. (voir figure 11)

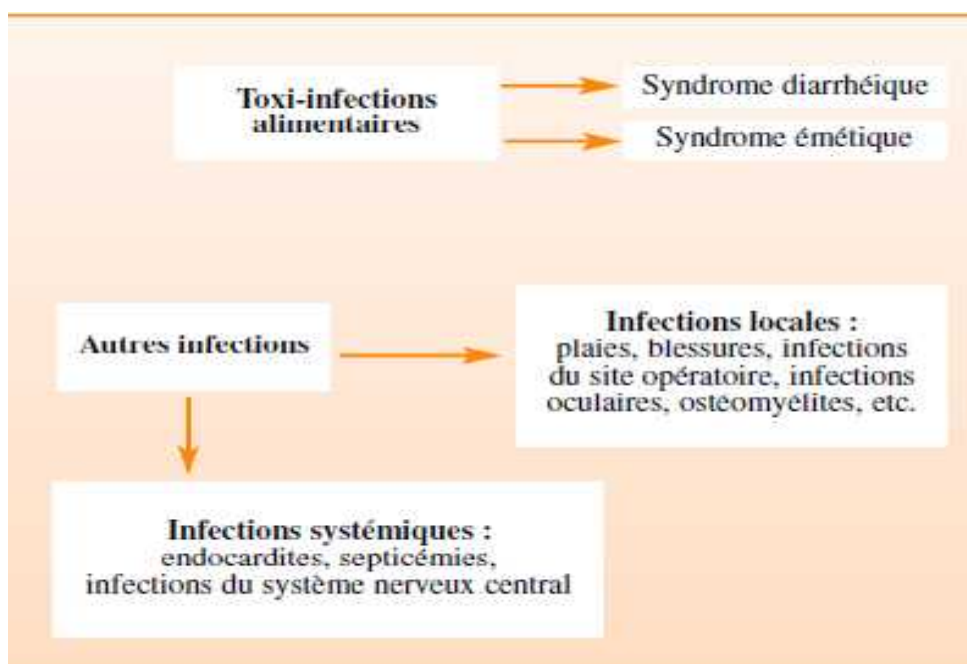


Figure 11 : infection à *Bacillus cereus* chez l'homme [Teyssou *et al*, 1998]

De nombreux travaux ont montré l'implication de *B. cereus* dans les intoxications après la consommation des pâtes alimentaires [Mahler *et al.*, 1997 ; Agata *et al.*, 2002]. *B. cereus* est le plus souvent décrit comme agent de toxi-infection alimentaire liée à la consommation des végétaux, produits amylacés et les plats réfrigérés [Yusuf *et al.*, 1992 ; Rusul et Yaacob, 1995].

B. cereus est impliqué dans la production de deux toxines distinctes responsables de symptômes diarrhéiques ou émétiques [Lake *et al.* , 2004]. Les syndromes émétiques sont associés généralement à la consommation de produits amylacés, par contre les symptômes

diarrhéique sont liés généralement aux aliments riches en protéines [Schoeni et Wong, 2005].

D'autres bacilles sporulés peuvent être à l'origine de syndromes diarrhéiques et émétiques comme *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* [Griffiths, 1995 ; Peypoux et al., 1999 ; Dierick et al., 2005 ; EFSA, 2005 ; Pavic et al., 2005 ; Logan, 2011] et *Bacillus thuringiensis* [Jackson et al., 1995]

2.6 Altérations des aliments

Les altérations d'aliments causées par *Bacillus* sont principalement des défauts organoleptiques telles que des saveurs désagréables : notes rances, fruitées, levurées, amères [Meer et al., 1991]. Bien que principalement induites par *Clostridium*, les altérations visuelles sont également associées à la présence de *Bacillus* mésophiles *B.subtilis*, *B.coagulant*, *B.licheniformis* et se manifestent par des productions de gaz, des coagulations et liquéfactions de produits [Loysance, 1999].

Ces altérations sont dues à la production d'acides, d'enzymes (telles que des lipases et protéases) et d'autres composés indésirables [Burgess et al., 2010].

3. Groupe *Bacillus cereus*

L'expression « groupe *Bacillus cereus* » est en fait une nomenclature considérée comme empirique et non-taxonomique [Vilas – Boas et al., 2002] ; elle a toutefois l'intérêt de souligner la grande proximité des microorganismes qui composent ce groupe, c'est-à-dire six espèces correspondant à *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus weihenstephanensis*.

Bacillus anthracis, *Bacillus cereus sensu stricto* et *Bacillus thuringiensis* ont une telle proximité sur le plan génétique qu'on les regroupe souvent à l'heure actuelle dans une seule « espèce » dénommée *Bacillus cereus sensu lato* [Chen et Tsen, 2002 ; Helgason, Okstad et al., 2000 ; Rasko et al., 2005].

Ces trois *Bacillus* ont par ailleurs la particularité d'être pathogènes pour l'homme ou animal, ce qui renforce encore la tendance des chercheurs de les regrouper. [Dromigny, 2008]

3.1 Les taxons du « groupe *Bacillus cereus* »

Sur le plan de l'étymologie, l'espèce *anthracis* vient du grec anthrax (le charbon) à cause de la maladie du charbon et des lésions noirâtres qu'elle provoque.

L'espèce *cereus* vient de l'adjectif latin *cereus* (qui ressemble à la cire) à cause des colonies que *Bacillus cereus* forme sur les géloses.

Pour *Bacillus mycoides*, *mycoides* signifie en grec un champignon et *oides* la forme. Cette nomenclature fait référence à l'aspect des colonies 0.

L'espèce *thuringiensis* fait référence à l'origine : en latin, la Thuringe. [Dromigny, 2008]

Pour *Bacillus pseudomycoides*, il s'agit d'une bactérie proche de *Bacillus mycoides* (un « faux » mycoïdes). Sa nomenclature a été validée en 1998 par Nakamura [Nakamura, 1998].

L'espèce *weihenstephanensis* fait référence à Freising – Weihenstephan, une ville allemande. Sa nomenclature a été validée en 1998 [Lechner et al., 1998].

3.2 Caractéristiques et classification

Bacillus cereus est un groupe d'espèces très proches qui sont caractérisées par des bacilles à Gram-positif, aérobies ou anaérobies facultatifs, et sporulants. [le point sur : *Bacillus cereus*, 2016]

Il fait partie d'un ensemble d'espèces apparentées, souvent regroupées dans la littérature sous le terme « *Bacillus cereus sensu lato* » au sein duquel on distingue traditionnellement :

- *Bacillus cereus sensu stricto* hémolytique ;
- *Bacillus thuringiensis* se différenciant de *B. cereus sensu stricto* par la production d'un cristal parasporal toxique contre les insectes ;
- *Bacillus anthracis*, non hémolytique, agent de la maladie du charbon ;
- *Bacillus weihenstephanensis* correspondant à certaines souches de *B. cereus* psychrotrophes ;
- *Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycoides* caractérisés par la formation de colonies à bords filamenteux sur milieux gélosés.. [Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments / *Bacillus cereus* , 2011]

Plus récemment, un groupe de souches thermophiles d'origine clinique a été proposé et à être nommé *Bacillus cytotoxicus*. Ces souches sont encore appelées *B. cereus subsp. cytotoxicis* dans la littérature et les bases de données publiques en attendant l'approbation officielle de la nouvelle désignation des espèces. [UK Standards for Microbiology Investigations ; Identification of *Bacillus* species, 2015]

- *Bacillus cytotoxicus* sp.nov. (décrite en 2013 par Guinebretière et coll.)

Les espèces du groupe *Bacillus cereus* sont caractérisées par une température optimale de croissance de 30-37°C mais elles sont capables de croître de 4°C à 50°C selon les espèces (55°C pour certaines souches). Ces caractéristiques les rendent particulièrement résistantes à la chaleur, le froid, la déshydratation, l'action des désinfectants et des substances bactéricides.

La croissance de *Bacillus cereus* est inhibée dans les aliments à activité de l'eau (aw) inférieure à 0,92 ou à pH inférieur à 4,5. [le point sur : *Bacillus cereus* , 2016]

Les sept groupes reflètent les différentes aptitudes des souches à se développer à différentes températures, à la thermo-résistance de leurs spores et à la fréquence de leur implication dans les toxi-infections alimentaires collectives (Tiac) . *Bacillus cereus* peut produire deux types de toxines, une toxine émétique préformée dans les aliments et résistante à une large gamme de températures et de pH, et des toxines diarrhéiques produites pendant la croissance dans l'intestin grêle après ingestion de cellules végétatives ou de spores en quantité suffisante [Buyser, M et al ; 2012]

Tableau 05: Principales caractéristiques des espèces du groupe *Bacillus cereus* (souches types) , [le point sur : *Bacillus cereus* , 2016]

❖ Ces caractéristiques peuvent varier selon les groupes phylogénétiques

Caractéristiques	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. pseudo mycoides</i>	<i>B. cytotoxicus</i>
T° min de croissance	10°C	10°C	10°C	5°C	5°C	10°C	20°C
T° max de croissance	45°C	45°C	<50°C	37°C	37°C	40°C	50°C
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-
Production d'Indole*	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	+	+	-	+	-	-	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-
Lécithinase du jaune d'œufs	+	+	+	+	+	+f	+f
Amidon**	+	+	+	+	+	+	-
Hémolyse	+	+	-	ND	+	+	ND
Croissance en Anaérobiose	+	+	+	+	+	+	+f
Réduction des Nitrates*	+	+	+	+	+	+	+
Colonie rhizoïdale	-	-	-	-	+	+	-
Cristal prasporal	-	+	-	-	-	-	-

f: faiblement positif

ND : Non déterminé

*Tests API 20E

**Tests API

Chaque groupe possède une gamme de températures qui lui est propre avec des différences écologiques fournissant la preuve d'une multi-émergence de psychrotolérance dans le groupe *B. cereus* . Il y a un groupe thermophile (VII), deux groupes mesophiles (III, IV), deux groupes intermédiaires (I, V) et deux groupes psychrotrophes (II, VI).

Le groupe I est constitué par l'espèce *B. pseudomycoides*. Les espèces *B. cereus sensu stricto* et *B. thuringiensis* sont classées dans les groupes II, III, IV et V. Les souches de *B. anthracis* sont présentes uniquement dans le groupe III. Le groupe VI comprend les espèces

B. weihenstephanensis et *B. mycooides*. Enfin, le groupe VII contient l'espèce thermophile nouvellement décrite : *B. cytotoxicus*. Ce groupe serait le plus proche d'un ancêtre commun.

En effet, selon **Guinebretiere et al.**, *B. cereus sensu lato* serait issu d'un ancêtre thermophile

qui aurait évolué vers la psychrophilie [**Guinebretiere et al., 2013; Guinebretiere et al., 2008**].

Tableau06: Nouvelle classification du groupe *Bacillus cereus* [Guinebretière et al., 2008]

Groupes phylogénétiques	Espèces du groupe <i>Bacillus cereus</i>	Profils thermiques de croissance	Cytotoxicité
Groupe I	<i>B. pseudomycolides</i>	Mésophiles (de 10 à 43°C)	Aucune observée
Groupe II	<i>B. thuringiensis</i> II <i>B. cereus</i> I	Psychrotolérantes (de 7 à 40°C)	Toxines diarrhéiques
Groupe III	<i>B. thuringiensis</i> III <i>B. cereus</i> II <i>B. anthracis</i>	Mésophiles (de 15 à 45°C)	Toxines diarrhéiques et émétiques Anthrax
Groupe IV	<i>B. thuringiensis</i> IV <i>B. cereus</i> IV	Mésophiles (de 10 à 45°C)	Toxines diarrhéiques
Groupe V	<i>B. thuringiensis</i> V <i>B. cereus</i> V	Mésophiles intermédiaires (de 8 à 40°C)	Toxines diarrhéiques
Groupe VI	<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycooides</i> <i>B. thuringiensis</i> VI	Psychrotolérantes (de 5 à 37°C)	Aucune observée
Groupe VII	<i>B. cereus</i> VII	Thermotolérantes modérées (de 20 à 50°C)	Toxines diarrhéiques

3.3 Caractère morphologique et structure cellulaire de *Bacillus cereus*

En général, les cellules de *Bacillus cereus* ont une longueur de plusieurs microns de long. Ce sont des bacilles assez volumineux, mesurant de 1 à 1.8 µm de diamètre par 4 à 8 µm de long, produisant habituellement des chaînes courtes. Les extrémités des cellules adjacentes des chaînes courtes sont à angle droit. En revanche, les extrémités libres des bacilles sont arrondies. [**Dromigny, 2008**]

Ces bacilles sont à coloration de Gram positive, et sont en règle générale non encapsulés [Hannay, 1961].

Au microscope électronique à balayage, les cellules présentent les éléments caractéristiques des bacilles à coloration de Gram positive [Silva, 1967].(voir figure 12)

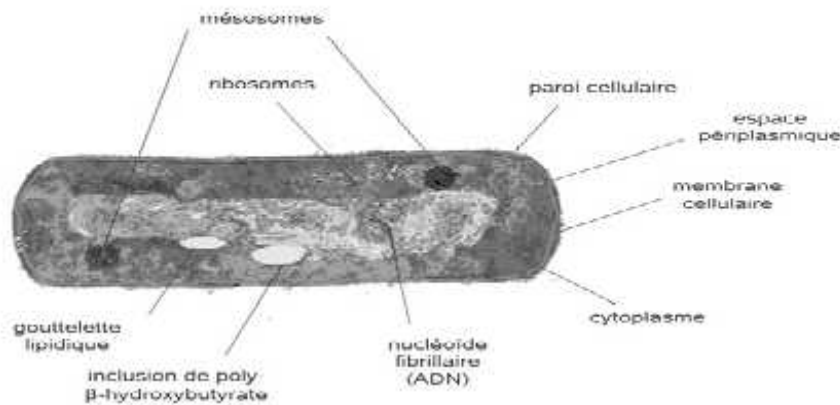


Figure 12: cellule non sporulante de *Bacillus cereus* microscopie électronique à transmission sur sections fines [Silva, 1967]

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 .

Les volumes moyens des souches de *Bacillus anthracis* (0.420 à 0.642µm³) sont presque deux fois celui des simulants utilisés généralement à la place de *Bacillus anthracis* dans des études de contaminations aéroportées (0.160 et 0.273 µm³ pour *Bacillus subtilis* et *Bacillus atrophaeus* , respectivement).

Les volumes moyens de *Bacillus anthracis* et *Bacillus thuringiensis* , sont semblables à ceux de *Bacillus cereus* (voir figure 13) . [Dromigny, 2008]

Tableau 07: Dimension des spores de bactéries du genre *Bacillus* [Carrera et al ., 2007]

	Longueur (µm)	Diamètre (µm)	Volume (µm ³)
<i>Bacillus cereus</i>	1.55	0.90	0.657
7 souches de <i>Bacillus anthracis</i>	de 1.23 à 1.67	de 0.81 à 0.86	de 0.420 à 0.642
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1.61	0.80	0.549

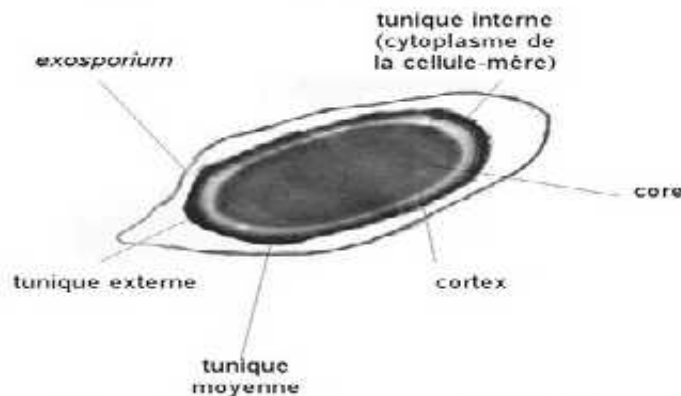


Figure 13 : Spore de *Bacillus cereus* en microscopie électronique à transmission [Ohye Murrell, 1973].

3.4 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]

Dans les industries laitières par exemple, les spores de *B. cereus*, présentes dans le lait cru avant traitement peuvent rester sur certaines parties des équipements, ce qui favorise leur germination et leur développement sous forme de biofilms et ainsi contaminer le produit fini.

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 ovo- produits. [Merzougui *et al.*, 2013]

3.5 Pouvoir pathogène des *Bacillus cereus*

Il possède deux types de toxines impliquées dans des accidents d'origine alimentaire : des toxines diarrhéogènes et une toxine émétisante. Les toxines diarrhéogènes, thermolabiles, sont libérées dans l'intestin grêle lors de la sporulation de la bactérie. Elles provoquent une diarrhée aqueuse, parfois associée à des vomissements. [Bornert, 2000]

La toxine émétisante, préformée dans les aliments et thermorésistante, provoque des vomissements, incoercibles et répétés, accompagnés de nausées, de céphalées, de douleurs abdominales, d'hypotension et parfois de diarrhée. La guérison survient généralement sous 24 heures. Seules certaines souches de *Bacillus cereus* sont psychrotrophes et seraient capables de proliférer à +4°C et de produire des toxines à +6°C. [Bornert, 2000]

3.6 Dose infectieuse

Dans le cas des toxi-infections diarrhéiques, la quantité de cellules ou spores de *B. cereus* pathogènes retrouvée dans les aliments incriminés est généralement égale ou supérieure à 10^5 par gramme ou millilitre et dans de très rares cas égale ou supérieure à 10^3 par gramme ou millilitre [EFSA, 2005; Kramer et Gilbert, 1989; 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. De même, les pathologies d'origine alimentaire provoquées par *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, ont toujours été associées à une population importante de ces bactéries dans les aliments responsables, de l'ordre de 10^5 cellules ou spores par gramme [Kramer et Gilbert, 1989].

4. Thermo-résistance des spores bactérienne

La résistance thermique des spores varie fortement en fonction de l'espèce. Chez *Bacillus*, la résistance est liée à la température optimale de croissance de la forme végétative [Gombas, 1983].

La figure 14 représente un schéma d'une spore de *B.subtilis* et de *B.anthraxis*

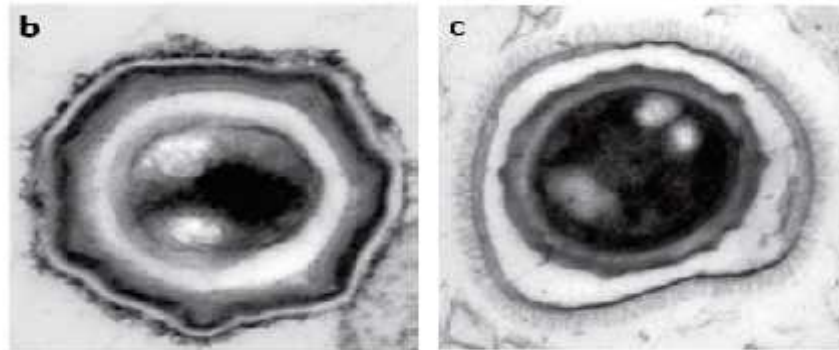


Figure 14 : Ultrastructure d'une spore.

Légende : (b) Observation en microscopie électronique à transmission d'une spore de *B. subtilis*. (c) Observation en microscopie électronique à transmission d'une spore de *B. anthracis* [McKenney *et al*, 2013 ;Setlow, 1997].

A – Etapes et mécanismes de la sporulation (étapes morphologique)

Le processus de formation des spores thermorésistantes a été largement étudié pour la bactérie modèle *B. subtilis* (voir figure 15). Ce processus est initié en réponse à un nombre de signaux externes et internes tels que l'augmentation de la densité cellulaire ainsi que l'appauvrissement du milieu en nutriments et dure généralement entre 8 et 10 h [Hoon *et al.*, 2010].

Les étapes morphologiques de la sporulation sont similaires chez toutes les espèces des genres *Bacillus* et *Clostridium* [Hilbert and Piggot, 2004]. Elles ont été mises en évidence par microscopie électronique et sont au nombre de 7 étapes [Errington, 1993].

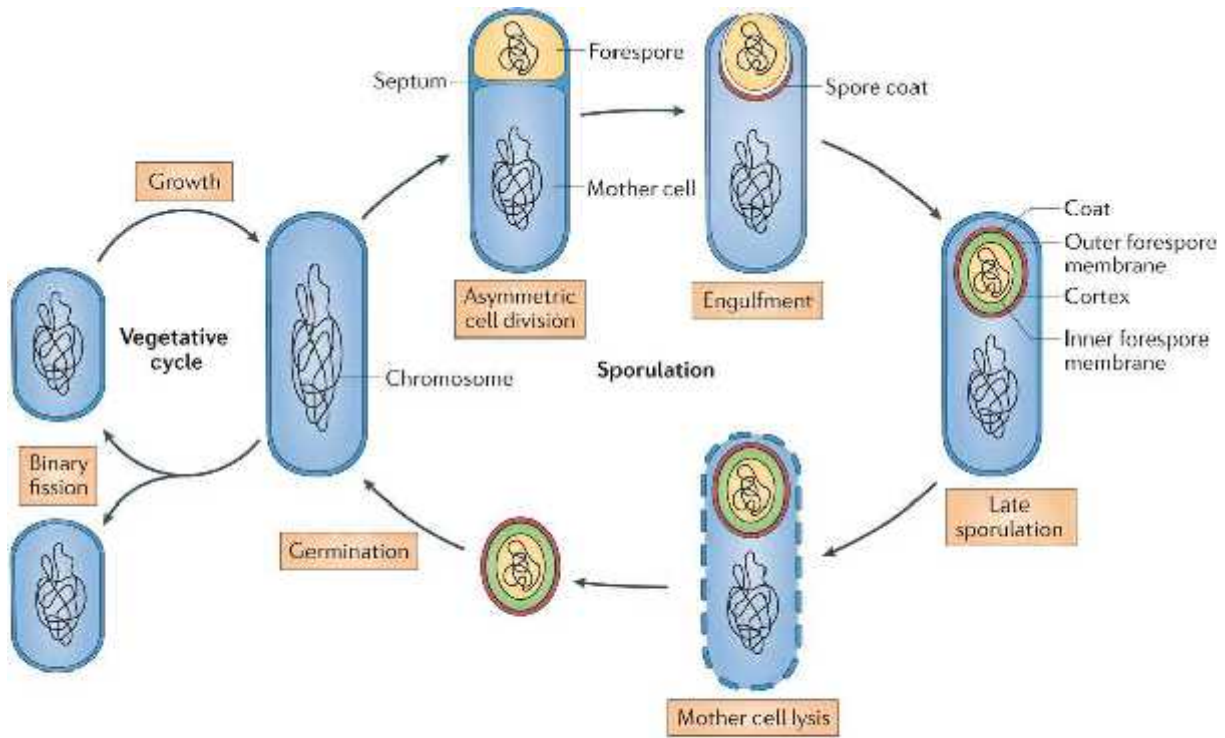


Figure 15: Cycle de sporulation et germination de *B. subtilis* [McKenney et al, 2013].

Le premier stade se caractérise par la présence d'un filament axial de matériel nucléaire qui s'étend sur toute la longueur de la cellule et qui correspond au génome dupliqué. Dans la deuxième étape, les deux génomes se séparent par fragmentation du filament axial, en même temps que la membrane cytoplasmique s'invagine près d'un pôle de la cellule pour former un septum. Ce septum partage la cellule en deux compartiments de taille inégale. Le septum de sporulation va envelopper le cytoplasme du petit compartiment pour former une préspore caractéristique du stade trois. Le grand compartiment correspond à la cellule mère. A cette étape, le processus de la sporulation est irréversible et les stades suivants correspondent à la maturation de la spore à l'intérieur de la cellule mère. [Durand, 2014]

La sporulation se traduit d'abord par la division asymétrique du sporange en deux compartiments : la cellule mère et la préspore, séparées par le septum. L'internalisation de la préspore par la cellule mère est suivie de la fission membranaire située au pôle opposé du sporange. Une double membrane liée à la préspore est formée. L'assemblage des couches de la spore commence aussitôt après l'initiation de l'internalisation et se poursuit jusqu'à la fin

de la sporulation. Le cortex, peptidoglycane entre les membranes interne et externe de la préspore, est formé à la fin de la sporulation. Dans la dernière étape, la cellule mère est lysée pour libérer les spores matures dans l'environnement. Les spores sont capables de germer rapidement et de reprendre une croissance végétative en réponse à un apport en nutriments dans le milieu. [Durand, 2014]

Les spores peuvent rester des années dans un état de dormance attendant ainsi le retour des conditions environnementales favorables. Lorsque cela arrive, elles se reconvertissent en cellules végétatives capables de croître [Setlow, 2003]. La germination est un processus essentiellement biophysique aboutissant à la perte des propriétés spécifiques des spores telles que leur structure unique, leur extrême résistance et leur dormance. Elle se produit sans nécessité de synthèse de nouvelles macromolécules car l'appareil de germination est déjà présent dans la spore mature en dormance [Moir, 2006].

La germination comprend 2 phases : (voir figure 16)

- ✓ La germination proprement dite, pendant laquelle la spore se réhydrate (elle perd alors sa thermo-résistance) et remet en fonction la machinerie des synthèses des acides nucléiques et protéines ;

- ✓ L'émergence de la cellule hors de l'enveloppe de la spore, et la croissance de la cellule jusqu'au stade de la première division. [Couvert, 2002]

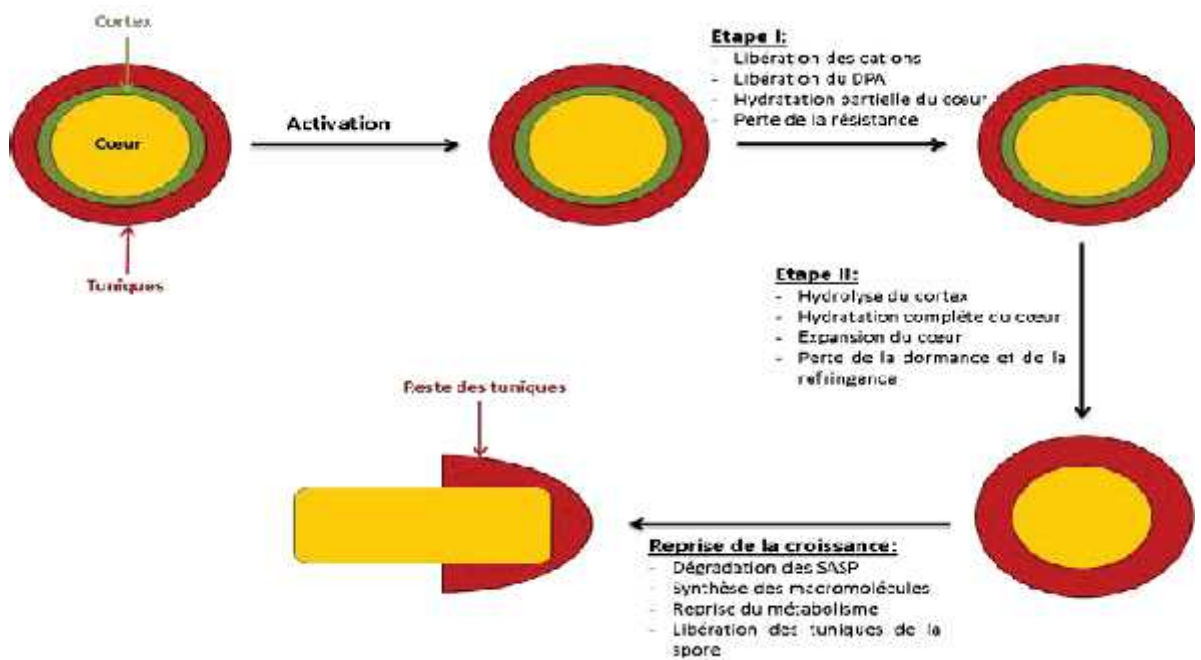


Figure 16: Les étapes de la germination chez *B. subtilis*, d'après Setlow et al. [Setlow, 2003].

B- Température et germination sporale (*Bacillus cereus*)

L'influence de la température sur la germination sporale est très claire :

- aucune germination à plus de 46 °C et 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 h ;
- à 25 °C, la germination commence à 10 heures et est entièrement terminée à 12 h

[Turnbull , 1998a ; Turnbull , 2008a]. cité par [Dromingy, 2008]

C- Survie sporale 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**].

5. Thermo résistance**5.1 Définition**

Il s'agit des propriétés caractéristiques de l'endospore bactérienne liée à plusieurs facteur 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 riche en acide dipicolinique (et dipicolinate de calcium) et enrichis en soufre.
3. La présence d'enveloppe successive comme le cortex amorphe et les tuniques sporale 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.

5.2 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 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 Gaillard *et al.* et qui proposent pour cette raison une température de référence de 100 °C au lieu de 121.1 °C [Gaillard *et al.*, 1998]. Pour cette raison, beaucoup des valeurs D de *Bacillus cereus* sont citées à une température allant de 85 °C à 100 °C, rarement au-delà. [Dromigny, 2008]

Tableau 08: Thermorésistance de diverses espèces [Jérôme *et al.*, 2008]

Espèces	D120°C(en s)
<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

5.3 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.

❖ 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]

5.4 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. Les deux derniers facteurs induisant une augmentation de la déshydratation, c'est celle-ci qui serait l'origine de la thermo résistance des spores [Sugiyama, 1951].

En effet, Beaman et Gerhardt (1986) ont observé que le fait d'élever la température de sporulation accentuait la déshydratation du protoplaste, ce qui avait pour conséquence une très nette augmentation de la thermo résistance. Ce phénomène serait à l'origine de la différence de comportement qui existe entre les psychrophiles peu résistants, les mésophiles de résistance moyenne et les thermophiles très résistants [Gombas,1983], d'après Warth(1978), la résistance des spores dépendrait donc de la température maximale de croissance de la forme végétative. Ainsi Beaman *et al.* (1982), après avoir estimé que le protoplaste de *Bacillus cereus* T (mésophile) contenait cinq fois plus d'eau que celui de *Bacillus stearothermophilus* (thermophile), constataient que le thermophile était quasiment 600 fois plus résistant. Il est bien évident que la plus grande stabilité des protéines et du matériel génétique des thermophiles participe également à cet écart. [Gaillard, 2003].

L'acquisition de la thermo-résistance est réalisée via l'accumulation de plusieurs composés en quantités très importantes dans le cortex, les principaux étant l'acide dipicolinique (DPA) et des cations divalents, essentiellement du calcium Ca²⁺. En 1960, Hashimoto et al. remarquent déjà que la résistance est fortement liée à la quantité d'acide dipicolinique présent, il en va de même pour la réfringence. La teneur en acide dipicolinique est telle, jusqu'à 15 % de la masse de la spore, qu'elle dépasse le seuil de solubilité, le composé se trouve alors sous forme cristalline [Leuschner et Lillford, 2001].

5.5 Calcul des traitements thermiques

Les traitements thermiques sont utilisés en industrie alimentaire pour maîtriser la conservation, et en particulier la qualité sanitaire des produits. Ils peuvent être qualifiés de « pasteurisation » lorsque leur rôle est limité à l'élimination des formes végétatives des germes pathogènes et la plupart des non pathogènes, ou de « stérilisation » lorsque le traitement élimine toute entité viable. Ces traitements de stérilisation appliqués à des doses trop faibles par souci d'économie ou pour préserver la qualité organoleptique des produits, peuvent conduire à une destruction incomplète des micro-organismes. Après une lente récupération au sein de l'aliment, certaines de ces cellules pourront se développer et être la cause d'intoxication alimentaire ou d'altération du produit. Il est donc important pour l'industriel de connaître et de comprendre ces phénomènes d'endommagement infligés aux micro-organismes, afin d'en tenir compte dans l'application des barèmes de traitements en usine. [Couvert, 2002]

5.6 Effet du temps d'exposition à la chaleur

La microbiologie prédictive telle que nous la connaissons aujourd'hui est sans doute née des travaux de **Chick (1908)**. Son étude sur les procédés de désinfection par les agents chimiques et l'eau chaude, l'a en effet conduite à remarquer que la destruction des microorganismes se faisait suivant une relation exponentielle décroissante qu'elle écrivit :

$$N = N_0 \cdot e^{-kt}$$

Avec :

- t, le temps de traitement ;
- k, le taux de destruction;
- N₀, la population bactérienne initiale;
- N, le nombre de bactéries survivantes au temps t. [Gaillard. 2003].

Cependant, il faut attendre **1943** pour que **Katzin et al.** Introduisent la notion de « Decimal Reduction Time », encore notée DRT, et enfin **1957** pour que **Ball et Olsen** notent désormais cette durée de réduction décimale par la lettre D, qui sera universellement adoptée. [Couvert, 2002]

La destruction thermique des spores en fonction de la durée de traitement à une température donnée peut être modélisée. Le modèle déterministe qui définit la durée de réduction décimale, symbolisée D, est l'un des plus courants. Cette durée correspond au temps nécessaire (en minutes) pour réduire la population d'un facteur 10, à une température donnée (**Katzin et al., 1943**) (voir figure 17). La cinétique de destruction des microorganismes est, dans la grande majorité des cas, décrite par l'équation suivante basée sur une cinétique de l'ordre 1:

$$\log N = \log N_0 - \frac{t}{D}$$

avec

- t le temps de traitement,
- N₀ la population initiale,
- N la population survivante au temps t
- D la durée de réduction décimale [Gaillard, 2003].

Un autre paramètre, appelé paramètre de thermo résistance ou facteur d'activation thermique et noté z, correspond à la variation de la température de traitement qui conduit à la modification d'un facteur 10 la durée de réduction décimale D [Bigelow, 1921].

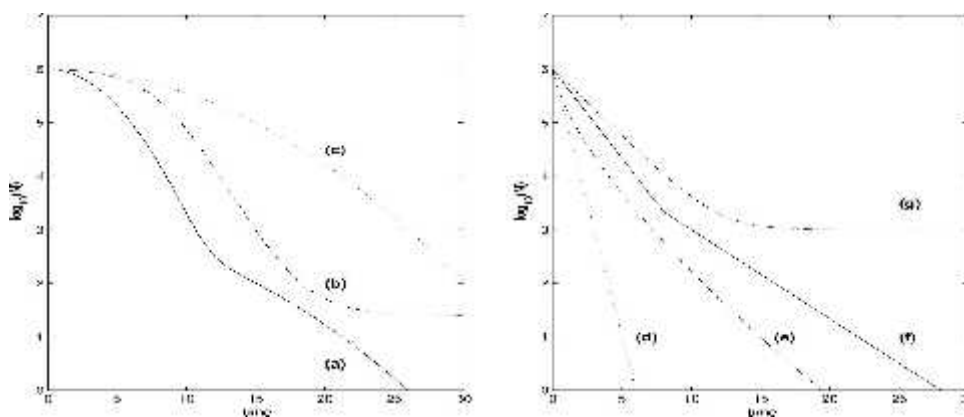


Figure 17: Exemple de courbes de réduction obtenues lors d'un traitement thermique [Coroller *et al.*, 2006].

Les différents types de courbes d'inactivation fréquemment observées: biphasique avec diminution non linéaire (a), sigmoïdale (b), concave (c), linéaire (d), convexe (e), biphasique (f), linéaire avec effet de traîne (g) [Coroller *et al.*, 2006].

Un grand nombre de modèles non linéaires est disponible pour ajuster les courbes de destruction présentant différentes allures : un épaulement initial, un effet de traîne, une allure sigmoïde (avec épaulement et traîne), une convexité ou concavité, une allure biphasique par exemple [Mafart *et al.*, 2010]. Ces modèles peuvent décrire chacune des allures précédemment citées via l'utilisation d'équations permettant une modélisation généralement satisfaisante de cinétique d'inactivation d'allures différentes [Geeraerd *et al.*, 2000; Geeraerd *et al.*, 2005].

Le travail présenté a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE), Université de Tlemcen,

1. Prélèvement des échantillons

Les poudres de cacao ayant servi à cette étude étaient conditionnées dans leurs emballages en plastique. Elles proviennent du marché international espagnol.

Cinq échantillons de poudre de cacao importée et commercialisée en Algérie ont été collectés.

- Les échantillons de poudre de cacao (paquets de 25 kg), ils se composaient de 100 % de cacao en poudre.
- Les échantillons de la poudre de cacao ont été transportés au laboratoire, stockés à une température de 4 C° pour être analysés.

2. la recherche de la flore aérobie sporulée mésophile dans les échantillons de la poudre de cacao

2.1 Milieux de culture

La gélose PCA (Plate Count Agar)

Suivant les indications, 1L de ce milieu de base a été préparé à partir du milieu déshydraté puis réparti en un flacon de 1L pour être stérilisé à l'autoclave. Ensuite le milieu fondu était homogénéisé et coulé en boîte de Petri.

La recherche des souches de *Bacillus cereus* a été effectuée selon les étapes suivantes :

2.2 Préparation des échantillons

La surface extérieure du sachet de la poudre de cacao a été désinfectée à l'alcool à froid puis le sachet a été ouvert en espace stérile (Bec Bunsen). À l'aide d'une pince stérile une quantité de poudre de cacao (environ 1g) était prélevée et mise dans 9 fois son poids (équivalent en volume) d'eau peptonée salée (PPS) (c'est la solution mère). Le mélange était ensuite porté au bain marie à 80°C pendant 10 min, suivi de refroidissement avec un

tremblement vigoureux dans l'eau glacée à la fin du temps fixé (10 minute a 80 C°). Ce traitement permet d'éliminer la flore végétative présente dans la poudre de cacao et de sélectionner les cellules bactériennes thermorésistantes ciblant les bactéries sporulées. Des dilutions décimales successives étaient alors réalisées dans l'eau peptonée salée à partir des mélanges traités thermiquement. Une série de dilutions allant à 10^{-5} est effectuée.

1ml ont prélevés de chaque dilutions et placés dans des boites de Pétri contenant du milieu PCA (plate count Agar) pour effectuer un ensemencement par profondeur .Les boites sont bien mélanger en exerçant un mouvement de 8. L'incubation est effectuée à 30°C pendant 18à 48 h.

3. Isolement et purification des souches bactérienne

Après l'incubation, a partir des boites de Pétri ayant servi au dénombrement, des colonies représentatives et de différents aspects étaient repérées et récupérées, on a choisit au maximum 3 à 4 colonies d'aspect différent par boite pour l'isolement.

Le milieu de culture de base est le milieu GN, ce milieu était répartie dans les boites de pétri. Chaque colonie choisit est ensemencée sur bouillon Coeur cervelle BHIB. L'incubation est effectuée à 30°C 24. Après, on introduit une pipette Pasteur stérile et boutonnée dans le BHIB ensemencé.

Celle-ci sert à pratiquer un isolement par stries sur gélose nutritive. Cette opération est renouvelée jusqu'à l'obtention des colonies pures.

4. Conservation de souches

- **A courte durées**

Toutes les souches purifiées ont été conservées dans des tubes de gélose nutritive inclinée à une température de 4 C° pour les examens qui suivre.

Ces bactéries sont placées dans un état de vie ralentie ou momentanément suspendue donc dans des conditions peu favorables pour leur multiplication).

- **A long durées**

Des précautions supplémentaires sont prises pour la conservation à long terme.

A partir de la gélose portant les colonies dont on a vérifié la pureté et la présence de spores, des colonies sont prélevées etensemencées dans les tubes contenant un bouillon BHIB. Les tubes sont laissés 24 h à l'étuve (30 C°)

Après 24 h d'incubation ; On additionne du glycérol (v/v) à la suspension bactérienne dans des micro-tubes à fond rond de conservation. Le mélange est homogénéisé au vortex.

Les micros tube sont transférés au congélateur pour le stockage.

5. Caractéristiques de pré-identification des souches

Les souches isolées à partir de poudre de cacao sont identifiées en se basant sur des caractères cultureux, morphologique, et quelques caractères biochimiques.

5.1 Etude morphologique des isolats

L'étude macroscopique nous a permis de relever le diamètre, la pigmentation et l'aspect des colonies. Alors que l'étude microscopique par l'intermédiaire de la coloration de Gram, nous a permis d'examiner la forme , le mode d'association et le résultat la coloration de Gram des bactéries .

- ❖ **Coloration et examen microscopique**

- **Coloration au bleu de méthylène**

Les bactéries sont colorées en bleu sombre.

Cette coloration est intéressante pour l'observation rapide des frottis mais elle permet seulement l'étude de la morphologie des bactéries.

Il est donc souvent nécessaire de la compléter par une coloration de Gram

- **Coloration de Gram**

La morphologie, l'arrangement des cellules le type pariétale des isolats sont déterminés sur des cultures jeunes par la technique de coloration de Gram (1884) à l'aide d'un microscope optique [ZEISS-weast Germany]

Les frottis sont observés au microscope optique avec l'objectif à immersion (objectif x100).

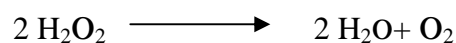
5.2 Etude biochimique

En plus des caractères morphologiques, l'identification est aussi effectuée sur la base de quelques caractères biochimiques:

5.3 Mise en évidence des enzymes respiratoires

✓ Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme de haut poids moléculaire existante chez toutes les bactéries aérobies, elle leur permet de vivre en présence d'oxygène. En plus se la chaîne respiratoire des cytochromes, il existe en effet chez les aérobies une chaîne accessoire courte fixant l'hydrogène en aboutissant à de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) selon la réaction :



Pour réalisé ce test : au contact d'une colonie isolée ou sur la pente d'une culture en gélose , on dépose une goutte d'eau oxygénée 10 volumes et on observe immédiatement .L'apparition de bulles , signifie un dégagement gazeux de dioxygène : la souche est dite catalase +, pas de bulles : catalase -[Prescott *et al .*, 2003]

Ce test, peut être réalisé en tube contenant 0.5 ml de H₂O₂. On prélevées des colonies et introduites dans le tube. Le résultat est identique à celui obtenu lors du test sur lame [Aouati, 2009; Chala, 2013].

5.4 Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

L'activité lécithinolytique à été recherchées.

Le milieu généralement utilisé est le milieu gélosé de Mossel dont le principe de fonctionnement est fondé sur les trois éléments suivants [Afnor, 2005]:

- L'absence de fermentation du mannitol par *Bacillus cereus*.
- La présence d'une lécithinase chez la majorité des souches de *Bacillus cereus*.
- La présence de polymixine B à 10 mg/L, permet une sélectivité satisfaisante

✓ Lécithinase

Selon la méthode de **Genta et Heluane (2001)**, 10mL d'une émulsion de jaune d'oeuf ont été additionnés à 90mL de milieu de base (Gélose nutritive). Maintenu en surfusion (45°C), ce mélange était coulé sur des boites de Pétri stériles.

Le test de la lécithinase a été réalisé par l'ensemencement de la souche en strie sur la gélose Mossel complet. Après 24 à 72 heures d'incubation à 30°C, l'apparition d'un halo de précipité blanchâtre (produits d'hydrolyse insolubles de lécithine) prouve que la souche possède la lécithinase

5.5 Caractérisation des souches par la galerie API 20E

C'est un système simplifié et standardisé, comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés permettant d'effectuer 22 tests biochimiques, des suspensions bactériennes effectuée, a partir des cultures de 18h, de chaque souche dans de l'eau physiologique sont inoculées dans les micros tubes de la plaque API 20 E. les plaques sont incubées pendant 24h à 30°C. Les réactions se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs [Camille, 2007]

5.6 Étude de la thermorésistance

5.6.1 Préparation de la suspension sporale

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

Les spores de *Bacillus* spp ont été alors récoltées à l'aide d'une spatule stérile en raclant la surface de la gélose. Les spores récupérées ont été mises en suspension dans un volume de 20mL d'eau distillée stérile à l'aide d'une pipette pasteur stérile. La suspension de spores préparée était centrifugée à 10000 g pendant 15 min. Le culot était récupéré et remis dans 20 mL d'eau distillée stérile. Cette opération était renouvelée deux fois. Le culot obtenu 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 10000g pendant 15min. [Ziane , 2014]

Les culots traités subissaient une nouvelle fois trois cycles de lavage toujours à l'eau distillée dans les mêmes conditions de la centrifugation. Tous les manipulations d'agitation ont été effectuées manuellement avec retournement doux afin d'éviter la formation des floccs.

Les culots récupérés précédemment ont été ensuite re-suspendus dans un volume minimum d'eau distillée stérile de façon à avoir une forte concentration en spores. La concentration en spores était estimée par dénombrement en masse en milieu nutritif gélosé. Le stock de spores de *Bacillus* spp obtenu était conservé à 4°C dans de l'eau stérile avant l'étape de traitement thermique. [Ziane, 2014]

6. Etude du traitement thermique

Plusieurs méthodes ont été décrites pour l'étude de la thermo résistance des bactéries parmi lesquelles l'utilisation du thermorésistomètre et la technique des capillaires.

Pour effectuer notre traitement thermique nous nous sommes servi de Thermorésistomètre Mastia.

6.1 Description de l'appareil (Thermorésistomètre Mastia)

Source : [manuel technique du fabricant] ; [CTCPA.2014]

Thermorésistomètres Mastia a été développé dans les laboratoires du groupe Food Technologie de l'Université technique de Carthagène.



Figure 18:Thermorésistomètre Mastia : vue entière

- ❖ Appareil permettant de réaliser des traitements thermiques sous différentes conditions de temps, températures et atmosphère gazeux.
- ❖ Cet appareil permet de travailler sur des plages de température allant de 20 à 150°C sous pression de gaz (azote, oxygène) et de réaliser des prélèvements sans perturber le milieu.
- ❖ Le résistomètre est muni d'un système d'agitation qui permet de travailler sur des milieux modèles (synthétiques) ou des matrices alimentaires homogènes. [CTCPA.2014]
- ❖ Se compose d'un récipient principal dans lequel sont appliqués des traitements thermiques, un moteur permettant l'homogénéisation du milieu de chauffage, une unité de contrôle principale pour contrôler le chauffage, l'échantillonnage et l'agitation, Une

source de pression externe et un collecteur de fraction pour permettre l'échantillonnage dans des expériences de courte durée. L'unité de commande principale consiste en un contrôleur logique de programme.



Figure 19: Thermoresistomètre Mastia : principaux composants

L'instrument se compose d'un récipient en acier inoxydable (diamètre externe de 8.5x 12 cm ; 400 ml de capacité) avec un couvercle à visser avec le joint circulaire. Ce "chapeau"(plafond) a un axe d'agitation avec du téflon de frottement soutenant un propulseur, et 8 ports avec des couvercles à visser : un d'ils présentent la source de pression (N₂) ; un autre est pour l'orifice d'injection d'inoculum ; un troisième port tient le tube d'échantillonnage ; l'autre port tient un thermocouple pour

surveiller la température pendant le traitement de la chaleur ; 2 ports tiennent les 2 branches de l'élément de chauffe électrique ; et 2 autres ports tiennent les branches de la bobine de système de refroidissement.



À l'intérieur du navire, un écran de déflecteur est fixé au "chapeau"(plafond) démontable afin d'améliorer la turbulence.

Le récipient principal peut être pressurisé à travers un manomètre connecté à la source de pression. La pasteurisation était nécessaire pour permettre l'extraction d'échantillons à faible pression interne (inférieure à 100 ° C) ou lorsque le milieu était visqueux.

L'instrument peut être programmé pour effectuer des expériences isothermiques et expériences non isothermiques à une température croissante ou décroissante linéaire.

- Pour les traitements isothermiques, le récipient est rempli avec le milieu de chauffage et, une fois que la température de traitement a atteint la stabilité, on inocule le milieu avec 0,2 ml de la suspension microbienne. La température est maintenue constante pendant toute l'expérience.

Les échantillons sont collectés manuellement dans des tubes stériles à des intervalles prédéfinis, en appuyant « switch » sur l'écran tactile.

Les échantillons sont ensuite dilués de manière appropriée et immédiatementensemencé et incubés

- Pour les traitements non isothermiques, la procédure est similaire, mais le thermorésistomètre est programmé pour effectuer le profil de température correspondante.

L'application principale de cette technique est destinée à l'industrie alimentaire, afin d'étudier la résistance à la chaleur des microorganismes impliqués dans le flux d'aliments traités thermiquement, tels que les aliments en conserve, les jus de fruits, le lait, les produits pour bébés, etc. Dans ce sens, il peut être utilisé pour tester si les caractéristiques de chaleur appliquées aux aliments sont suffisantes pour assurer leur stabilité et leur sécurité. Il peut également être utilisé pour tester la qualité nutritive des aliments traités thermiquement. Finalement, il pourrait être intéressant pour les autres industries qui traitent des milieux liquides exposés aux traitements thermiques.

Générateur

Le générateur d'azote F-DGSi modèle NG3 est conçu pour fournir un flux continu d'azote gazeux à une pression prédéterminée. Le générateur est conçu pour une utilisation 24 heures

sur 24 et est alimenté à partir d'une prise de courant standard de 2 ou 3 broches de 110 v ou 230 v.

L'azote est produit à l'aide de la technique de prélèvement de pression "Swing Adsorption" qui utilise un carbone moléculaire pour piéger l'oxygène et l'eau, et permet à l'azote de traverser ses pores. À la fin d'une période prédéterminée, l'oxygène est libéré du tamis et la période de pressurisation peut recommencer à générer encore une fois. Le processus est totalement égalisé, ce qui signifie que bien que l'azote circule de la sortie, l'oxygène restant est évacué de l'enceinte.



Figure 20: Générateur d'azote F-DGSi modèle NG3

6.2 Evaluation de la résistance d'une spore sélectionnée vis-à-vis un traitement thermique (Souche de référence)

Avant le traitement, On a effectué un dénombrement du nombre initial de la suspension sporale (N_0). Pour cela, une série de dilution est effectuée jusqu'à 10^{-7} . À partir

des trois dernières dilutions, 0.1mL est ensemencé en surface dans des boites de pétri stériles. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24 à 48h.

6.3 Application du traitement thermique

Le thermoresistometer Mastia se compose d'un récipient en acier inoxydable de 400 ml où l'échantillon est chauffé sous pression d'azote [Conesa, Andreu, Fernandez, Esnoz, et Palop, 2009]. Le récipient a été rempli avec 400 ml de bouillon nutritif, puis mis sous pression et mis à la température de traitement sélectionné (100 C°). Lorsque la température de chauffage choisi a été atteint (100 C°), 0,2 ml de la suspension de spores a été injectée a l'aide d'une seringue. Des échantillons (1 ml) ont été pris à différents niveaux. Les intervalles de temps et le nombre de spores viables a été déterminé en double exemplaire, après des dilutions appropriées dans l'eau physiologique.

6.4 Dénombrement des survivants

Le dénombrement des spores viables est réalisé par ensemencement en masse sur gélose nutritive en boites de pétri. des solutions diluées recueillies après le traitement thermique sont alors déposées dans une boite de pétri où de la gélose est coulée pour un ensemencement en surface.

Les boites sont incubées à une température de 37 C° et pendant 24 h.

7. Analyse des données de survie des spores thermorésistantes

Les courbes de survie ont été équipées du log-linéaire (équation (1)) Et les modèles Weibull (équation (2) [Mafart et al., 2002]

Selon les équations ci-dessous:

$$\log N = \log N_0 - \frac{t}{D} \dots\dots\dots (1)$$

- t le temps de traitement, (min/s)
- N0 la population initiale,
- N la population survivante au temps t
- D la durée de réduction décimale (min /s)

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

$$\log D = \log D' - \frac{T - T'}{Z} \dots\dots\dots (2)$$

Z correspond à l'élévation de la température qui permet de diviser la valeur de D par 10

T : Température étudiée ;

T' : Température de référence notée 121.1°C ;

D' : la durée de traitement thermique à la température de référence 121.1°C permettant une réduction décimale de la population microbienne

1. La recherche de la flore aérobie sporulée mésophile dans les échantillons de la poudre de cacao

1.1 Isolements et purifications souches

Des colonies à différents aspect macroscopique et microscopique sont apparues et après une étape de purification, 33 souches ont été retenues selon les critères de sélection fixés déjà auparavant c'est-à-dire des bacilles à Gram positif et capable de former des spores.

1.2 Pré-identification des souches bactériennes

❖ Aspect microscopique

La détermination de la morphologie, l'arrangement cellulaire, ainsi que le Gram des souches ont été réalisés sur des souches jeunes cultivées à 30°C sur milieu GN, par contre la formation des corps sporaux a été observée sur des cultures âgées.

La coloration au bleu de méthylène des isolats montre qu'il se présente sous forme bacillaire. La coloration de Gram d'une culture jeune a révélé que l'isolat est Gram positif aux extrémités arrondies et souvent disposés en paires ou en chaînettes aussi.

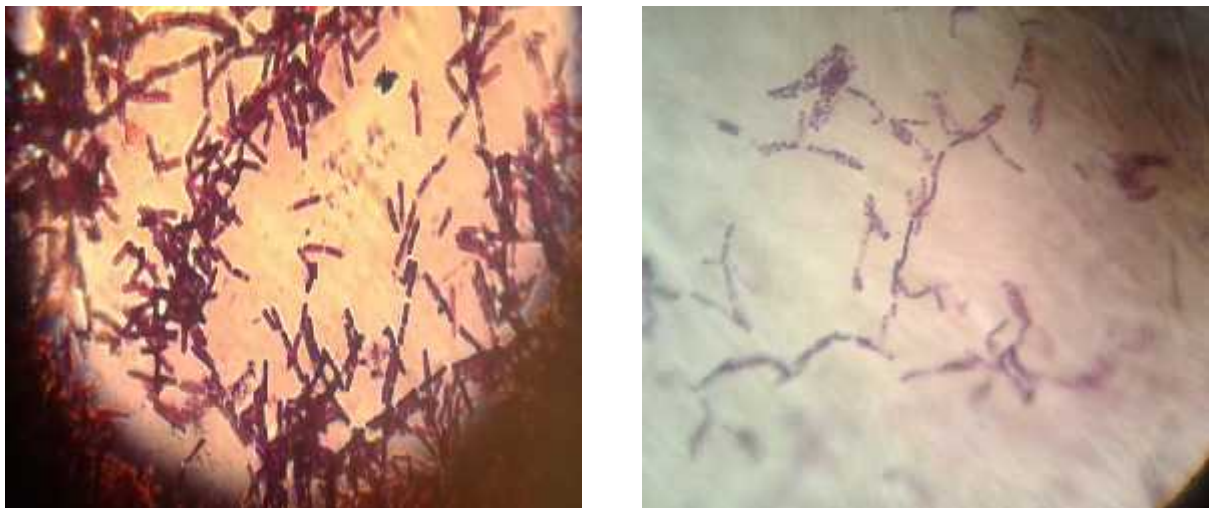


Figure 21: Résultats d'observations microscopiques après la coloration de Gram (Observation par microscope optique G×100 a immersion)

❖ Aspect macroscopique

L'observation macroscopique des souches après 3 jours sur le milieu GN cultivée à 30°C (Figure 22)

Les résultats de l'examen macroscopique des souches sont mentionnés dans le Tableau 09



Figure 22: Aspect macroscopique des colonies sur le milieu GN

2. Caractéristiques biochimiques des isolats**2.1 Identification biochimique**

La mise en évidence des enzymes respiratoire (catalase) s et les activités hydrolytiques extracellulaires (lécithinase) a révélé que celles-ci sont présentes chez les souches testées. Ces activités sont variables et reflètent les potentialités propres à chaque souche.

➤ Teste de catalase

Le teste de catalase était positive pour toutes les souches.(voir figure 23)



Figure 23 : Test de la Catalase : Apparition de bulles de gaz

➤ **La croissance sur milieu Mossel**

Sur le milieu Mossel à 30°C et après 24H d'incubation, la majorité des colonies apparait de couleur rose (mannitol-négatif) et presque toujours entourées d'un halo de précipité, indiquant la production de lécithinase. (Figure 24)

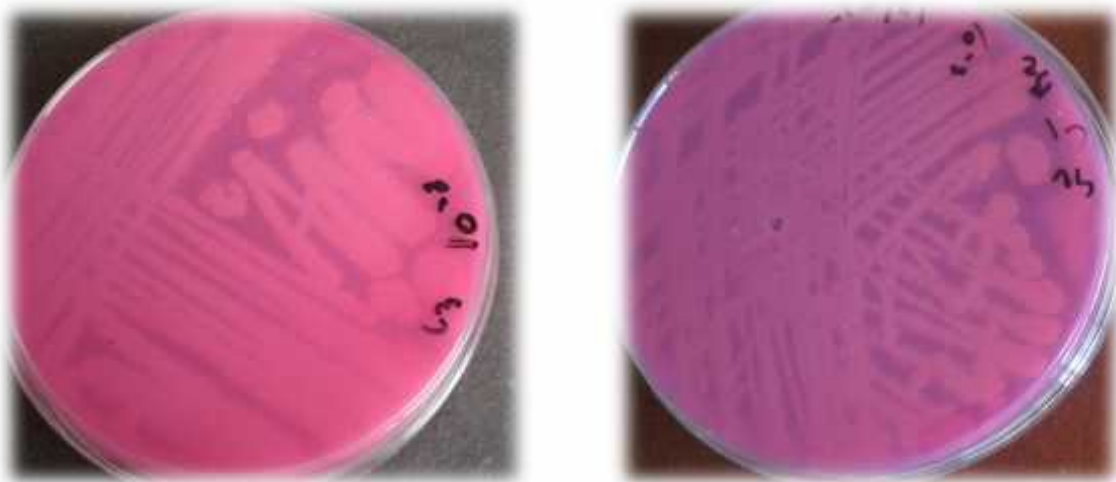


Figure 24: Aspect des colonies après 24 h d'incubation à 30 °C sur milieu gélosé de Mossel

Tableau N° 09: Résultats de l'observation macroscopique et microscopique de 33 souches retenues, les résultats de quelques tests biochimiques

Le codage des souches était conforme à leur température d'isolement: M (Mésophile) pour les souches isolées à 30 ° C

Ech	Souches	Observation macroscopique	Gram	Position de la spore	Catalase	Lécithinase	Mannitol
C1	S1MC1	Blanc cassé ,5 mm de diamètre, une forme irrégulière avec des bords ondulés, Ils ont des textures mate avec des colonies lisses et humides .	+	Centrale non déformante	+	+	-
	S2MC1	gris crémeux, 1/2 mm de diamètre, une forme ronde avec des ondulations entières, des colonies humides	+	Centrale non déformante	+	+	-
	S3MC1	Blanc cassé ,4/5 mm de diamètre, une forme irrégulière, texture granuleuse	+	Subterminale non déformante	+	+	-
	S4MC1	Blanche, 2mmde diamètre, une forme ronde avec des ondulations entières, des colonies humides et brillantes	+	Centrale non déformante	+	-	+
	S5MC1	Blanc cassé ,4mm de diamètre, une forme irrégulière, texture granuleuse avec des colonies lisse et humide	+	Subterminale déformante	+	-	+
	S6MC1	Blanc cassé ,5mm de diamètre , une forme circulaire aves des bords ondulés, des colonies humides et ridé	+	Centrale non déformante	+	-	+
	S7MC1	Blanc cassé ,4/5mm de diamètre, une forme circulaire avec des bords ondulés , des colonies lisses et humides	+	Centrale non déformante	+	+	-

	S8MC1	Gris crémeux, 2mm de diamètres, une forme ronde entières, des colonies granulés	+	Subterminale non déformante	+	+	-
	S9MC1	Blanche, 4/5 mm de diamètres, formes irrégulières avec des bords ondulés, texture mate et des colonies humides	+	Subterminale déformante	+	-	+
C2	S1MC2	Blanche, 5 mm de diamètres, forme irrégulières avec des ondulations vers les bords , texture granuleuse et des colonies humides	+	Centrale non déformante	+	+	-
	S2MC2	Blanche .5/6 mm de diamètres, forme irrégulières avec des bords ondulés et des colonies lisses et humides	+	Centrale non déformante	+	+	-
	S3MC2	Blanc cassé ,4mm de diamètres, forme ronde , texture mate et des colonies lisses et humides	+	Centrale non déformante	+	+	-
	S4MC2	Blanc cassé, 3/4 mm de diamètre, forme ronde avec des bords entiers, des colonies ridés et humide	+	Centrale non déformante	+	+	-
	S5MC2	Blanc cassé, 2/3 mm de diamètres. forme ronde avec des bords entiers, texture mate et des colonies lisses et humides	+	Centrale non déformante	+	+	-
C3	S1MC3	Gris crémeux, 1 mm de diamètres, formes irrégulières	+	Subterminale déformante	+	+	-

	S2MC3	Blanc cassé ,5 mm de diamètres, forme irrégulières avec des bords ondulés, texture granuleuse et des colonies humides	+	Centrale non déformante	+	+	-
	S3MC3	Blanc cassé,1/2 mm de diamètres ,forme ronde , texture mate et des colonies humides	+	Subterminale déformante	+	+	-
	S4MC3	Blanc cassé ,3/4 mm de diamètres, forme irrégulières, les colonies humides et ridés	+	Centrale non déformante	+	+	-
	S5MC3	Gris crémeux .2 mm de diamètres, forme ronde, textures granuleuses, des colonies humides	+	Centrale non déformante	+	+	-
	S6MC3	Blanc cassé ,3.4 mm de diamètres, forme irrégulières avec des ondulations vers les bords, des colonies lisse et humide	+	Centrale non déformante	+	+	-
C4	S1MC4	Blanc cassé, 1/2 mm de diamètres, forme ronde, aspect visqueux, des colonies lisse	+	Centrale non déformante	+	+	-
	S2MC4	Blanc cassé, 3/4 mm de diamètres, forme irrégulières avec des bords entiers, texture granuleuse et des colonies lisses	+	Centrale non déformante	+	+	-
	S3MC4	Blanc cassé, 1/2 mm de diamètres, forme ronde, des colonies ridés et humides	+	Subterminale non déformante	+	-	+
	S4MC4	Blanc cassé ,3/4 mm de diamètres, formes ronde	+	Subterminale non déformante	+	+	-

		avec des ondulations, des colonies lisses et humides		déformante			
	S5MC4	Blanc cassé, 3/4 mm de diamètres, textures granuleuses, des colonies et humides	+	Subterminale non déformante	+	-	+
	S6MC4	Blanc cassé, 3/4 mm de diamètres, forme irrégulières, textures granuleuses, des colonies humides	+	Subterminale non déformante	+	-	+
	S7MC4	Blanc cassé, 1/2 mm de diamètres, formes rondes des colonies ridés et humides	+	Centrale non déformante	+	+	-
C5	S1MC5	Gris crémeux, 1/2 mm de diamètres, aspect visqueux, des colonies lisse	+	Subterminale déformante	+	+	-
	S2MC5	Blanc cassé, 4/5 mm de diamètres, formes irrégulières, des colonies bombés et lisse	+	Subterminale déformante	+	+	-
	S3MC5	Blanc cassé, 3/4 mm de diamètres, formes irrégulières, aspect visqueux, des colonies ridés et lisses	+	Centrale non déformante	+	+	-
	S4MC5	Blanche, 1/2 mm de diamètres, forme rondes avec des bords entiers, des colonies humides	+	Subterminale non déformante	+	+	-
	S5MC5	Gris crémeux, 2/3 mm de diamètres, formes rondes avec des bords ondulés, des colonies lisses et humides	+	Centrale non déformante	+	+	-
	S6MC5	Blanc cassé, 2/3 mm de diamètres, formes irrégulières, textures granuleuses, des colonies lisses et humides		Centrale non déformante	+	+	-

2.2 Résultats des plaques API20E

Le reste des tests biochimiques ont été réalisés sur plaques API 20 E, 25 souches ont été sélectionnées et identifiées, les résultats obtenus par le logiciel API feuille de calcul pour l'identification microbienne (Jean *et al.*, 2007) sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau N° 10: Résultats des plaques API20E, des 25 souches sélectionnées

Souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO2	
S1MC1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	C1
S2MC1	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	
S3MC1	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	
S4MC1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S5MC1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S6MC1	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S7MC1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	
S8MC1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	
S1MC2	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	C2
S2MC2	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
S3MC2	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S4MC2	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S5MC2	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
S1MC3	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C3
S3MC3	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S4MC3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	
S5MC3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S2MC4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	C4
S4MC4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S6MC4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

S7MC4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
S1MC5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	C5
S2MC5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S4MC5	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S6MC5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	



Souches sélectionnées pour la sporulation

- Souche S5MC1 correspond à *Bacillus cereus* 2
- Souche S3MC2 correspond à *Bacillus cereus* 1
- Souche S4MC3 correspond à *Bacillus anthracis*

Les autres souches sélectionnées correspondent à :

- ✓ *Bacillus anthracis*
- ✓ *Geobacillus thermoglucosidiasus*
- ✓ *Bacillus lentus* (02 souches)
- ✓ *Brevibacillus choshinensis* / *Centrosporus* / *brevis* (04 souches)
- ✓ *Bacillus cereus* 1 (07 souches)
- ✓ *Aneurinbacillus aneurinilyticus*
- ✓ *Bacillus amylolique faciens*
- ✓ *Bacillus cereus* 2
- ✓ *Brevibacillus agri*
- ✓ *Bacillus sphaericus* / *fusiformis*/ *badius* (03 souches)

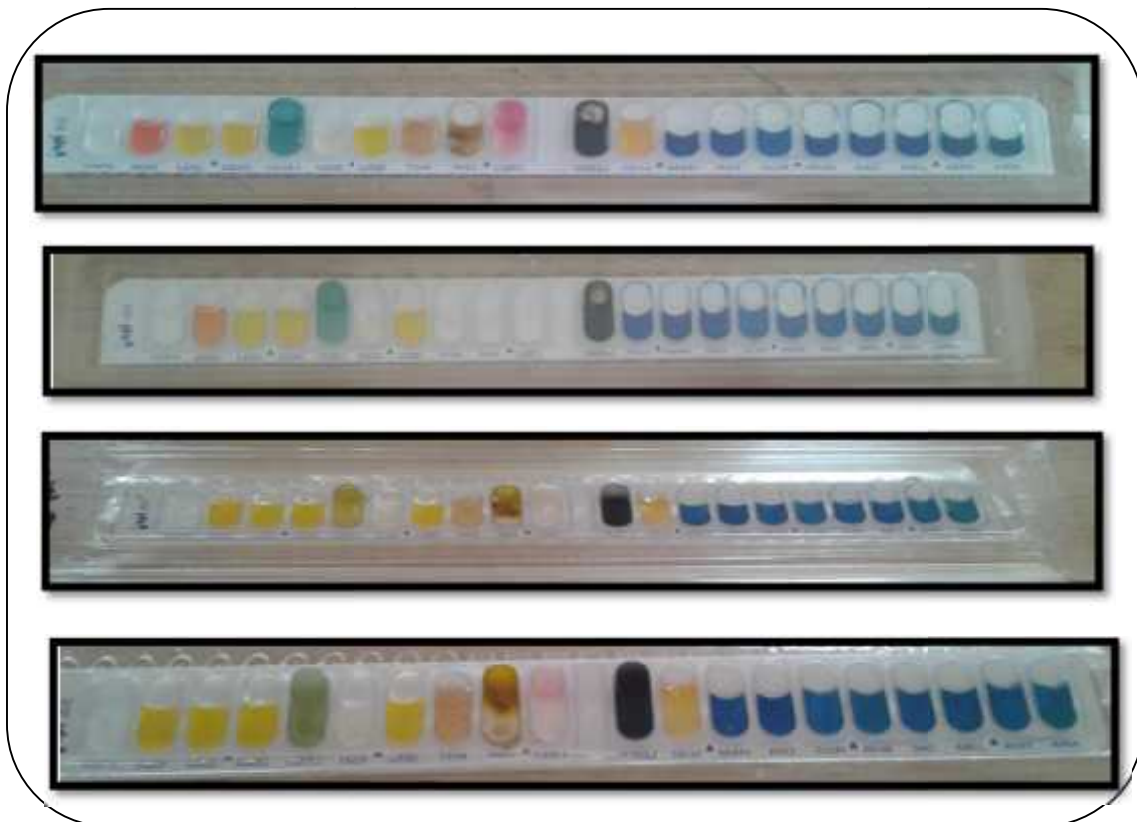


Figure 25: Résultats des plaques API20E de quelques souches sélectionnée après l’ajouter des réactifs

3. Etude de la thermorésistance d'une spore de référence de *Bacillus Cereus* (ATCC)

La thermorésistance de la souche a été étudiée à différentes températures : 90°C, 100°C et 105°C/ BHIB a pH=7. (voir tableau n° 11).

Des différentes valeurs de D sont obtenues après un traitement des spores. (Voir la figure 26, 27, 28,29).

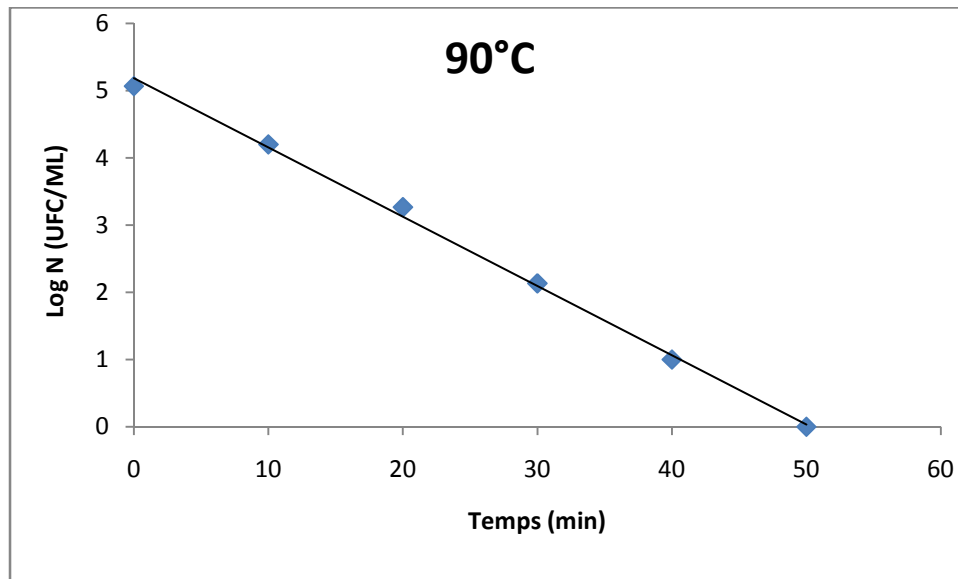


Figure 26: Evolution de log N (UFC.mL⁻¹) en fonction du temps de traitement thermique pour *Bacillus cereus* ATCC ; Température de traitement : 90°C.

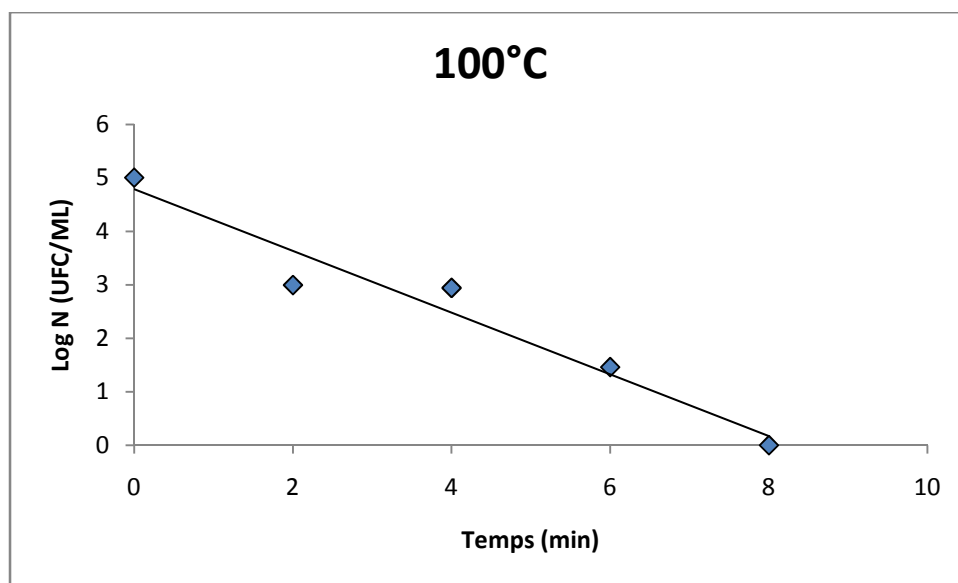


Figure 27: Evolution de log N (UFC.mL⁻¹) en fonction du temps de traitement thermique pour *Bacillus cereus* ATCC ; Température de traitement : 100°C

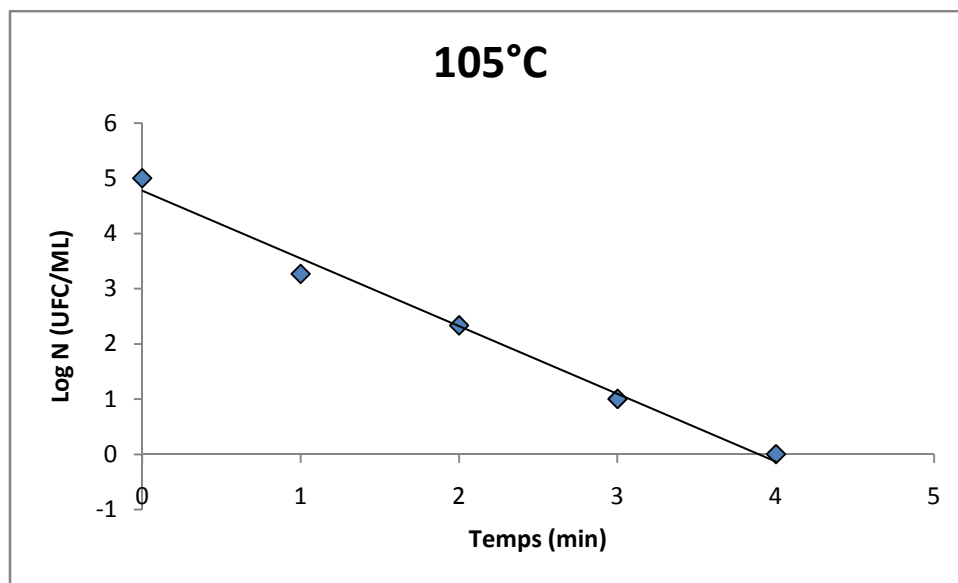


Figure 28: Evolution de log N (UFC.mL⁻¹) en fonction du temps de traitement thermique pour *Bacillus cereus* ATCC ; Température de traitement : 105°C

Tableau N°11 : Temps de réduction décimale de spore *Bacillus Cereus* ATCC a différentes températures

T Température en °C	DT Temps de réduction décimale en minute
90°C	9.83
100°C	1.69
105°C	0.75

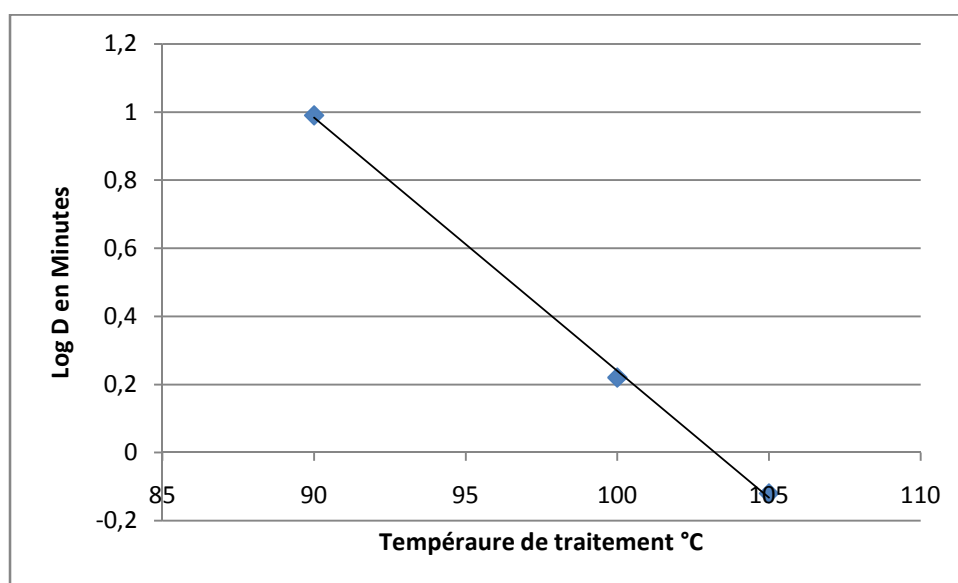


Figure 29: Sensibilité au traitement thermique de spore *Bacillus Cereus* (ATCC)

La présente étude a pour premier objectif l'identification et la caractérisation des spores *Bacillus cereus* isolées de la poudre de cacao.

Pour ce faire, 33 souches bactériennes isolées de 5 types de poudre de cacao ont été identifiées, des approches différentes mais complémentaires de microscopie et de tests biochimiques ont été utilisées pour l'identification de ces souches.

La démarche que nous avons suivie pour l'identification est la suivante:

Dans un premier temps, nous nous sommes assurée de l'appartenance de nos souches au genre *Bacillus* [Claus et Berkeley, 1986] par l'étude de certains caractères morphologiques et biochimique à savoir l'étude des caractéristiques des colonies (forme, aspect et taille) sur des cultures de 48 h en gélose nutritive, Les résultats de la caractérisation morphologique montrent que les souches isolées sont des bâtonnet court ou long isolés ou en chaînette aux extrémités arrondies.

L'utilisation de la coloration de Gram combinée à une observation microscopique a dans un deuxième temps montré que la majorité des isolats sont des bacilles à Gram positif la présence de spores, leur forme, et position dans le sporange a été détectée au microscope optique.

La présence de la catalase est dans un troisième lieu décelée en déposant une goutte d'eau oxygénée sur une colonie de 24 h (gélose nutritive). L'apparition de bulles (O₂) au niveau de la colonie indique que la souche est catalase positive, sinon elle est catalase négative.

Les tests biochimiques réalisés sur les souches isolées montrent la présence d'une catalase. Généralement, c'est le cas de la majorité des bactéries aérobies membres de la famille des *Bacillaceae* [Oren, 2002].

Selon le **Bergey's manual of systematic biology**, les caractéristiques décrites précédemment représentent les traits typiques des espèces appartenant au genre *Bacillus*. En effet une grande partie de ces souches sont assignées à ce genre.

Pour prouver qu'il s'agisse de *Bacillus cereus*, nous avons utilisé la gélose de Mossel. L'obtention des colonies roses indique l'absence de fermentation du mannitol par *Bacillus cereus* et l'apparition d'un halo opaque autour de chacune des colonies obtenues montre que les lécithines ont été hydrolysées par la lécithinase des *Bacillus*. Cela approuvé par notre recherche indique que nos souches appartiennent au genre *Bacillus cereus*.

Après avoir confirmé ce qui précède, un recours aux plaques **API** pour réaliser les autres tests biochimiques a été effectué. Ce système est largement utilisé dans les méthodes d'identification pour les membres du genre *Bacillus* et apparenté. Des études réalisées ont montré que la meilleure reproductibilité des tests pourrait être réalisée avec des plaques **API** qu'avec les tests classiques surtout pour la taxonomie du genre *Bacillus*. De plus, ces galeries se sont révélées utiles dans la caractérisation de plusieurs nouvelles espèces aérobies formant des endospores [De VOS *et al.* 2009].

Il importe de signaler que le manque de moyen au laboratoire nous a exigé le recours aux plaques **API 20 E.** pour l'identification biochimique des bactéries du genre *Bacillus* au lieu des **API 50CHB** préférables dans ce genre de test.

Une confirmation de l'identité d'espèce est effectuée grâce à une galerie API 20E à partir des colonies typiques.

Sur les 33 souches seules 25 ont été sélectionnées : **8** souches dans l'échantillon (C1), **5** souches dans l'échantillon (C2), et **4** souches dans l'échantillons (C3), **4** dans (C4) et, **5** dans (C5) . Ce choix est justifié par le fait que ces souches présentent catalase+, licithinase+ et manitol-

Les isolats identifiés appartiennent à plusieurs espèces différentes dont, , (8%) *Bacillus anthracis*, (4%) *Geobacillus thermoglucosidiasus*, (8%) *Bacillus lentus*, (16%) *Brevibacillus choshinensis* /*Centrosporus* / *brevis*, (32%) *Bacillus cereus* 1, (4%) *Aneurinbacillus aneurinilyticus*, (4%) *Bacillus amylolique faciens*, (8%) *Bacillus cereus* 2, (4%) *Brevibacillus agri*, (12%) *Bacillus sphaericus* / *fusiformis*/ *badius*.

Presque toutes les souches n'utilisent pas les sucres présent dans cette plaque à l'exception de quelques unes (S1MC1, S2MC1, S3MC1, S7MC1, S8MC1, S5MC2 S4MC3) Il n'y avait pas de production d'indole ce qui est fréquent chez ce type de microorganismes [Chen *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009].

Les résultats de cette étude ont confirmé la présence de souches de *Bacillus cereus* dans la poudre de cacao.

Le groupe *B. cereus* comprend six espèces génétiquement très proches. Ces espèces, regroupées sous le nom de *Bacillus cereus sensu lato* sont : *B. cereus sensu stricto* : un

pathogène opportuniste pour les humains et les animaux ; *Bacillus anthracis* : responsable de l'anthrax également chez les humains et les animaux ; *Bacillus thuringiensis* : un pathogène des insectes ; *Bacillus weihenstephanensis* qui est un psychrotolérant ; *Bacillus mycoïdes* et *Bacillus pseudomycoïdes*, des espèces non pathogènes et qui se distinguent des autres membres du groupe par l'aspect particulier de leurs colonies rhizoïdes sur milieu nutritif solide. La distinction entre ces deux dernières espèces est basée sur la composition en acide gras de leur membrane cellulaire. [Didouh, 2015]

Malgré leur proximité génétique, les relations phylogénétiques et taxonomiques précises des membres du groupe *B. cereus*, restent encore controversées [McIntyre et al., 2008].

Parmi les bactéries formant des spores, *Bacillus cereus* a été responsable de l'intoxication alimentaire [Granum, 1997], La cuisson ne suffit généralement pas à détruire les spores de cette bactérie, dont la germination et la croissance peuvent s'effectuer si le produit est entreposé au froid positif de façon prolongée [Bornert, 2000]

Comme dit précédemment, les spores de *B. cereus* sont capables de résister à de fortes températures et donc aux principaux traitements thermiques appliqués en industrie agroalimentaire. Il a été montré que dans le cas du lait UHT (ultra haute température), les spores présentes sont alors activées par le choc thermique. Les spores vont ainsi germer et peuvent alors produire des enzymes extracellulaires. (Chen et al., 2003).

Divers microorganismes sont présents à un nombre élevé lors de la fermentation des fèves de cacao, les opérations de post-récolte et de transformation industrielle permettent seulement la survie d'un micro -biote dominé par le genre *Bacillus* et ses proches [Barrile et al., 1971]. La capacité des membres de ce groupe à former des endospores, dans certains cas d'extrême résistance à la chaleur, implique qu'ils peuvent survivre aux processus industriels et poser des problèmes de détérioration et de sécurité [Huemer et al., 1998; Oh and Cox, 2009; Oomes et al., 2007].

La composition microbiologique générale de la poudre de cacao commerciale a été étudiée, avec *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* et *Bacillus subtilis* constituant respectivement 45, 20, 10 et 8% Des isolats [Gabis et al., 1970].

Certaines spores du genre *Bacillus* et ses proches forment des spores hautement résistantes à la chaleur qui peuvent survivre à la torréfaction [Barrile *et al.*, 1971] et, de cette façon, persistent dans les produits finis dérivés du cacao [Gabis *et al.*, 1970].

La plupart des produits alimentaires déshydraté, dont la poudre de cacao, sont réhydratés ou ajoutés à d'autres ingrédients aqueux. En conséquence, une contamination microbienne résiduelle pourrait alors évoluer ce qui va provoquer des problèmes sanitaire chez l'homme.

Par exemple, des taux de contamination élevés avec des spores ont été signalés à partir de poudres de lait, de cacao et d'extraits de gélatine [De Clerck *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2011; Rückert *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2007; Witthuhn *et al.*, 2011]. En outre, les composants déshydratés comme les herbes, les épices ou les légumes secs des produits alimentaires en conserve prêts à consommer étaient des sources importantes de contamination des éleveurs aérobies [Oomes *et al.*, 2007; Postollec *et al.*, 2012].

Après une étape de chaleur sélective, des bactéries formant des spores aérobies ont été détectées dans environ 50% de ces échantillons alimentaires et un total de 88 isolats ont été recueillis. Pour les produits intermédiaires bruts et non transformés, 85% des échantillons ont été contaminés, souvent simultanément avec plusieurs espèces différentes d'un maximum de trois genres. Un taux de contamination élevé (52%) a également été trouvé pour les ingrédients secs, comme le lait en poudre, la poudre de cacao et les épices. Pour les produits transformés, p.ex. Riz au lait, pudding, fromage ou boissons mélangées au lait, un peu plus bas. L'identification des espèces des 88 isolats a révélé 18 espèces différentes appartenant à cinq genres. De même, au groupe d'isolats associés à la détérioration, *Bacillus* était le genre prédominant dans le groupe des isolats associés à la détérioration (représentant 76% des isolats).. Tandis que *B. cereus* dominait le groupe d'isolats associés aux dégâts du produit. [Lücking, G *et al.*, 2013]

L'un des objectifs de notre étude était de déterminer la thermorésistance des spores de *Bacillus cereus*; une souche de référence (ATCC) a été sélectionnée pour le traitement thermique.

La résistance à la chaleur des spores est exprimée le plus fréquemment dans la thermobactériologie par les Concept de valeur D des spores [Stumbo, 1948]. La valeur D se

réfère au temps de réduction décimale et il est défini comme le temps nécessaire pour inactiver 90% des microorganismes (ou 1 log CFU / ml) à une température spécifiée dans un milieu spécifique. Une parcelle semi-logarithmique de valeurs D contre la température donne souvent une relation linéaire, à partir de laquelle la valeur z appelée peut être calculée. La valeur z correspond à l'augmentation de la température requise pour obtenir une réduction de dix fois de la valeur D [Stumbo, 1973].

Cependant, la thermo résistance de *Bacillus cereus* n'est pas très élevée, comparativement à celle de *Clostridium botulinum*, comme le soulignent Gaillard *et al.* et qui proposent pour cette raison une température de référence de 100° C au lieu de 121.1° C [Gaillard *et al.*, 1998]. Pour cette raison, beaucoup des valeurs D de *Bacillus cereus* sont citées à une température allant de 85 °C à 100 °C, rarement au -delà. [Dromigny, 2008].

Les espèces de *B. cereus* ont reçu une grande attention, le fait étant documenté par de nombreux auteurs [Janštová et Lukášová, 2001]

Après la panne du thermorésistomètre, nous avons décidé de procéder une souche de référence (ATCC) afin de calculer la durée de réduction décimale et la sensibilité ZT. La thermorésistance de la souche testée a été donc étudiée à différentes températures : 90°C, 100°C et 105°C.

Dans notre étude la valeur de D obtenue après un traitement à 90°C était 9.83, et une valeur de ZT 13.51°C.

Dans l'étude de Montville *et al.*, (2005), les valeurs de D des spores de trois souches de *B. cereus* à 90° C étaient de 22, 4.8 et 0.47 min, et les valeurs Z (augmentation calculée de la température nécessaire pour réduire la valeur D de 90% était de 10,5, 12 et 9.9°C, respectivement. Nous devons signaler l'écart de la valeur D_{90°C} obtenue dans notre recherche (9.83) par rapport à celle obtenue par Montville *et al.*, (2005). Cet écart a été mentionné dans l'étude de Byrne *et al.*, (2006); Fernández *et al.*, (2001), qui ont déclaré l'existence de valeurs variant entre 4 et 10 min dans l'eau et le rouleau de porc, respectivement.

Les valeurs D_{100°C} étaient de 0.28 min, 0.99 min et de 4.57 min avec un Z égale 7.6 °C environ pour les trois souches [Gonzalez *et al.*, 1995], la valeur que nous avons obtenue à D_{100°C} est de 1.69 qui sont proche que celle obtenue par l'auteurs cités. Par ailleurs, Bergère et Cerf (1992) ou Picoche *et al.* (1993) rapportent une valeur de D_{100°C} comprise entre 0,3 à 27 minutes avec

un ZT situé entre 6,7 et 13,9 °C comprise un $D_{100\text{ °C}}$ de 0,3 à 27 minutes avec un ZT situé entre 6,7 et 13,9 °C.

Janštová et Lukášová, (2001) ont mené une étude sur la résistance thermique de *Bacillus.spp* dans le lait de vache. La valeur rapportée pour la souche de *Bacillus cereus* été 0.38 min à 105 °C, celle-ci est proche de notre valeur qui est de 0.75min.

Les spores étudiées dans ce travail présentent une sensibilité (ZT) de 13.51°C.

Dans cette étude on a préféré d'effectuer le traitement thermique par un thermorésistomètre Mastia pourtant il existe plusieurs méthodes de traitement thermique ou bien des techniques de chauffage parmi lesquelles on note :

- le chauffage en tubes : En dehors des tubes à essai ordinaires, deux types de tubes sont utilisés couramment:

- les tubes de TDT (temps de destruction thermique) en verre ou en métal (cuivre ou inox) ont un diamètre intérieur de 0,5 à 1 cm, et contiennent de 1 à 2 cm" de suspension de spores. Leurs temps d'équilibrage à la température du bain sont de 1 à 2 mn. Ils sont faciles à utiliser; [Cerf,1987]

- les tubes capillaires en verre ont un diamètre intérieur de 0,5 à 1 mm, et contiennent de 10 à 100 mm" de suspension. Leur temps d'équilibrage est en général inférieur à 10 s. Ils sont moins faciles à utiliser que les tubes de TDT, mais présentent l'avantage de pouvoir être employés à des températures plus élevées (grâce à leur équilibrage rapide, on peut les utiliser à des températures où l'inactivation des spores est, elle aussi, rapide). [Burton *et al.*, 1977]

- *Appareils UHT* : Le chauffage dans un appareil UHT est la technique qui semble la plus réaliste. [Cerf,1987]

Il importe de préciser que les valeurs ZT obtenues par un thermorésistomètre et la technique du tube capillaire ne sont pas significativement différentes. [Van Zuijlen *et al.*, 2010]

La technique capillaire standard ne peut cependant être utilisée à des températures supérieures à 125 ° C en raison du temps de démarrage associé à ce système de chauffage indirect et des temps d'exposition courts requis à des températures élevées. Par contre le thermorésistomètre permet d'effectuer des études jusqu'à 125 ° C (ou même plus) et prend moins de temps et d'efforts [Condón, López, Oria et Sala, 1989].

Lors du traitement par thermorésistomètre Mastia disponible dans le laboratoire de recherche, nous avons rencontré un certains nombre de difficultés :

- Ne possède pas un système de refroidissement automatique. Chose que nous avons faite manuellement.
- Le nombre élevé des dilutions qui doivent être faites manuellement avec le thermorésistomètre ont pris beaucoup de notre temps lors de cette recherche et de surcroit plusieurs boites de pétri.
- Nous avons mis beaucoup de temps et fourni beaucoup d'efforts afin de dénombrer les spores.

Conclusion générale

L'objectif principal de ce travail a été l'identification et la caractérisation de la thermorésistance des spores *Bacillus cereus* isolées de la poudre de cacao. Pour cela, nous avons recherché et identifié la flore aérobie sporulée mésophile dans cinq échantillons de poudre de cacao d'origines différentes.

Des colonies à différents aspects macroscopiques et microscopiques sont apparues. Après une étape de purification, 33 souches ont été isolées et identifiées. L'identification phénotypique a montré que la majorité des isolats étaient des bacilles à Gram positif aérobie, capables de former des spores.

L'étude biochimique des souches a été basée sur les tests de la catalase de l'utilisation du mannitol et de la lécithinase. Les résultats obtenus montrent que 100% des isolats étaient catalase positive. Elles sont donc aérobies ou anaérobies facultatives. Près de 83% de ces isolats sont capables d'hydrolyser la lécithine et sont mannitol négatif. Ces résultats (de la caractérisation biochimique) obtenus sur le milieu Mossel nous ont permis de supposer que nos souches appartiennent aux *Bacillus cereus*.

Les résultats de la plaque API 20 E ont conforté cette appartenance. En effet, nous avons pu identifier 25 isolats. Une confirmation de l'identité d'espèce est effectuée grâce à une galerie API 20E à partir des colonies typiques. Les isolats identifiés appartiennent à des espèces différentes dont, (8%) *Bacillus anthracis*, (4%) *Geobacillus thermoglucosidiasus*, (8%) *Bacillus lentus*, (16%) *Brevibacillus choshinensis* / *Centrosporus / brevis*, (32%) *Bacillus cereus 1*, (4%) *Aneurinbacillus aneurinilyticus*, (4%) *Bacillus amylolique faciens*, (8%) *Bacillus cereus 2*, (4%) *Brevibacillus agri*, (12%) *Bacillus sphaericus / fusiformis/ badius*.

La thermorésistance des spores de la souche de référence *Bacillus cereus* (ATCC) a été étudiée à différentes températures : à 90, 100 et 105°C à l'aide d'un thermorésistomètre Mastia. Les valeurs de D_{90} , D_{100} et D_{105} (temps de réduction décimale à la température T) ont été obtenues. Elles étaient respectivement 9.83, 1.69 et 0.75 min. Ces valeurs de D de *Bacillus cereus* obtenues dans notre étude sont d'ailleurs proches de celles rapportées par plusieurs travaux. La souche de référence (ATCC) présente une valeur Z_T (Elévation de la température qui permet de diviser la valeur de D par 10) de 13.51 °C.

Conclusion générale

Pour que ce travail soit accompli, il aurait été préférable que d'autres tests biochimiques soient réalisés, qu'il soit poursuivi par une étude physiologique complète et qu'une identification des souches par les techniques de biologie moléculaires soit effectuée. On aurait aimé également que l'étude de la thermorésistance des spores *Bacillus cereus* soit réalisée sur des spores isolées de la poudre de cacao. Ces limites de la présente étude constituent nos perspectives dans nos futures recherches.

Bibliographie

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, pp.12-29.

Adabe K. E., Ngo-Sammick E. L. 2014. Production et transformation du cacao.

Anses (agence nationale de sécurité sanitaire, alimentation, environnement, travail).2011 .Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments / *Bacillus cereus*.

Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail).2012.Évaluation des risques sanitaires liés à la présence de *Bacillus spp* dans l'eau destinée à la consommation humaine délivrée par l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys (Nord- Pas-de-Calais) . Rapport d'expertise collective, Avis de l'Anses. Saisine N°2011-SA-0147.

Asiedu J. J. 1991. La transformation des produits agricoles en zone tropicale: approche technologique. Editions Karthala, pp. 39-58.

Bankoffi L., Ouattara G. H., Karou T. G., Guehi S. T., Nemlin, J. G., & Diopoh J. K . 2013. Impacts de la fermentation du cacao sur la croissance de la flore microbienne et la qualité des fèves marchandes. *Agronomie Africaine*, 25(2), 159-170.

Barel M. 2013. Qualité du cacao: l'impact du traitement post-récolte. Editions Quae, pp. 22-54

Barrile J.C., Ostovar K., Keeney P.G. 1971. Microflora of cocoa beans before and after roasting at 150 C. *J. Milk Food Technol.* 34, 369,371.

Beaudeau J. L. 2008. *Bacillus cereus*. In *Annales de Biologie Clinique* Vol. 66, No. 6, pp. 726-727.

Bigelow W.D.1921. The logarithmic nature of thermal death time curves. *J. Infect.Diseases* 29, 528-536.

Bornert, G. 2000. Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Revue Méd. Vét*, 151(11).1003-1010

Bibliographie

Couvert O. 2002. Prise en compte de l'influence du pH dans l'optimisation des traitements thermiques .Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université de Bretagne Occidentale, pp10.12.20

Daelman J., Sharma A., Vermeulen A., Uyttendaele M., Devlieghere F., JM.Membre . 2013. Development of a time-to-detect growth for heat-treated *Bacillus cereus* spores, Int J Food Microbiol, 2013, 165: 231-40.

Diomande G. G. D. 2014. Contribution des méthodes spectroscopiques et isotopiques à la caractérisation géographique et phénotypique du cacao. Thèse de Doctorat en Chimie. Université de Nantes, pp19.27.

Dorin B. 2003. De la fève ivoirienne de cacao à la plaquette française de chocolat noir: transmission des prix, partage de la valeur et politique de concurrence Nord/Sud. Rapport final.CIRAD.

Dromigny E .2008. *Bacillus cereus* . Edition Lavoisier, pp.1-233.

Dromigny E .2009. *Bacillus anthracis*. Edition Lavoisier, pp. 11-21, 67-82

Durand L. 2014. Ecologie et diversité des bactéries thermophiles formant des spores dans les conserves alimentaires.Thèse de Doctorat .Université Montpellier II, pp.14.17.20

Gabis D.A., Langlois B.E., Rudnick A.W. 1970. Microbiological examination of cocoa powder. Appl. Microbiol. 20, 644e645.

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 en Microbiologie. Université de Bretagne Occidentale, pp. 8.12.15.

Gaillard S., Leguérinel I., Mafart P.1998a. Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. Journal of Food Science 63 (5), 887_889.

Geeraerd A., Herremans C., Van Impe J. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. International Journal of Food Microbiology 59, 185_209.

Bibliographie

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.

Guiraud J.P. 2012. Microbiologie alimentaires, collection Industries agroalimentaires Edition Dunod, Paris. 136, 301, 305, 397.

Hamdouche Y. 2015. Discrimination des procédés de transformation post-récolte du Cacao et du Café par analyse globale de l'écologie microbienne. Thèse de Doctorat en Bactériologie, Microbiologie, Centre International d'études supérieures Agronomiques. Montpellier.

Hütz-Adams F., Feldt H., Mürlebach M. 2016. Study on the establishment of a cocoa sustainability fund.

Hütz-Adams F., Huber C., Knoke I., Morazán P., & Mürlebach M. 2016 Renforcer la compétitivité de la production de cacao et augmenter le revenu des producteurs de cacao en Afrique de l'Ouest et en Afrique centrale.

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

Kouadio A. K. A., Aw S., Assidjo N. E. & Kouamé L. P. 2015. Etude de la qualité physico-chimique et mycologique du cacao (*Theobroma cacao*) produit dans les zones de Yamoussoukro et Soubré (Côte d'Ivoire). *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 13(1), 330-340.

Leuschner R., Lillford P. 2001. Investigation of bacterial spore structure by high resolution solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy and transmission electron microscopy. *International Journal of Food Microbiology* 63, 35_50.

Levy C. 2010. Principaux facteurs influençant l'efficacité de la lumière pulsée pour la décontamination des microorganismes pathogènes et d'altération des denrées alimentaires. Thèse de Doctorat en Bactériologie, Microbiologie. Université d'Avignon. pp 3.

Lima L. J. R. 2012. Microbial ecology of the cocoa chain: quality aspects and insight into heat-resistant bacterial spores.

Bibliographie

- Lima L. J., Kamphuis H. J. , Nout M. R. & Zwietering M. H. 2011.** Microbiota of cocoa powder with particular reference to aerobic thermoresistant spore-formers. *Food microbiology*, 28(3), 573-582
- Mahler H., Pasi A., Kramer J.M., Schulte P., Scoging A.C., Bar W. and Krahenbuhl S.1997.** Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *N. Engl. J. Med.* 336, 1142-1148.
- Merzougui S., Lkhider M. & Cohen N.2013** .*Bacillus cereus*, un réel problème pour l'industrie agro alimentaire?. ScienceLib Editions Mersenne : volume 5, N°130915
- Mossel D.A.A., Meursing E.H., Slot H. 1974.** Aninvestigation on the numbers and types of aerobic spores in cocoa powder and whole milk. *Neth. Milk Dairy J.* 28,149e154.
- Oro Z. F. 2011.** Analyse des dynamiques spatiales et épidémiologie moléculaire de de la maladie du swollen shoot du cacaoyer au Togo: étude de diffusion à partir des systèmes d'information géographiques. Thèse de Doctorat en Sciences Université Montpellier. pp23.24.25
- Ouattara H. G., Koffi B. L., Karou G. T., Sangaré A., Niamke S. L. & Diopoh J. K. 2008.** Implication of *Bacillus sp.* In the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1753-1760.
- Sadoux F. L. 1961.** Etude de la fermentation et du séchage du cacao au Cameroun. *Café, Cacao, Thé*, 5(4), 252-262.
- Six S. C., De Buyser M. L., Vignaud M. L., Dao T. T., Messio S., Pairaud S., ... & Brisabois A. 2012.** Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus*: bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation/Spécial Risques alimentaires microbiologiques*, 50, 57-61.
- Slepecky R. A., Hemphill H. E. 2006.** The genus *Bacillus*—nonmedical. In *The prokaryotes* (pp. 530-562). Springer US.
- Tafari A., Ferracane R., Ritieni A .2004** Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. *Food Chem.* 88:487 – 494.
- Teyssou R., Hance P., Nicand E., Nizou J. Y., & Buisson Y. 1998.** Les infections à *Bacillus Cereus*: bactériologie, clinique et traitement. *Lett Infect*, 99-104.

Bibliographie

Yusuf I.Z., Umoh V.J. and Ahmad A.A. 1992. Occurrence and survival of enterotoxigenic *Bacillus cereus* in some Nigerian flour-based foods. *Food Control*. 3, 149-152.

Sitographie

End M.J., Dand R.2015.CAOBISCO/ECA/FCC Fèves de cacao: Exigences de qualité de l'industrie du chocolat et du cacao. Traduit par Paul Edson et Araceli Montero .Disponible surhttp://www.cocoaquality.eu/data/Feves%20de%20cacao%20Exigences%20de%20qualite%20de%20l%20industrie%20Apr%202016_Fr.pdf: consulté le 04/04/2017

Cacao : Guide des pratiques commerciales. CCI, Genève, 2001.disponible sur : <http://www.intracen.org/uploadedFiles/intracenorg/Content/Publications/Cocoa%20-%20A%20Guide%20to%20Trade%20Practices%20French.pdf>: consulté le 05/03/2017

Commission du Codex Alimentarius.2012. Document de discussion sur l'Ochratoxine A dans le cacao, disponible sur : ftp://193.43.36.92/codex/Meetings/CCCF/cccf6/cf06_15f.pdf: consulté le 22/05/2017.

Ait Boulahsen .2012 .Microbiologie du chocolat disponible sur : <https://fr.scribd.com/doc/79971070/Microbiologie-du-Chocolat>: consulté le 09/03/2017

Public Health England – UK standards for microbiology investigations .Identification of *Bacillus* species. Standards Unit, Microbiology Services, PHE Bacteriology – Identification | Disponible sur: <https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england>, consulté le 19/04/2017.

Le point sur : *Bacillus cereus*. 2016. disponible sur : http://www.biomerieux.fr/sites/subsidiary_fr/files/point_sur_bacillus_cereus_fevrier2016.pdf: consulté le 25/04/2017

➤ **Milieux de culture liquides**

Bouillon nutritif

Peptone.....	5.0 g
Extrait de levure.....	2.5 g
Extrait de viande	1.0g
Na Cl.....	5.0g
Eau distillé	1000 ml

pH = 7,2

➤ **Milieux de culture solides**

Gélose nutritive

Peptone	5.0g
Extrait de levure.....	2.5g
Extrait de viande.....	1.0g
Na cl.....	50g
Agar	15g
Eau distillé.....	1000ml

pH =6,8-7,4

La gélose PCA (Plate Count Agar)

Tryptone	5.0g
Extrait de levure.....	2.5g
Glucose.....	1.0g
Agar	12g
Eau distillé.....	1000 ml

Milieu Mossel pour la recherche de la lécithinase

Tryptone.....	10.0g
Extrait de viande	1.0g
D-mannitol.....	10g
Chlorure de sodium.....	10g
Rouge de phénol	25.0g
Emulsion stérile de jaune d'œuf.....	100.0ml
Polymyxine B.....	1x10 ⁵ UI
Agar bactériologique.....	13,5 g

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

Préparation de l'émulsion de jaune d'œuf Après avoir flamber la coquille avec de l'alcool pendant 30 secondes, récupérer le jaune d'œuf et additionner 4 fois le volume en eau distillée stérile,mélanger rigoureusement puis mettre le mélange à l'étuve pendant 2 heures à 30°C et ensuite au réfrigérateur pendant 24 heures

N. B. Au moment de l'utilisation, mettre la gélose en surfusion (45°C) et ajouter l'émulsion de jaune d'œuf, après séchage le milieu est ensemencé.

➤ **Solutions**

Eau physiologique

Peptone bactérien	0.25 g
NaCl	2.25 g
Eau distillé	250 ml

Résumé

Bacillus cereus est connu pour être à l'origine de problèmes dans les industries alimentaires parce qu'il affecte la qualité et la sécurité des aliments. Les spores de *Bacillus cereus* peuvent résister à certains traitements thermiques utilisés dans les processus industriels et donc peuvent persister dans les produits finis. Le contrôle de ces spores reste en effet une opération très difficile. Il faut la maîtriser en ayant connaissance sur leurs origines, leurs caractéristiques et leur thermorésistance.

Les produits alimentaires déshydratés dont la poudre de cacao peuvent contenir des spores bactériennes. La poudre de cacao est soit réhydratée, soit ajoutée à d'autres ingrédients aqueux. Par conséquent, une contamination microbienne résiduelle pourrait évoluer et provoquer des problèmes sanitaires chez l'homme.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons dans un premier lieu isolé, identifié et caractérisé les spores de *Bacillus cereus* à partir de cinq échantillons de poudre de cacao importés et commercialisés en Algérie. 33 isolats ont été obtenus parmi lesquels, 25 se sont révélés appartenant au groupe *Bacillus cereus* dont 32% appartiennent à l'espèce *Bacillus cereus* 1, 16% à *Brevibacillus choshinensis/Centrosporus/brevis*, 12% à *Bacillus sphaericus/fusiformis/badius* 8% à *Bacillus cereus* 2, 8% à *Bacillus anthracis*, 8% à *Bacillus lentus*, 4% à *Geobacillus thermoglucosidiasus*, 4% à *Aneurinbacillus aneurinilyticus*, 4% à *Bacillus amylolique faciens*, et 4% à *Brevibacillus agri*.

Dans un deuxième lieu, Le thermoésistomètre Mastia a été utilisé pour une étude de la thermorésistance des spores d'une souche de référence de *Bacillus cereus* (ATCC). La suspension de spores a été injectée dans le thermorésistomètre et chauffée dans du BHIB pH7 à trois températures différentes (90, 100, 105°C), des courbes de survie des spores *Bacillus cereus* (ATCC) ont été établies. La spore ATCC 4243 est caractérisée par la valeur D_{90} , D_{100} , et D_{105} de 9.83, 1.69, 0.75 min respectivement et une valeur de Z_T de 13.51 °C.

Mots clés : *B.Cereus*, poudre de cacao, thermorésistance, Thermoésistomètre Mastia, Valeur D, Valeur Z.