

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun -Tiaret-

Institut des Sciences Vétérinaires.

Département de la santé animale.



## MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTER

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Option : Hygiène et qualité des aliments d'origine animale

Présenté et soutenu publiquement par :

**ABID Amar**

# Évaluation de la capacité antimicrobienne du microbiote lactique de la viande salée et séchée (*Khliaa*)

### Devant le jury composé de :

Président :	Mr. AGGAD Hebib	Professeur, Université Ibn Khaldoun-Tiaret
Examineurs :	Mr. ABDELHADI Si Aneur	Professeur, Université Ibn Khaldoun-Tiaret
	Mme. GHAZI Kheira	Professeur, Université Ibn Khaldoun-Tiaret
Encadreur :	Mr.KHALED Meghit Boumediene	Professeur, Université Djilali Liabes Sidi-Bel-Abbès
Membre invité d'honneur :	Mr.NAIMI Mostefa	Maitre-assistant A, Centre universitaire NOUR Bachir -El Bayadh

**Année Universitaire : 2018/2019**

# Évaluation de la capacité antimicrobienne du microbiote lactique de la viande salée et séchée (Khliiaa)

ل قوم لايات الكذ في إن منه ه يغلار ض في وللسماواتا في ما ل كم سخر و  
ي ت فكرون

(13) الجاثية

Traduction du sens :

« Et Il vous a assujetti tout ce qui est dans les cieux et sur la terre, le tout venant de Lui. Il y a là des signes pour les gens qui réfléchissent » \*  
(Saint coran., sourate "Aljathya"=L'agenouillée., verset:13).

\* : Il est du devoir du croyant de méditer sur les données de la nature afin d'en tirer profit.

<b>Table des matières</b>	<b>page</b>
Remerciements	I
Résumé	III
Abstract	IV
<b>ملخص</b>	V
Liste des tableaux	VI
Liste des figures	XII
Liste des abréviations et acronymes	
Introduction générale	01

## **Partie 1. Revue de la littérature**

### **Chapitre 1 : Généralités sur la Viande**

1.1	Définition de la viande	03
1.2	Du muscle à la viande, évolution, composition et caractéristiques	03
1.2.1	Évolution	04
1.2.2	Composition biochimique	04
1.2.2.1	Les protéines	05
1.2.2.2	Les lipides	05
1.2.2.3	Les glucides	05
1.2.2.4	Les vitamines	06
1.2.3	Caractéristiques physico-chimiques	06
1.2.3.1	Teneur en eau	06
1.2.3.2	Minéraux	06
1.3	Viande et qualités	06
1.3.1	Qualités organoleptiques	07
1.3.1.1	Couleur	07
1.3.1.2	Flaveur	07
1.3.1.3	Tendreté	08
1.3.1.4	Jutosité	08
1.3.2	Qualités nutritionnelles	08
1.3.3	Qualités technologiques	09

1.3.4	Qualités hygiéniques	09
1.4	Microbiologie de la viande	09
1.4.1	Ecosystème microbien de la viande	09
1.4.2	Réduction de la charge microbienne de la viande	10
1.4.3	Evolution de la microflore et dégradation de la viande	11
1.5	Transformations traditionnelles de la viande	12
1.5.1	Biltong	14
1.5.2	Kilishi	14
1.5.3	Guadid (Khliia)	14

## **Chapitre 2 : Bactéries lactiques**

2.1	Introduction	16
2.2	Généralités	16
2.3	Historique et taxonomie	17
2.4	Culture des bactéries lactiques	20
2.5	Identifications des bactéries lactiques	21
2.6	Utilité des bactéries lactiques	23
2.6.1	Dans le secteur alimentaire	23
2.6.1.1	Pouvoir acidifiant	23
2.6.1.2	Pouvoir texturant	24
2.6.1.3	Pouvoir aromatisant	24
2.6.1.4	Pouvoir protéolytique	24
2.6.2	Intérêts à la bioconservation	25
2.6.2.1	Métabolites à effet antimicrobien	26
a	Peroxyde d'hydrogène	26
b	Le diacétyl	26
c	Le dioxyde de carbone	26
d	Les bactériocines	26
2.7	Bactériocines	27
2.7.1	Définition des bactériocines	27
2.7.2	Mécanisme d'inhibition de la flore indésirable	29
2.8	Probiotiques	30
2.8.1	Définition et bienfaits	30
2.8.2	Une alternative prometteuse	32
2.8.3	Critères de sélection	33

2.8.3.1	Critères sécuritaires	34
a	L'identification	34
b	L'origine	34
c	L'absence d'effets négatifs	34
2.8.3.2	Critères fonctionnels	35
a	Résistance à l'acidité gastrique et la bile	35
b	Adhésion aux cellules épithéliales	35
c	Critères technologiques	35

## **Partie 2. Etude expérimentale**

### **Chapitre 3: Matériel et méthodes**

3.1	Objectifs	35
3.2	Lieu de réalisation de l'étude	36
3.3	Isolement et identification présomptive de bactéries lactiques	36
3.3.1	Matériel, milieux et réactifs	36
3.3.2	Collecte des échantillons	39
3.3.3	Isolements des bactéries lactiques	39
3.3.4	Conservation des isolats	40
3.3.4.1	Conservation à court terme	40
3.3.4.2	Conservation à long terme	40
3.3.5	Identification préliminaire des bactéries lactiques	40
3.3.5.1	Examen macroscopique	41
3.3.5.2	Tests d'orientation	41
a	Test catalase	41
b	Examen microscopique après fixation (coloration de <i>Gram</i> )	41
c	Test de sporulation	41
3.4	Test d'antagonisme et sélection des bactéries lactiques à potentiel inhibiteur élevé	42
3.4.1	Matériel, milieux et réactifs	42
3.4.2	Souches bactériennes	44
3.4.3	Evaluation de l'activité antibactérienne	44

3.4.3.1	Spot agar test (détection directe)	45
3.4.3.2	Exclusion de l'inhibition par l'abaissement du pH	46
3.4.3.3	Diffusion en puits sur gélose (détection indirecte)	46
3.4.4	Identification phénotypique et biochimique des isolats à potentiel inhibiteur élevé	47
3.4.4.1	Production de CO <sub>2</sub> à partir du glucose	47
3.4.4.2	Croissance à différentes températures	47
3.4.4.2	Test de tolérance à NaCl	48
3.4.4.4	Croissance à différents pH	48
3.4.4.5	Tests biochimiques divers	48
a	Recherche de l'Arginine Di Hydrolase (ADH)	48
b	Uréase	48
3.4.4.6	Profil de fermentation des sucres	49
3.5	Etude de quelques propriétés technologiques et critères probiotiques	49
3.5.1	Propriétés technologiques	49
3.5.1.1	Pouvoir protéolytique	50
3.5.1.2	3.5.1.2 Pouvoir lipolytique	50
3.5.1.3	Production des exopolysaccharides (EPS)	50
3.5.1.4	Production d'acétoïne	50
3.5.2	Critères probiotiques	51
3.5.2.1	Résistance aux conditions gastriques simulées	51
3.5.2.2	Résistance aux sels biliaires	51

## Chapitre 4 : Résultats

3.1	Résultats de l'isolement des bactéries lactiques sur milieu MRS	52
3.1.1	Collecte des échantillons et isolement	52
3.1.2	Résultats de l'identification présomptive des bactéries lactiques.	52
3.1.2.1	Examen macroscopique	52
3.1.2.2	Tests d'orientation	54
a	Catalase	54
b	Examen microscopique après fixation	54
c	Test de sporulation	55

3.2	Résultats de l'évaluation de l'activité antagoniste et la sélection des bactéries à potentiel inhibiteur élevé	58
3.2.1	Spot agar test (méthode directe)	58
3.2.1	Exclusion de l'inhibition par l'abaissement du pH	61
3.2.2	Diffusion en puits sur gélose (méthode indirecte)	64
3.3	Résultats de l'identification phénotypique et biochimique au niveau du genre des isolats à potentiel inhibiteur élevé	64
3.3.1	Production de CO <sub>2</sub> à partir du glucose	64
3.3.2	Croissance à différentes températures	64
3.3.3	Test de tolérance à NaCl	66
3.3.4	Croissance à différentes valeurs de pH	66
3.3.5	Résultats de la recherche de l'ADH	66
3.3.6	Résultats de la recherche de l'uréase	66
3.3.7	Profil fermentaire des sucres	66
3.4	Résultats de l'étude des propriétés technologiques	69
3.4.1	Pouvoir protéolytique	69
3.4.2	Pouvoir lipolytique	69
3.4.3	Production des exopolysaccharides (EPS)	69
3.4.4	Production d'acétoïne	69
3.5	Résultats de l'étude des critères probiotiques	72
3.5.1	Résistance aux conditions gastriques simulées	72
3.5.2	Résistance aux sels biliaires	72

## **Chapitre 5. Discussion**

Discussion générale	73
Conclusion	87
Références bibliographiques	88
Annexes	109

---

## *Remerciements*

Je tiens d'emblée à remercier *ALLAH* de m'avoir guidé les pas pour mener à terme ce modeste travail et je l'invoque par la même occasion de me donner encore du courage et de la force pour en aller plus efficacement et loin dans ce sentier. Amen

En deuxième lieu, je remercie infiniment mes chers parents pour le soutien inconditionnel qu'ils ne cessent de m'assurer, et qu'ALLAH les protège et les accorde le bonheur dans la vie d'ici-bas et dans celle de l'au-delà. Amen

Un grand merci et une grande reconnaissance à mon encadreur le professeur KHALED Méghit Boumediene et mon co-encadreur Mr. NAIMI Mostefa qui m'ont été prodigues de leurs précieux conseils et accompagnement sur tous les points de ce périple ; je vous voue un grand respect pour votre véracité, bon sens, et votre esprit réformateur. Permettez-moi de saluer vos qualités humaines qui en font de vous tout simplement un exemple à suivre. Djazakomo ALLAHO Khairan.

Un remerciement spécial à Mr MAIMI Mostefa pour son hospitalité et sa fraternité. C'est grâce à vous (après ALLAH) et à votre résolution que beaucoup d'obstacles se sont fondus. Qu'ALLAH vous protège le petit mignon Mohamed.

Merci aux rouages administratifs du centre universitaire NOUR Bachir. El-Bayadhqui m'ont permis l'accès au laboratoire, allant du directeur de l'institut des sciences au chef de département SNV et le responsable du laboratoire, sans oublier, bien sûr, mes frères et sœurs les personnels du laboratoire, à leur tête Mr MAHI Nadir et Mr GUETTAF Khaled, ainsi à BELBACHIR Fatiha et ACHRATI Leila. Merci de m'avoir supporté et pour votre coopération.

Une grande reconnaissance à tous et toutes mes enseignants et enseignantes dès ma première année primaire jusqu'à ce jour.

A mes vénérables enseignants et enseignantes de l'institut des sciences vétérinaires, je vous dois un grand respect et les expressions de mes reconnaissances les plus parfaites. Je suis votre étudiant ; j'ai sincèrement l'honneur de l'être.

Je tiens à saluer et remercier monsieur le professeur AGGAD Habib, d'avoir accepté de présider ce jury et pour tous ses efforts, orientations et conseils au cours de l'année théorique de cette initiation à la recherche scientifique. Je considère aujourd'hui votre évaluation et recommandations.

Merci infiniment au professeur ABDELHADI Si-Ameur de faire part de ce jury. J'en salue votre gentillesse et modestie. J'estime que c'est une opportunité pour moi d'entendre vos conseils, remarques et critiques à l'égard de cette expérience et pour les rendez-vous à venir.

Grande salutation à madame professeur GHAZI Kheira et merci pour son acceptation d'évaluer cette épreuve. Je compte me servir de vos points de vue et ils auront leur juste place vos conseils.

Merci, à l'anonymat, à toute personne m'ayant été venue en aide de loin ou de près.

*ABID Amar*

## Résumé

**Introduction et objectifs:** La lutte contre les microorganismes pathogènes et/ou altérants connaît, de nos jours, un recours aux moyens alternatifs et de caractère bio à l'image des bactéries lactiques qui s'avèrent être un outil prometteur pour la qualité des aliments. Cette étude s'intéresse à l'isolement des LAB à partir de la viande salée et séchée (*Khliia*) pour une utilisation à la bioconservation et comme probiotiques. **Méthodes:** Pour s'en faire, l'isolement a été réalisé sur deux géloses (MRS-A et MRS-VA-VBC) avec incubation à 30 °C en anaérobiose. L'identification des isolats lactiques a été basée sur des tests morphologiques, biochimiques et physiologiques afin de les différencier au taxin genre et espèce. **Résultats :** L'activité antagoniste à l'encontre de six (06) bactéries pathogènes et/ou d'altération : *B. cereus* ATCC 11778, *E. fecalis* ATCC 29212, *L. ivanovii* ATCC 19119, *St. aureus* ATCC 25923, *St. aureus* ATCC 43300 et *St. aureus* sp., ainsi que l'étude de quelques propriétés technologiques (pouvoir protéolytique, lipolytique, épaississant et aromatisant) et de la potentialité probiotique (résistance aux conditions gastriques simulées et à la bile) ont fait ressortir que 3 isolats *Lactobacillus* spp., 1 isolat *Pediococcus acidilactici* et 2 isolats *Tetragenococcus* spp. ont prouvé un grand potentiel antibactérien notamment contre *St. aureus* ATCC 25923, *E. fecalis* ATCC 29212, *B. cereus* ATCC 11778 et *L. ivanovii* ATCC 19119 ; avec des zones d'inhibition importantes (jusqu'à 12 mm) qui diffèrent d'un isolat à un autre et qu'ils jouissent, en plus, des qualités technologiques et probiotiques. Ces isolats sont conservés pour une éventuelle exploitation dans des futures recherches. **Conclusion :** les LAB sont des principaux acteurs de la bioconservation, et prochainement, leurs métabolites des possibles alternatifs aux antibiotiques et conservateurs chimiques.

**Mots clé :** bactéries lactiques, *Khliia*, effet antimicrobien, probiotique, technologie.

## Abstract

**Introduction and aims:** Among the various methods to fight foodborne pathogenic and/or food spoilage microorganisms, the lactic acid bacteria (LAB) appear to be promising tools for the quality and the biopreservation. This experimentation interested to the isolation of LAB from salted and dried meat (*Khliaa*) in the aim to use them as biopreservative agents and as probiotics. **Methods:** Thus, isolation was realized using MRS agar (MRS-A and MRS-VA-VBC) anaerobically. Identification of isolates used morphological aspects, physiological and biochemical tests in order to classify LAB isolates in the range of genera and/or species. **Results:** The antagonistic activity has been evaluated against six (06) pathogens and/or food spoilage bacteria, namely: *B. cereus* ATCC 11778, *E. fecalis* ATCC 29212, *L. ivanovii* ATCC 19119, *St. aureus* ATCC 25923, *St. aureus* ATCC 43300 and *St. aureus* sp. and, complemented by studying some technological properties (proteolytic and lipolytic abilities, EPS and aroma production) and probiotic potentiality (resistance at simulated gastric conditions and bile salts). Results highlighted 3 isolates *Lactobacillus* spp., 1 isolate *Pediococcus acidilactici* and 2 isolates *Tetragenococcus* spp. as being the most important by their antimicrobial activity shown by different inhibition zones going from an isolate to another (10 mm or better), and having the most important technological properties and potentiality to be qualified as probiotics. **Conclusion:** LAB are main actors in bioconservation and the use of their metabolites will substitute antibiotics and chemical agents.

**Key words:** Lactic acid bacteria, *Khliaa*, antimicrobial effect, Probiotic, technological

## ملخص

مقاومة الكائنات المجهرية الممرضة و/او المسببة للتلف تعرف في أيامنا هذه اللجوء إلى وسائط بديلة وطبيعية كاستعمال البكتيريا اللبنية الذي يبدو وسيلة واعدة لحفظ و لنوعية الأغذية. هذه التجربة تهتم بعزل البكتيريا اللبنية من اللحم المملح المجفف (خليع) وتعريف هذه العزلات عن طريق اختبارات مورفولوجية و بيوكيميائية و فيزيولوجية لتميز هذه العزلات على مستوى النوع و الفصيلة وكذا تقييم نشاطهم المضاد تجاه ستة (06) ميكروبات ممرضة و/او مسببة للتلف

*B. cereus* ATCC 11778 , *E. fecalis* ATCC 29212, *L. ivanovii* ATCC 19119,

*St. aureus* ATCC 25923, *St. aureus* ATCC 43300 و *Staphylococcus aureus* sp.

و كذا دراسة بعض الخصائص التكنولوجية والتهيو البروبيوتيكى (كمساعدة على الهضم) العزل تم باستعمال وسطي زرع صليبين (MRS-A MRS-VA-VBC).

تعريف المستخلصات اللبنية ومختلف الاختبارات خلصت الى عرض العزلات الاتية على اساس التعريف

1 *Pediococcus acidilactici*, 3 *Lactobacillus spp.*, و 2 *Tetragenococcus spp.*

على أنها الأفضل من حيث النشاط المضاد للبكتيريا و من حيث بعض الخصائص التكنولوجية والتهيو البروبيوتيكى.

الكلمات المفتاحية البكتيريا اللبنية. الخليع. النشاط المضاد للمكروب. البروبيوتيك. التكنولوجي.

---

<b>Liste des tableaux</b>		<b>Page</b>
<b>Tableau 1.1</b>	Composition biochimique moyenne de la viande rouge	05
<b>Tableau 2.1</b>	Familles et principaux genres des bactéries lactiques	19
<b>Tableau 3.1</b>	Codification, origines et âge des échantillons de Khliaa	39
<b>Tableau 3.2</b>	Bactéries indicatrices candidates à l'épreuve d'antagonisme	44
<b>Tableau 4.1</b>	Dénombrement des bactéries lactiques	52
<b>Tableau 4.2</b>	Caractéristiques macroscopiques des isolats.	53
<b>Tableau 4.3</b>	Représentation récapitulative des résultats des tests d'orientation	57
<b>Tableau 4.4</b>	Résultats du test d'antagonisme <i>spot agar test</i> sur le milieu MRS	61
<b>Tableau 4.5</b>	Résultats du test d'antagonisme <i>spot agar test</i> sur le milieu MRS tamponné	62
<b>Tableau 4.6</b>	Résultats de croissance à différentes conditions d'incubation	65
<b>Tableau 4.7</b>	Résultats du profil fermentaire des sucres	68
<b>Tableau 4.8</b>	Résultats de survie dans le suc gastrique artificiel et de résistance aux sels biliaires	72

<b>Liste des figures</b>		<b>Page</b>
<b>Figure 2.1</b>	Formes bâtonnet (bacille) (a) et sphérique (cocci) (b, c) des bactéries lactiques. Observations au microscope électronique à transmission 10000X	17
<b>Figure 2.2</b>	Arbre phylogénique des bactéries lactiques avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Staphylococcus</i>	19
<b>Figure 2.3</b>	Arbre phylogénétique des bactéries Gram positives basé sur la comparaison des séquences de l'ARNr 16 S. La barre indique une divergence de séquence à 10 %	20
<b>Figure 2.4</b>	Technologie des barrières pour la préservation des aliments	27
<b>Figure 2.5</b>	Contribution des articles publiés (%) concernant les différentes applications des bactériocines de 2004 à 2015	29
<b>Figure 2.6</b>	Bienfaits sanitaires des probiotiques	32
<b>Figure 2.7</b>	Caractéristiques des souches probiotiques	33
<b>Figure 3.1</b>	Diagramme des étapes arpentées de l'isolement au test de l'activité Antagoniste	35
<b>Figure 4.1</b>	Macroscopie des isolats des bactéries lactiques sur le milieu d'isolement et le milieu de purification	53
<b>Figure 4.2</b>	Résultats négatifs du test de sporulation ; (A) les isolats LK 31, 35, 06 et 47. (B) les isolats LK 23, 32, 30 et 37 sur l'MRS	55
<b>Figure 4.3</b>	Observation microscopique par la technique de Gram, grossissement x100 (objectif à immersion) ;	55
<b>Figure 4.4</b>	Observation microscopique par la technique de Gram, grossissement x100 (objectif à immersion) ;	56
<b>Figure 4.5</b>	Résultat du <i>spot agar test</i> des isolats LK(06, 20, 11, 19, 08, 16, 03, 43, 49, 12, 42 et 36), LK(25, 45, 29, 24, 26, 27 et 46), LK(16, 06, 20, 11, 19, 08, 16, 03), LK(41, 33, 28, 30, 37, 44, 46) à l'encontre du C2, C3, C1 et C4 respectivement sur le milieu MRS	59
<b>Figure 4.6</b>	Taux global de l'effet inhibiteur des 41 isolats lactiques sur les 6 germes indicateurs	60
<b>Figure 4.7</b>	Importance de l'action inhibitrice du microbiote lactique contre les 6 germes indicateurs exprimée en diamètre de la zone d'inhibition	60
<b>Figure 4.8</b>	Evaluation de la sensibilité et la résistance des bactéries indicatrices à l'action inhibitrice du microbiote lactique	60

<b>Figure 4.9</b>	Résultat du <i>spot agar test</i> des isolats LK (17, 02, 22, 15, 10 et 05) et LK(18, 43, 49, 36, 12 et 42) respectivement contre C4 et C2 sur le milieu MRS tamponné	62
<b>Figure 4.10</b>	Résultat du <i>spot agar test</i> des isolats LK(10, 05, 22, 15, 02,17) contre C1 LK(25,27, 42,29, 24, 26) contre C3,et LK(19, 08, 11, 03, 20,16,06) contre C1, C3, C4 et C5 sur le milieu MRS tamponné	63
<b>Figure 4.11</b>	(a) résultats de l'activité antagoniste sur milieu tamponné par la méthode des puits et (b) résultat de la recherche du type fermentaire pour les isolats hétérofermentaires	65
<b>Figure 4.12</b>	(A et B) résultats de la croissance à différentes valeurs de pH	67
<b>Figure 4.13</b>	(A) résultats de l'hydrolyse de l'arginine et (B) résultats de la recherche de l'uréase	67
<b>Figure 4.14</b>	Résultat du profil fermentaire des sucres relatif à l'isolat LK 12 (A)et LK 18 (B)	68
<b>Figure 4.15</b>	(A, B, C et D) résultats du pouvoir protéolytique sus le milieu MRS à 10 % du lait écrémé	70
<b>Figure 4.16</b>	(A et B) résultats du pouvoir lipolytique sus le milieu MRS à 1 % et à 3 % du tween 80	70
<b>Figure 4.17</b>	Production des exopolysaccharides (EPS) sur le milieu MRS hypersaccharosé ; (A) LK 12, (B) LK 06, (C) LK 08, (D) LK 11.Elle se constate par l'apparition des colonies gluantes et grosses	71
<b>Figure 4.18</b>	Résultats de la recherche de production d'acétoine ; (A) coagulation (+), (B) anneau rouge après l'addition de VPI et VPII	71

## Liste des abréviations et acronymes

<b>μ</b>	micro
<b>N</b>	normalité
<b>μl</b>	microlitre
<b>mm</b>	millimètre
<b>cm</b>	centimètre
<b>ml</b>	millilitre
<b>g</b>	gramme
<b>L</b>	litre
<b>Kg</b>	kilogramme
<b>μg</b>	microgramme
<b>min</b>	minute
<b>h</b>	heure
<b>pH</b>	potentiel d'hydrogène
<b>WA</b>	<i>Water Activity</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	dioxyde de carbone
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peroxyde d'hydrogène
<b>rpm</b>	rotation par minute
<b>Psi</b>	<i>Per Square Inch</i> (1 bar = 14,5 psi)
<b>P/V</b>	poids/volume
<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i>
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization</i>
<b>OIE</b>	Office International des Epizooties
<b>NA</b>	Norme Algérienne
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>GRAS</b>	<i>Genarally Recognized As Safe</i>
<b>CFU</b>	<i>Colony-Forming Unit</i>
<b>LAB</b>	<i>Lactic Acid Bacteria</i>
<b>Lb.</b>	<i>Lactobacillu</i>
<b>S.</b>	<i>Staphylococcus</i>
<b>E.</b>	<i>Enterococcus</i>
<b>B.</b>	<i>Bacillus</i>
<b>Cl.</b>	<i>Clostridium</i>
<b>SSO</b>	Specific Spoilage Organisms
<b>BoNT</b>	<i>Botulinum</i> neurotoxin
<b>UA/ml</b>	Unité Arbitraire par millilitre
<b>Mbp</b>	Mega paires de bases
<b>A</b>	Absorbance
<b>DO</b>	Densité Optique

## Introduction générale

Les bactéries lactiques font référence à un groupe de genres de bactéries colonisant différents biotopes microbiens (sol, plantes, système digestif de l'homme, etc.). Elles sont bénéfiques pour l'homme et la caractéristique commune unissant ce groupe de bactéries étant la production d'acide lactique comme produit final de fermentation des glucides.

En effet, l'utilisation de ces bactéries dans la production de nombreux aliments est vraiment ancestrale notamment dans la préparation des laitages fermentés, le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, etc. En industrie alimentaire, elles sont largement utilisées pour la production des produits fermentés et comme outils de sécurité (**Leroy & de Vuyst, 2004; Adams & Mitchell, 2002; Ross *et al.*, 2002**), et qu'elles jouissent de différentes propriétés technologiques contribuant à la texture et à la saveur des aliments, par la production de composés aromatiques notamment. Quant au plan hygiénique, les bactéries lactiques entravent le développement de la microfaune indésirable (**Benkerroum & Tamime, 2004**) et prolongent la durée de vie des aliments, par le décroissement du pH et les divers métabolites à un effet antimicrobien qu'elles produisent (**Moraes *et al.*, 2010 ; Dortu & Thonart, 2009 ; Piard & Desmazeaud, 1991**). Leur incorporation, soit de manière empirique, dans les aliments (**Ross *et al.*, 2002**) soit de façon industrialisée pour prolonger la conservation de l'aliment et améliorer sa qualité sanitaire est très répandue.

L'utilisation de microorganismes vivants dans la conservation naturelle des aliments en préservant leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles s'appelle la bioconservation ou bien la technologie dite «douce» (**Settanni & Corsetti, 2008 ; Gálvez *et al.*, 2007**). Cette technologie a la prérogative de réduire le recours aux conservateurs chimiques, qui ont montré, pour certains d'entre eux, des répercussions traitées indésirables sur la santé de l'homme, du même qu'aux traitements thermiques souvent préjudiciables aux propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments. Les bactéries lactiques sont utilisées en bioconservation pour leurs capacités à produire plusieurs métabolites antimicrobiens, tels les acides organiques (acide lactique, acide acétique, etc.), l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, la reutéline, le dioxyde de carbone et les bactériocines (**De Martinis *et al.*, 2003; Carretal., 2002; Abee *et al.*, 1995 ; Klaenhammer 1988**).

Dans ce sens, il est intéressant d'étudier cet exemple d'interaction bénéfique entre les microorganismes dont les bactéries lactiques ont été, et elles sont encore mieux, des acteurs invincibles dans la préservation de nos aliments et la protection de notre santé contre les infections, et qu'il est lieu de méditer comment nos ancêtres ont, instinctivement, tiré profit de ces microorganismes avant même que personne ne savait le moindre détail sur leur privilège ; il s'agit vraiment d'une guidée divine et que toute créature est soumise au service de l'homme.

Du fait, et comme la conservation traditionnelle des aliments dans notre région fait facilement allusion à la viande salée et séchée appelée encore *Khliiaa* ; cette dernière était choisie comme biotope pour cette étude afin d'évaluer l'effet antimicrobien de son microbiote lactique.

Par conséquent, ce travail de mémoire avait pour objectifs :

- ✚ L'isolement et l'identification phénétique des bactéries lactiques à partir de « *Khliiaa* ».
- ✚ La mise en évidence d'une éventuelle activité antagoniste de ces isolats lactiques contre des germes pathogènes et/ou d'altération.
- ✚ La mise en crête de quelques propriétés d'ordre technologique ou probiotique.

La première partie de ce mémoire servira d'une introduction au sujet par une analyse bibliographique comportant trois chapitres : le premier ; rappelle la composition physicochimique de viande, sa microbiologie et ses différentes qualités recherchées par le consommateur et l'industrie. Le deuxième, traite les bactéries lactiques, leur classification, métabolisme, culture et leurs principales applications industrielles notamment dans la filière agroalimentaire et met l'accent sur les bactériocines. Le troisième chapitre est un focus sur les probiotiques, leur définition, bienfaits ainsi que leurs critères de choix et validation pour l'usage.

La seconde partie, exposera le matériel et les méthodes mis en œuvre dans la réalisation de l'étude. Elle comporte l'isolement, et l'évaluation de la capacité antagoniste du microbiote lactique contre les germes nuisibles ainsi que l'identification des bactéries lactiques purifiées et l'étude de quelques propriétés technologiques et certaines épreuves *in vitro* pour dévoiler une éventuelle potentialité probiotique. La dernière partie du manuscrit affichera les résultats obtenus et une discussion.

**Partie 1.**

**Revue de la littérature**



# Chapitre 1

## Généralités sur la Viande

### 1.1 Définition de la viande

L'appellation « viande » fait référence à la chair des animaux dont on a coutume de se nourrir. Elle comprend la chair des mammifères, des oiseaux et quelquefois des poissons (Staron, 1979).

Selon L'organisation mondiale de la santé animale (créée sous le nom d'Office International des Epizooties (OIE)), la viande désigne toutes les parties comestibles d'un animal et elle considère par le mot « animal », dans ce contexte « tout mammifère ou oiseau ». Dans ce vocabulaire est incluse la chair des mammifères (Ovin, bovin, caprin, camelin etc.) et des oiseaux (poulet, dinde, pintade, etc.). Mais la qualité de la viande est fonction de la race, de l'âge, et du sexe de l'animal (Elrammouz, 2005 ; Fosse, 2003).

Etant caractérisées par une grande hétérogénéité, les viandes sont principalement constituées de muscles striés squelettiques qui comportent aussi d'autres tissus en proportions très variables selon l'espèce, la race, l'âge, le régime alimentaire et la région anatomique concernée. Ce sont surtout les tissus conjonctifs, adipeux parfois les os et la peau (Gondret *et al.*, 2004 ; Debiton, 1994 ; Staron, 1982).

### 1.2 Du muscle à la viande ; évolution, composition et caractéristiques

Le muscle est une structure anatomique résultant d'un ensemble de cellules spécialisées rassemblées en faisceaux. Physiologiquement parlant, il s'agit de loges, capables de contractions et de décontractions et y génératrices de mouvements (Serg, 2005 ; Lawrie, 1998B ; Dumont *et al.*, 1982).

### 1.2.1 Évolution

Une fois l'abattage des animaux de boucherie effectué, les muscles seront scène de multiples modifications, plus ou moins importantes qui donnent naissance, définissent et déterminent des qualités organoleptiques inhérentes à la viande. Le passage du muscle en viande est la résultante d'un ensemble de processus très complexes, surtout d'ordre physico-chimique faisant appel aux systèmes enzymatiques (**Ouali, 1990 a et b**). On en peut valablement considérer que le muscle passe, au cours de sa transformation en viande, par trois états qui se succèdent laissant l'un place à l'autre (**Ouali, 1990 a**):

- ✚ **L'état pantelant** : qui suit spontanément l'abattage. Au cours duquel, la musculature se caractérise par les contractions persistantes, sa durée coïncide en effet avec un laps de temps n'excédant pas les 20 minutes et qui correspond à la durée de survie du système nerveux (**Joanisse, 2004 ; Ouali, 1991 ; Soltner, 1979 ; Rosset et al., 1984**);
- ✚ **L'état rigide** : qui est le point d'aboutissement de la rigidité cadavérique dite encore *Rigor mortis*. Il prend place après l'épuisement des réserves énergétiques et l'acidification du tissu musculaire (**Boccard et al., 1984**);
- ✚ **L'état mature** : qui est le point conséquent de la phase de maturation, c'est au cours duquel que s'élaborent, en grande partie, divers facteurs qui définissent les qualités organoleptiques de la viande notamment la tendreté (**Balon & Yerneni, 2001 ; Lawrie, 1998 a**).

La viande résulte, donc, de l'évolution post mortem du tissu musculaire squelettique (ou strié) et du tissu adipeux. Ses qualités sont ainsi fonction de la structure et la composition de ces tissus (**Elrammouz, 2005**).

### 1.2.2 Composition biochimique

La composition du muscle varie entre les animaux et d'un muscle à l'autre chez un même animal (**Stetzer et al., 2006**). Le tableau 1.1 indique la composition biochimique moyenne de la viande.

**Tableau 1.1** : Composition biochimique moyenne de la viande rouge (**Rosset *et al.*, 1984**)

Composant	Moyenne
Eau	75 %
Protéines	15.5 %
Lipides	3 %
Substances azotées non protéiques	1.5 %
Glucides et catabolites	1 %
Composés minéraux	1 %

### 1.2.2.1 Protéines

Grâce à leurs protéines riches en acides aminés indispensables et qui les classent parmi les protéines nobles, les viandes sont, par excellence, la première source de protéines (**Youling *et al.*, 2001 ; Staron, 1982 ; Truchot, 1979**).

La teneur en protéines varie entre 16 et 22% du poids total de la viande (**Coibion, 2008**) et elles sont réparties en : protéines intracellulaires représentées par les protéines sarcoplasmique (albumine, globuline, hémoglobine et myoglobine), les protéines myofibrillaires (actine, myosine, tropomyosine et actinine) et en protéines extracellulaires (collagène, réticuline et élastine) (**Lawrie, 1998B**).

### 1.2.2.2 Lipides

La fraction lipidique fait 3 à 5 % de la composition totale du muscle (**Coibion, 2008**). Les lipides de la viande se présentent sous forme de triglycérides et de phospholipides (lipides membranaires insaturés) et sont constitués d'acides gras saturés dont 45 à 55% d'acides gras sont indispensables (**Sloan, 2009 ; Geay *et al.*, 2002 ; Craplet, 1966**). Ils sont localisés dans la fibre musculaire ou dans le tissu conjonctif entre les faisceaux musculaires (**Janz *et al.*, 2008 ; Craplet, 1966**). La qualité lipidique reste fonction de l'espèce, de l'animal et de l'alimentation (**Thomas *et al.*, 2008 ; Vierling., 2003**).

### 1.2.2.3 Glucides

Au cours de la maturation de la viande, le glycogène du muscle se transforme en acide lactique ; la teneur en glucides des viandes est stable, elle est de 1.2 % chez le bovin (**Monin & Ouali, 1991**).

#### 1.2.2.4 Vitamines

Les viandes contiennent la Thiamine B1, la Riboflavine B2 et sont pauvres en vitamine C. Elles sont alors riches en vitamines hydrosolubles surtout le groupe B. Celles qui ont une teneur élevée en gras sont riches en vitamines liposolubles (**Mansour, 1996**).

### 1.2.3 Caractéristiques physico-chimiques

#### 1.2.3.1 Teneur en eau

La teneur du muscle en eau varie selon l'âge, le type de muscle et surtout la teneur en lipides (**Schone et al., 2006**). Le muscle peut contenir de 60 à 80 % d'eau dont 90 à 95 % sous forme libre et 5 à 10% sous forme liée (**Coibion, 2008 ; Huff-Lonergan et al., 2005 ; Lawrie, 1998B**).

#### 1.2.3.2 Minéraux

Les viandes sont les aliments les plus riches en sélénium avec une teneur moyenne de 9 µg/100 g de viande environ. Il s'agit d'un antioxydant qui protège l'organisme contre les peroxydations lipidiques, y donc contre le vieillissement, comme il prévient des maladies cardiovasculaires (**Interbaw, 2005**). Elles sont la meilleure source de fer hémique (3 à 6 mg), qui est beaucoup mieux que le fer non hémique assimilé par l'organisme humain (**Interbaw, 2005 ; Craplet, 1966**). Les viandes font une source principale en zinc. Elles apportent du potassium et du phosphore, mais quant au calcium, elles en sont très pauvres (**Henry, 1992**).

## 1.3 Viande et qualités

La notion de qualité peut se définir selon *International Organization for Standardization* (ISO) dans sa nouvelle et dernière version ISO 9000 : 2015 comme *l'aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques d'un objet à satisfaire des exigences*. En l'occurrence pour la viande, il s'agit de satisfaire les consommateurs et les industries de la transformation, qui constituent les utilisateurs à hauteur respective de 20 à 35 % et de 65 à 80 % de la carcasse produite (**Sayah, 2000**).

En ce qui est de la notion de qualité intrinsèque des viandes, c'est une notion relative qui dépend d'éléments composants en nombre de huit (8) plus ou moins objectifs : hygiénique (sécurité), nutritionnelle (santé), organoleptique, technologique (marchande), usage (service), régularité, rève et étique, dont les quatre premiers sont liés à la qualité microbiologique de la viande (**Fraysse & Darre, 1990**).

### 1.3.1 Qualités organoleptiques

La qualité organoleptique comprend les propriétés sensibles. Ce sont les caractéristiques perçues par les sens du consommateur (l'aspect et la couleur, l'odeur et la saveur, la consistance et la texture, le goût et la saveur,) (**Lawrie, 2002 ; Touraille, 1994 ; Lameloise et al., 1984**). Elles peuvent se classer en trois modalités de sensations :

- ✚ Qualitative ; qui déterminant la nature de la viande.
- ✚ Quantitative ; représente l'intensité de cette sensation.
- ✚ Hédoniste ; qui caractérise le plaisir ressenti à l'égard du produit (**Kerry et al., 2002 ; Lameloise et al., 1984**).

#### 1.3.1.1 Couleur

C'est un critère déterminant pour le consommateur en appréciant l'aspect visuel de la viande. Le pigment conférant à la viande sa couleur est principalement la myoglobine qui est une chromoprotéine. L'oxymyoglobine, avec sa couleur rouge vif, est synonyme de la fraîcheur recherchée par le consommateur. Elle résulte spontanément lors du contact entre la viande et l'air où la myoglobine se combine avec l'oxygène formant ainsi la couleur de viande (**Coibion, 2008 ; Renerre, 1997**).

#### 1.3.1.2 Flaveur

Le terme «flaveur» désigne à la fois les impressions olfactives et gustatives qu'on éprouve au moment de la consommation d'un aliment (**Fournier, 2003 ; Pearson et al., 1999 ; Rosset et al., 1984**). Pour la viande, divers facteurs influencent la flaveur, à savoir : l'espèce, la race, l'âge, le sexe, le mode d'élevage et l'évolution post mortem (**Toldra, 2010 ; Henry, 1992 ; Rosset et al., 1984**). Et elle est définie par plusieurs composés chimiques libérés au cours de la cuisson (**Guillem et al., 2009**). Ces composés

sont, selon la nature et l'effet, de 2 classes:

- ✚ Les composés volatils responsables de l'arôme ou de l'odeur. Sont des composés soufrés, alcools, esters, hydrocarbures aliphatiques, etc.
- ✚ Les composés non volatils responsables du goût. Ils comprennent les nucléotides, certains acides aminés, la créatinine. Ces précurseurs sont élaborés au cours de la maturation de la viande (**Macleod, 1994**).

### 1.3.1.3 Tendreté

La tendreté est la facilité avec laquelle la viande est coupée et broyée au cours de la mastication (**Vierling, 2003**). Elle joue un rôle déterminant dans l'acceptabilité de la viande par le consommateur (**Rosset, 1984**).

La tendreté optimale est fonction d'un rapport inversement proportionnel entre la température de stockage et la durée de conservation. Elle est de 8 jours à 6 C°, de 14 jours à 2 C° et de 16 jours à 0 C° (**Coibion, 2008 ; Lameloise et al., 1984**).

### 1.3.1.4 Jutosité

C'est une qualité organoleptique qu'on perçoit au cours de la mastication de la viande. Le facteur essentiel dans la jutosité ou succulence d'une viande est le pouvoir de rétention d'eau du muscle (hydratation). Elle se traduit par la faculté de la viande à conserver sa propre eau ou de l'eau ajoutée, ce qui est en relation avec la force de liaison de l'eau aux protéines de la fibre musculaire (**Rosenvold et al., 2001 ; Henry, 1992**).

## 1.3.2 Qualités nutritionnelles

La viande est de loin une source de protéines de haut rang. Les protéines diffèrent par leur digestibilité et par leur composition en acides aminés (**Daurmaun, 1990**); la digestibilité des viandes est très élevée ; le Coefficient d'Utilisation Digestive (CUD) est excellent et dépasse 95 % (**Williams, 2007 ; Comelade, 1995**).

La viande est généreuse en fer; cet oligo-élément hautement indispensable à un grand nombre de fonctions vitales reste le plus représenté dans l'organisme (**Goulet, 1990**). Elle est aussi une bonne source de zinc et vitamines notamment de groupe B et très riche en

vitamine A (**Robbins *et al.*, 2003**). La place des vitamines de la viande dans la croissance et dans l'entretien de l'organisme est parfaitement indiscrète (**Rullier, 1999**).

### 1.3.3 Qualités technologiques

Autres que ceux d'ordre strictement alimentaire, les critères technologiques attendus par le consommateur et auxquels la viande doit répondre sont, surtout, l'aptitude à la conservation, qui se traduit par la durée de vie de l'aliment après l'achat dans des conditions de conservation déterminées, la commodité d'emploi par la facilité de stockage et l'opération de préparation facile et de longue durée (**Brewer, 2010 ; Touraille, 1994**).

### 1.3.4 Qualités hygiéniques

Afin d'être sûre et préserver la santé du consommateur, la viande ne doit contenir aucun résidu toxique (métaux lourds, toxines bactériennes), aucun parasite, ni être le siège de développement bactérien (**Coibion, 2008 ; FAO, 2000 ; Morisetti, 1971**). Il faut qu'elle soit quasi absolument gardée dans les conditions de sécurité; Elle doit être donc protégée des différentes contaminations (**Nutsch *et al.*, 1997**).

## 1.4 Microbiologie de la viande

Sur le plan nutritionnel, la valeur nutritive de la viande en fait un aliment de choix indispensable pour une ration alimentaire équilibrée en raison de sa richesse en protéines et en raison la nature de celles-ci. De l'autre angle, la viande est aussi un substrat favorable au développement des microorganismes influant sur les caractéristiques organoleptiques, essentiellement des bactéries protéolytiques qui entraînent des modifications surtout indésirables sur l'odeur, la couleur, la texture ou éventuellement des microorganismes qui peuvent présenter un danger biologique, tels que les germes pathogènes qui produisent des substances toxiques (**Guiraud, 2003 ; Lozach, 2001 ; Larpent *et al.*, 1997**).

### 1.4.1 Ecosystème microbien de la viande

Généralement, il est admis que les muscles des animaux qui vont donner la viande et produits carnés que nous consommons sont stériles, ou éventuellement faiblement contaminés, mais dans des proportions très faibles. C'est donc au cours de la transformation

que les flores microbiennes présentes en surfaces des animaux ou dans les organes contaminés (tube digestif notamment) vont progressivement gagner la surface voire le cœur des produits carnés. Elles mêmes, ces flores microbiennes sont issues d'écosystèmes très divers, eaux, sols, végétaux, tube digestif, peau, etc. Et si l'on tient compte de l'énorme richesse microbienne que cela représente en terme de quantité ou de biodiversité, on pourrait croire que les produits carnés sont extrêmement pollués et forcément dangereux à consommer. En fait, il n'en est le plus souvent pas le cas, notamment lorsque les opérations mises en place dès le début des transformations visent à proscrire le plus possible la microflore contaminante, mais elles visent aussi à optimiser et à orienter les flores résiduelles vers être les plus longues à entraîner des altérations perceptibles. Les microorganismes qui survivent à l'issue des traitements adoptés font presque toujours, ce que les anglo-saxons appellent « *Specific Spoilage Organisms* » (microorganismes d'altération spécifiques (MAS)) (Labadie, 2006).

La flore saprophyte rencontrée sur les viandes rouges est le plus souvent faite des germes des genres: les *Entérobacteriaceae* (*Escherichia coli* et les autres genres), *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Clostridium* (Hinton *et al.*, 1998 ; Dachy, 1993). Hors les bactéries, il existe une diversité de levures et moisissures. Pour les levures sont rencontrés les genres : *Candida* (surtout *Candida lipolytica*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*) (Simpson *et al.*, 2006 ; Scionneau, 1993) et parmi les moisissures, le plus souvent, les genres *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Rhizopus* (Cartier, 2004 ; Rosset, 1982 ; Desrosier, 1970). La microflore des viandes est donc composée essentiellement de microorganismes saprophytes et la contamination par les germes pathogènes n'apparaît que rarement (Cartier, 2007).

Les germes pathogènes les plus fréquents susceptibles de contaminer les carcasses, sont: *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, *Shigella*, en plus de *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* (Bourgeois *et al.*, 2008 ; Korsak *et al.*, 2004 ; Fournaud, 2000).

#### 1.4.2 Réduction de la charge microbienne de la viande

Les méthodes de décontamination créent, en général, les conditions nécessaires pour réduire et maîtriser la flore microbienne de la viande (Huffman, 2002 ; Hardin *et al.*, 1995)

A ce titre, de nombreuses méthodes basées sur des principes différents sont mises en œuvre: certaines utilisent des moyens physiques (température, pression, champs électriques pulsés, rayonnements ionisants..), d'autres utilisent des moyens chimiques (séchage, salage, fumage, conservateurs, huiles essentielles...). Les méthodes microbiennes sont également utilisables en exploitant les propriétés antagonistes des bactéries (**Oussalah *et al.*, 2006 ; Lücke, 2000**).

### 1.4.3 Evolution de la microflore et dégradation de la viande

La prolifération de la flore microbienne de la viande au cours de la conservation contribue aux changements au niveau des substrats disponibles. Ces changements sont essentiellement dus aux activités des enzymes protéolytiques et lipolytiques d'origine microbienne. Et du fait, l'altération de la viande peut être considérée comme un phénomène écologique. (**Nychas *et al.*, 2008 ; Koutsoumanis & Sofos, 2004 ; Genot, 2000**).

Les proliférations microbiennes affectent les qualités organoleptiques (modifications de la couleur, apparition d'odeurs anormales, modifications de la consistance et éventuellement de la texture) et sanitaires de la viande (**Ray & Bhunia, 2008 ; Jeantet *et al.*, 2006**). Ces altérations sont provoquées par la présence physique des microorganismes en augmentant leur nombre ce qui se constate par la formation d'un limon visible en surface suite à une dégradation de la viande (**Marchandin, 2007 ; Guiraud, 2003 ; Lozach, 2001 ; Boulianne & King, 1998**). Ainsi, par l'affection de la flaveur par la production des molécules à effet direct ou indirect en se recombinaut avec d'autres molécules issues du catabolisme des lipides et des acides aminés, qui jouent un rôle dans la formation de biofilms (limon bactérien) se traduisant par un aspect visqueux, très fortement dépréciateur (**Adams & Moss, 2008 ; Jeantet *et al.*, 2006**). Les protéinases bactériennes provoquent la putréfaction de la viande par hydrolyse des protéines et les lipases ont un influx sur l'arôme par dégradation de la matière grasse (**Fournier, 2003**).

En revanche, cette altération microbienne est recherchée ; c'est le cas des produits fermentés (**Muthukumarasamy & Holley, 2006**). Pendant les différentes étapes de stockage, la protéolyse se produit d'ampleur extrêmement importante pour le développement des attributs finaux de texture et de goût/saveur résultant de la formation de petits composants, essentiellement les polypeptides, les peptides, les acides aminés et les

amines, connus sous le qualificatif «instigateurs de goût» et «précurseurs de saveur» (Roseiro *et al.*, 2008). En plus, la production de bactériocines et par son action antimicrobienne contre des microorganismes pathogènes joue un rôle bioconservateur (Drosinos *et al.*, 2008 ; Budde *et al.*, 2003 ; Holzapfel, 1998).

## 1.5 Transformations traditionnelles de la viande

Dans les pays à climat chaud, la conservation des denrées alimentaires d'origine animale n'est pas une chose facile en raison des facteurs climatiques et environnementaux qui optimisent la prolifération des germes microbiens et favorisent les processus d'altération. Tous les procédés de conservation de la viande sont, ainsi, basés sur l'inhibition ou le ralentissement des différents processus de dégradation. L'utilisation du froid est la seule méthode qui permet de maintenir les caractéristiques de la viande fraîche, mais dans ces pays d'autres procédés moins coûteux sont mis en œuvre à savoir, le séchage, le salage, le fumage, la friture et la fermentation et la plupart des produits à base de viande résultent de la combinaison de ces procédés. Certains auteurs classent d'ailleurs ces produits en fonction des traitements associés au séchage; on distingue ainsi les viandes séchées non salées, les viandes séchées salées, les viandes séchées fumées, les viandes conservées par la friture et les viandes fermentées séchées (Yacouba, 2009).

Les produits carnés traditionnels ont toujours accompagné les peuples vivant dans les différentes régions du monde. Ils en constituent un héritage transféré d'une génération à l'autre à travers des siècles. Ces produits typiques font une partie intégrale de la culture gastronomique, des traditions, et de l'économie locale des pays. La diversité culturelle des peuples, les différentes méthodes traditionnelles de préservation et le revenu spécifique conséquent sont des facteurs qui contribuent à la diversité de ces produits d'un pays à l'autre (Sofos, 2013 ; Savic, 2002). Plusieurs produits carnés traditionnels existent dans les pays méditerranéens depuis l'antiquité (Daoudi *et al.*, 2006).

Beaucoup parmi ces produits sont préparés seulement dans des régions géographiques restreintes et consommés localement à titre familial à l'occasion des fêtes religieuses. En Algérie, plusieurs produits carnés traditionnels peuvent être trouvés dont le plus connu est *El Gueddid* ou *Kaddid*, obtenu par le salage et le séchage par le soleil. Pour les moins connus, on trouve *Khliia Ezir*, *Laknafetle Frégate*. *Khliia Ezir* paraît être la seule

viande fumée cuite traditionnelle produite et consommée dans le Nord-est Algérien (Boudechicha, 2014).

Toutefois, la complexité de la fabrication, les procédés de transformation, les méthodes de préservation et même les différents ingrédients ajoutés rendent extrêmement difficile de regrouper les produits carnés disponibles sur le marché (Warfield & Tume, 2000 ; Dawood, 1995) d'où plusieurs classifications ont été apparues. Pearson & Gillet (1999) ont simplifié le groupement quand ils ont catégorisé les produits carnés en viandes salées séchées, viandes fumées et viandes cuites. Tandis que Heinz & Hautzinger (2007) ont classé ces produits selon les techniques de transformation (salage, séchage, fumage et fermentation) en cinq catégories :

- ✚ Viandes salées non séchées ;
- ✚ Viandes fumées ;
- ✚ Viandes séchées non fermentées ;
- ✚ Viandes fermentées demi- séchées / séchées;
- ✚ Viandes cuites et/ou confites dans la graisse.

Concernant la troisième catégorie (le séchage), il s'agit de la forme la plus répandue de transformation traditionnelle de la viande (Nummer *et al.*, 2004 ; Igene *et al.*, 1990 ; Heikal *et al.*, 1972). Ce procédé s'accompagne d'une forte diminution de l'activité de l'eau de la viande (Blackmer *et al.*, 1997 ; Gailani, 1986). D'ailleurs, après séchage, c'est l'activité de l'eau atteinte qui détermine les caractéristiques du produit fini (texture, couleur et saveur) et sa durée de vie (stabilité chimique et microbiologique) (Igene, 2008 ; Farouk, 1983). En ce qui est de l'utilisation, les viandes séchées sont, pour la plupart, des produits prêts à être consommés (*ready to eat meat*) comme des snacks, des repas faits maison avec ou sans reconstitution ou encore ajoutées pour assaisonner certaines sauces et améliorer la qualité nutritionnelle et organoleptique de quelques plats traditionnels (Sloan, 2009 ; Yetim & Cankaya, 2001). La microflore dans la viande séchée se trouve souvent stabilisée (Zukál & Incze, 2010). Les altérations de ce type de produit sont dues, la plupart des cas, à une augmentation de l'humidité, ce qui conduit à un sursissement dû au développement des bactéries lactiques ou des coliformes, ainsi qu'à l'apparition de couleurs diverses sur le produit ou encore la formation de zones spongieuses sous l'action des *Bacillus* (Lonnecker *et al.*, 2010 ; Guiraud, 2003 ; Jay *et al.*, 2000).

### 1.5.1 Biltong

Le plus souvent préparé à partir de la viande de bœuf, le *Biltong* est un type de viande séchée typique de la tradition sud-africaine. D'autres viandes telles que la viande d'autruche ou de chameau sont aussi utilisées (**Petit *et al.*, 2013**). **Naidoo & Lindsay (2010)** ont décrit les méthodes traditionnelles et modernes de la préparation de *Biltong* ; traditionnellement, les morceaux de viande sont marinés dans une solution de vinaigre (vinaigre de cidre, vinaigre balsamique, vinaigre de malt), mélangés à un ensemble d'épices composé de sel, de coriandre, de poivre noir, de sucre brun et de l'ail. On laisse reposer la marinade durant 12 h. Les pièces marinées subissent ensuite un séchage à l'air libre jusqu'à ce qu'elles perdent 75 % de leur poids. Le *Biltong* séché est ensuite emballé dans des sacs en polyéthylène ou en cellulose.

### 1.5.2 Kilishi

Au Niger, la fabrication du *kilishi* est une activité artisanale couramment pratiquée par les bouchers. Ce produit est potentiellement intéressant pour les marchés sahéliens. Il est préparé à partir de fines tranches de viande (0,2 à 0,5 cm d'épaisseur), séchées par exposition au soleil, enrobées avec une sauce puis séchées de nouveau au soleil et grillées. La sauce d'enrobage est faite d'épices diverses (poivre noir, gingembre, ail, piment, clou de girofle) et de pâte d'arachide. La viande utilisée est celle du bœuf provenant du muscle de la cuisse ou de l'épaule (**Mgbemere *et al.* 2011 ; Kalilou & Zakhia, 1999 ; Farouk, 1983**). Les critères d'appréciation de la qualité du produit finie sont déterminés par l'apparence du produit (couleur, aspect, odeur) et son état à la mastication (croustillance, dureté). Le *Kilishi* doit avoir une odeur d'arachide grillée, épicée mais pas très forte. Il doit avoir, selon les épices utilisées, une couleur rouge sombre, brune claire à jaune et brune foncée. Il doit être consistant, sec, mais pas friable (**Lonnecker *et al.*, 2010**).

### 1.5.3 Guadid (Khliia)

Le "*Guadid*" ou "*Kadid*" est un produit carné salé et séché connu dans plusieurs pays d'Afrique du Nord. Il est, le plus souvent, préparé après la fête de l'Aïd El Adha où il y a une disponibilité en excès de viande. Il est préparé aussi bien à partir de viande d'agneau que de bœuf. Cependant, les méthodes de préparation divergent suivant les régions et les

ingrédients mis avec, ainsi que les techniques de salage et les utilisations finales du produit (**Draganski, 2012 ; Bennani *et al.*, 1995**).

Habituellement, les parties de la carcasse transformées en *Guadid* sont les viandes des entrecôtes ou, pour certains, ils ne font du *Guadid* qu'à partir des morceaux restant après la découpe de la carcasse. L'épaisseur des lanières ne doit pas être importante pour dépasser les 3 cm (**Essid *et al.*, 2007**). Pour le salage, il se fait généralement à sec et la quantité de sel à ajouter est appréciée visuellement. L'addition d'épices et/ou d'autres ingrédients est surtout liée à l'utilisation coutumière de chaque région. Après le salage, le *Guadid* est directement mis à sécher par l'exposition des pièces de viande au soleil pour une semaine d'environ pendant l'été et deux pendant l'hiver (**Boudechicha, 2014**).

## Chapitre 2

# Bactéries lactiques

### 2.1 Introduction

Les bactéries lactiques font référence un groupe de bactéries bénéfiques largement répandues dans la nature ainsi que dans le tractus digestif de l'homme. Elles sont ubiquistes et se trouvent soit libres dans l'environnement, soit en association avec un hôte et sont utilisées, depuis des millénaires, dans l'alimentation humaine. A l'heure actuelle, les bactéries lactiques occupent une place importante parmi les auxiliaires de fabrication dans l'industrie agroalimentaire. Bien qu'elles sont connues pour le rôle qu'elles jouent surtout dans le secteur laitier (**Moraes *et al.*, 2010 ; Dortu & Thonart, 2009**). Ces bactéries sont également utilisées dans les salaisons des viandes et des poissons, le saumurage des légumes, ainsi que dans la fabrication du vin et en boulangerie. Elles disposent généralement du statut *GRAS* (*Generally Recognized as Safe*) (**Vescovo *et al.*, 1996**).

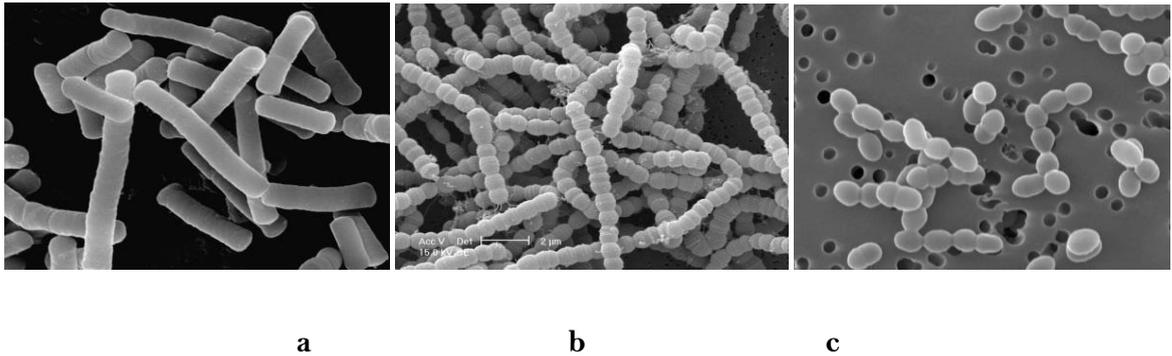
### 2.2 Généralités

Les bactéries lactiques sont des microorganismes unicellulaires, procaryotes, à Gram positif, hétérotrophes et chimioorganotrophes. Elles peuvent avoir des formes coccoïdes, coccobacillaires, ou bacillaires (**Badis *et al.*, 2005 ; Klein *et al.*, 1998**)(Fig 2.1). Elles sont non pigmentées, immobiles et non sporulantes. Les bactéries lactiques supportent des pH acides, sont à catalase négative et possèdent un métabolisme anaérobie strict ou aérotoleérant (**Hardie & Whiley, 1997**). En étant dépourvues de chaîne respiratoire, une teneur excessive en oxygène peut leur être néfaste, alors que même la plupart d'elles sont génétiquement équipées pour avoir un métabolisme respiratoire, mais incapables de respirer si l'hème (un cofacteur indispensable au cytochrome c-oxydase le dernier accepteur d'électrons de la chaînerespiratoire) n'est pas présent dans le milieu (**Lechardeur *et al.*, 2011**).

En fermentant les sucres (glucose, fructose, mannose, galactose, saccharose et lactose), les bactéries lactiques produisent de l'acide lactique (**Kandler & Weiss, 1986**) comme produit principal du métabolisme chez les bactéries homofermentaires, et de

l'éthanol et CO<sub>2</sub> en plus chez les bactéries hétérofermentaires (**annexe.2**). Le pourcentage de contenu en guanine et cytosine GC % de leur ADN est compris entre 30 et 60 % (**Stiles & Holzapfel, 1997**) et la taille de génome va de 1,8 à 3,3 Mpb.

Les bactéries lactiques sont très exigeantes en acides aminés et en vitamine B et sont caractérisées par de faibles activités protéolytique et lipolytique (**Caplice & Fitzgerald, 1999**).



**Figure 2.1:** Formes bâtonnet (bacille) (a) et sphérique (cocci) (b, c) des bactéries lactiques. Observations au microscope électronique à transmission 10000X (**Ehrmann *et al.*, 2009**)

L'amélioration de la qualité des produits fermentés en améliorant certaines caractéristiques organoleptiques et en prolongeant leur durée de conservation en font le principal atout que les bactéries lactiques représentent pour l'industrie alimentaire (**Stiles, 1996**). Elles ont un effet inhibiteur contre certains microorganismes pathogènes, par la production de plusieurs métabolites à action antimicrobienne (**Dortu & Thonart, 2009; Moraes *et al.*, 2010**).

### 2.3 Historique et taxonomie

Découvertes dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années, les bactéries lactiques sont de très anciennes créatures, existantes avant l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère ; une raison qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie (**Quiberoni *et al.*, 2001**). Elles sont apparues au monde avant les cyanobactéries photosynthétiques (**Dridier & Prevost, 2009 ; Quiberoni *et al.*, 2001**).

La classification phénotypique des bactéries lactiques repose sur les critères morphologiques, la croissance à différentes températures, à différentes concentrations

de sel, le mode de fermentation des sucres, la tolérance aux pH acides et alcalins, la configuration de l'acide lactique, l'hydrolyse de l'arginine et la formation d'acétoïne. Par ailleurs, d'autres classifications ont été proposées, dont une selon la composition de la paroi cellulaire (De Ambrosini *et al.*, 1996) incluant la nature des acides gras qui la composent, (König & Fröhlich, 2009 ; Gilarová *et al.*, 1994). Une autre classification a subdivisé les bactéries lactiques en trois groupes selon la nature des produits du métabolisme bactérien des glucides (McLeod *et al.*, 2008). Le groupe I fait majoritairement des Lactobacilles homofermentaires. Le groupe II renferme les bactéries hétérofermentaires et comprend les espèces des genres *Leuconostoc*, *Oenococcus*, et *Weissella*, ainsi que quelques espèces du genre *Lactobacillus*. Quant au groupe III, il regroupe quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant aux genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ce dernier genre renferme des espèces capables d'être homo ou hétérofermentaires selon les conditions environnementales occupant ainsi une position intermédiaire entre les groupes I et II (McLeod *et al.*, 2008).

La seconde édition de *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Vos *et al.*, 2009) classe les bactéries lactiques dans le phylum des *Firmicutes*, la Classe des *Bacilli* et l'Ordre des *Lactobacillales* renfermant trente-cinq genres répartis en six familles : *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae* (Brenner *et al.*, 2005)(Tab 2.1). Seuls les douze genres: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* et *Weissella* sont utilisés en technologie alimentaire (Fig2.1) (Vandamme *et al.*, 1996).

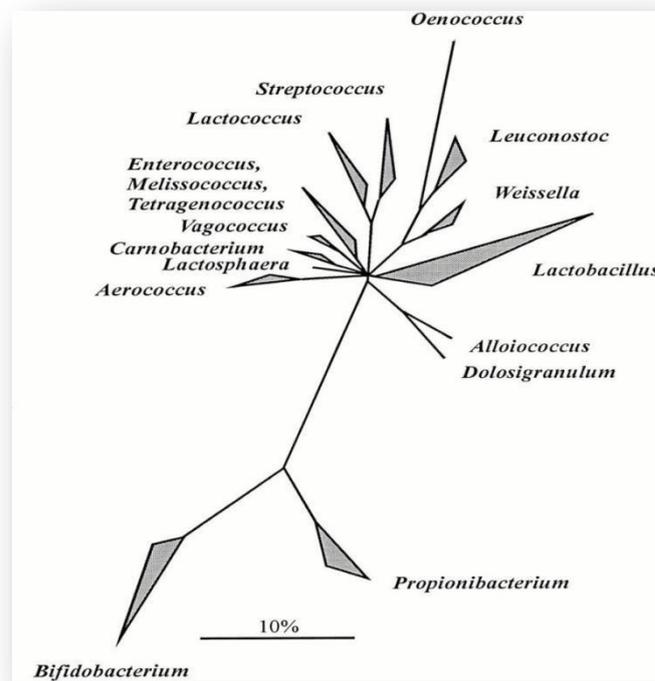
Les genres bactériens : *Bifidobacterium*, *Macrooccus*, *Brevibacterium* et *Propionibacterium* sont apparentés aux bactéries lactiques, et dont l'appellation bactérie lactique peut souvent s'étendre (Fig 2.2 et 3.3) et sont également utilisés pour la fabrication de divers produits fermentés (Pfeiler & Klaenhammer, 2007 ; Klaenhammer *et al.*, 2005). De même que le statut *GRAS* leur est attribué (Klaenhammer *et al.*, 2005 ; Adams & Marteau, 1995). Pour les bactéries du genre *Bifidobacterium*, elles appartiennent au phylum *Actinobacteria* et sont donc phylogénétiquement éloignées des bactéries lactiques (Trias, 2008).

Parmi les bactéries lactiques, des unes sont néanmoins considérées comme des pathogènes opportunistes pouvant provoquer des maladies, il s'agit de quelques

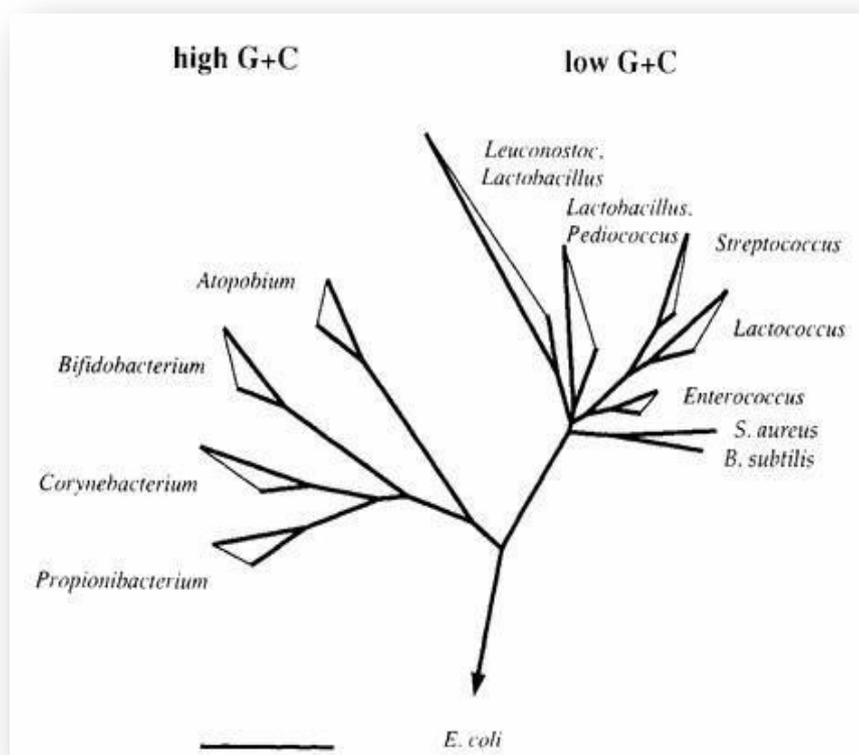
espèces du genre *Streptococcus*, *Enterococcus* et certains *Lactobacillus* (König & Fröhlich, 2009 ; Aguirre & Collins, 1993).

**Tableau 2.1** : Familles et principaux genres des bactéries lactiques (Brenner *et al.*, 2005)

Familles	Principaux genres
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Pediococcus sp.</i>
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc sp.</i> , <i>Oenococcus sp.</i> , <i>Weissella sp.</i>
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus sp.</i> , <i>Lactococcus sp.</i>
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium sp.</i>
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus sp.</i> , <i>Tetragenococcus sp.</i> , <i>Vagococcus sp.</i>
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus sp.</i>



**Figure 2.2** : Arbre phylogénique des bactéries lactiques avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* (Axelsson, 2004)



**Figure 2.3:** Arbre phylogénétique des bactéries Gram positives basé sur la comparaison des séquences de l'ARNr 16 S. La barre indique une divergence de séquence à 10 % (Schleifer & Ludwig, 1995)

## 2.4 Culture des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB) exigent pour leur croissance la présence de différents nutriments dans les milieux de culture. Outre les sucres fermentescibles, ces bactéries nécessitent certains acides aminés essentiels comme le glutamate et la méthionine, des acides gras, des sels, des vitamines et des conditions généralement pauvres en oxygène pour donner une bonne croissance sur les milieux synthétiques (Manca de N, 2007 ; Letort *et al.*, 2002). Elles sont généralement cultivées sur des milieux complexes comme les milieux MRS et M17, qui étaient souvent utilisés pour l'isolement et le dénombrement des bactéries lactiques de différentes niches écologiques (Gemelas *et al.*, 2013). L'utilisation d'agar au lait écrémé a permis aussi l'isolement de *Lb. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* à partir de yaourt (Coeuret *et al.*, 2003). Cependant l'enrichissement de ce milieu par l'extrait de levure ou les hydrolysats de caséine a été souvent nécessaire pour l'isolement des autres espèces (Olmos-Dichara *et al.*, 1997 ; Centeno *et al.*, 1996). En industrie, l'utilisation des

milieux enrichis pour les fermentations peut conduire à plus de 60 % de pertes économiques (Coelho *et al.*, 2011). Les Leuconostocs se trouvant en co-culture avec d'autres genres lactiques et sont généralement isolés seuls sur le milieu MRS additionné de 30 mg/ml de vancomycine. Le milieu M17 contenant 5 % de glucose peut permettre l'isolement des Leuconostocs qui nécessiteront entre 24 à 48 h pour donner les premières colonies. Ce même milieu permet l'appréciation du caractère mucoïde des Leuconostocs quand il est additionné de 5 % de sucrose (Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004). Le milieu glucose-extrait de levure, le bouillon extrait de levure-glucose-citrate (YGC), le milieu Tétrazolium-sucrose (TS) ont été aussi utilisés pour l'isolement des Leuconostocs des végétaux (Dicks & Endo, 2009).

## 2.5 Identification des bactéries lactiques

La différenciation entre les genres lactiques était, pendant des décennies, fondée sur les caractères phénotypiques, morphologiques, physiologiques et biochimiques des bactéries. Sous le microscope photonique les bactéries lactiques sont des coques ou bacilles à Gram positif, de formes irrégulières, immobiles et non sporulés. Cependant la morphologie cellulaire est souvent instable et peut être partagée par plusieurs genres. Les Lactobacilles, par exemple, et quelques genres proches comme *Carnobacterium* et *Weissella* apparaissent sous différentes formes allant de bacilles longs ou incurvés aux formes de Corynebactéries ou cocobacilles. Afin de différencier les genres voisins il a fallu se baser sur d'autres critères comme la non utilisation d'acétate par *Carnobacterium* et la structure de la paroi de *Weissella* qui diffère de celle des Lactobacilles hétérofermentaires (Coeuret *et al.*, 2003). Dans la caractérisation physiologique, sont considérés, pour les bactéries lactiques, leur type respiratoire, leur mobilité, leur croissance à différentes températures et en présence de divers pH et concentrations en NaCl. La caractérisation biochimique s'intéresse à leur type fermentaire (homo/hétérofermentaire), à leur capacité d'utiliser les carbohydrates ou l'arginine et à leur susceptibilité aux antibiotiques. D'autres caractères particuliers, comme l'activité hémolytique alpha ou bêta (pour les souches pathogènes), réduction du tellurite de potassium, décarboxylation de la tyrosine, la lipolyse, la mobilité électrophorétique, la production d'isomère optique de l'acide lactique, l'hydrolyse de l'esculine et de l'urée, la synthèse d'enzymes spécifiques comme la catalase, la pseudocatalase ou la phosphatase alcaline sont parfois recherchées (Alaoui Ismaili *et al.*, 2016 ; Franciosi *et al.*, 2009 ; Terzic-Vidojevic *et al.*, 2009 ; Cortez S *et*

**al., 2007 ; Facklam & Elliott, 1995).**

Les bactéries lactiques sont des microorganismes chimioorganotrophes ce qui signifie qu'elles utilisent comme source énergétique des substances hydrocarbonées telles que les sucres, les alcools et les acides organiques. Elles possèdent souvent des exigences nutritionnelles complexes en matière d'acides aminés, de peptides, de vitamines, de sels, d'acides gras et de sucres (**Durlu-Ozkaya et al., 2001**).

L'empreinte des protéines cytoplasmiques totales ou l'analyse électrophorétique des enzymes sont des méthodes chimiotaxinomique permettant la discrimination des bactéries au niveau de l'espèce ou de la souche. Cependant pour certaines espèces, le pouvoir discriminatoire de ces techniques est limité, c'est le cas compliqué des groupes (*Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* et *Lb. pentosaceus*), (*Lb. casei*, *Lb.rhamnosus*, et *Lb. paracasei*), *Lb. brevis* et *Lb. buchneri*. Pour cela ces techniques sont généralement utilisées pour compléter d'autres techniques phénétiques (**Corsetti et al., 2003 ; De Angelis et al., 2001 ; Durlu-Ozkaya et al., 2001**). Si la croissance des bactéries est réalisée dans des conditions standardisées, des résultats reproductibles peuvent être obtenus. L'électrophorèse des protéines cellulaires totales en gel de polyacrylamide est l'une des techniques simples à réaliser en conditions natives ou dénaturantes. Une séparation des protéines cellulaires selon leur charge ou leur poids moléculaire permet l'obtention des profils qui peuvent être ensuite stockés dans les bases de données après leur analyse (**Coeuret et al., 2003**).

Les techniques génotypiques basées sur l'analyse de l'ADN permettent une meilleure différenciation de ce groupe de genre de microorganismes à différents niveaux, allant du genre jusqu'à la souche en fonction des méthodes utilisées. En général, elles ont l'avantage de ne pas être influencées par les conditions de culture. L'hybridation ADN/ADN, le séquençage, le ribotypage, le polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP), l'analyse de restriction enzymatique (REA), l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD), la réaction en chaîne par polymérase des séquences palindromiques extra-géniques répétées (REP-PCR), le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP), le profil plasmidique (PP) et l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) peuvent déterminer l'espèce puis la souche à laquelle une bactérie peut appartenir avec un degré élevé de certitude si les conditions de l'expérience et les amorces sont bien optimisées (**Felis & Dellaglio, 2015 ; Saito et al., 2011 ; Singh et al., 2009 ; Nigatu, 2000**).

L'analyse des séquences de l'ADNr 16S ribosomique procure un moyen rapide pour l'identification des bactéries. La séquence obtenue d'un isolat est rapidement comparée aux séquences des bases de données. La spécificité d'un gène isolé de *Lactobacillus* se trouvant entre l'ARN ribosomique 16S et 23S a permis une amplification positive avec des gènes isolés de souches du même genre bactérien parmi un mélange contenant 23 souches de lactobacilles de différentes origines, une souche d'*Escherichia coli*, deux souches de *Leuconoctosp.*, une souche de *Carnobacterium piscicola*, une souche de *Pediococcus pentosaceus*, une souche de *Bifidobacterium bifidum*, une souche de *Weissella confusa*, une souche d'*Enterococcus faecalis*, une souche de *Staphylococcus aureus* et une souche de *Listeria monocytogenes* (Coeuret *et al.*, 2003).

## 2.6 Utilité des bactéries lactiques

Ce sont les propriétés fonctionnelles et technologiques qui déterminent une utilisation des bactéries lactiques pour une application industrielle donnée. Ces propriétés recouvrent les aptitudes suivantes : activité acidifiante, propriétés enzymatiques (activité protéolytique, peptidasique et lypolytique), production de métabolites d'intérêt tel que la peroxyde d'hydrogène, les acides organiques et les bactériocines (Belyagoubi, 2014). Les bactéries lactiques ont depuis pu contracter d'autres qualités lorsqu'elles sont associées aux produits alimentaires comme l'augmentation des valeurs nutritionnelles des aliments, la réduction de la formation de produits toxiques et la propriété de probiotique. Cependant, pour les bactéries productrices de bactériocines, en plus de la propriété de bioconservation, plusieurs propriétés leur ont été attribuées telles que la diminution des gaz dus à la fermentation ainsi qu'à l'amélioration du goût et de la qualité du produit fini (Makhloufi, 2011).

### 2.6.1 Dans le secteur alimentaire

#### 2.6.1.1 Pouvoir acidifiant

Dans les industries alimentaires, le pouvoir acidifiant constitue la propriété métabolique la plus importante et la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées. Elle se manifeste par la production, au cours de la croissance bactérienne, de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone (Monnet *et al.*, 2008 ; Mäyrä-Mäkinen & Bigret, 2004). Pour mesurer l'activité acidifiante des bactéries dans le lait, il est nécessaire de détruire au préalable de la flore contaminante

(Chavarri *et al.*, 1983). Les trois bactéries les plus fréquemment citées pour leurs rôles majeurs différents pour l'aptitude acidifiante sont respectivement : *L. lactis subsp. Lactis ssp. cremoris* et biovar *Diacetylactis* (Lafarge *et al.*, 2004 ; Casalta *et al.*, 1995).

#### 2.6.1.2 Pouvoir texturant

Les bactéries lactiques jouent un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés grâce à leur capacité à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) (Welman & Maddox, 2003 ; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002). Les exopolysaccharides sont des composés polymères généralement considérés comme des agents épaississants naturels utilisés en industrie alimentaire. Pour exemple, les *Lb. Delbrueckii ssp. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés en tant que cultures starters fonctionnelles dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis (Durlu-Özkaya *et al.*, 2007 ; Amatayakul *et al.*, 2006). Les souches *Lactococcus lactis ssp. cremoris* ont connu une utilisation très prometteuse pour leurs EPS contribuant à la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (Ruas-Madiedo *et al.*, 2005).

#### 2.6.1.3 Pouvoir aromatisant

Quelques bactéries lactiques peuvent produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. Pour la plupart de ces composés d'arôme, ils sont issus du métabolisme du citrate et les plus importants en sont : l'acétoïne et le diacétyl (Tamime, 1990). La fermentation du citrate est généralement associée à la production de diacétyl (Vignola, 2002). Les Lactobacilles (*Lb. helveticus*, *Lb. bulgaricus*) produisent de l'acétaldéhyde. La teneur en acétaldéhyde est à la fois fonction de son degré de synthèse et du rythme de sa dégradation (Vignola, 2002). Les Leuconostocs hétérofermentaires sont associés souvent aux Lactocoques dans la production de composés aromatiques (éthanol, acide acétique, diacétyl et acétoïne) (Mahaut *et al.*, 2000).

#### 2.6.1.4 Pouvoir protéolytique

Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique, cela nécessite un fonctionnement actif de leur

système protéolytique dans les environnements où les protéines constituent la principale source d'azote (**Law & Haandrikman, 1997**).

La machinerie protéolytique des bactéries lactiques est composée de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse de protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés, ces peptides sont dégradés ensuite par des exopeptidases ou endopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides. Pour l'intérêt industriel, des études comparatives effectuées sur la protéolyse du cheddar fait avec ou sans ferments lactiques ont démontré le rôle de ces bactéries pour la libération de petits peptides et d'acides aminés libres durant la maturation fromagère (**Lynch *et al.*, 1997; Lane & Fox., 1996; Farkye *et al.*, 1995**). L'activité protéolytique est généralement plus prononcée chez les Lactobacilles que les Lactocoques (**Roudj *et al.*, 2009 ; Monnet *et al.*, 2008 ; Donkor *et al.*, 2007**).

## **2.6.2 Intérêts à la bioconservation**

La prolifération de la flore indésirable dans un produit alimentaire peut être limitée par l'utilisation des additifs vivants capables d'inhiber *in situ* la croissance de ces germes et contribuer, par conséquent, à la sérénité du produit pour le consommateur et promouvoir sa conservation. La technologie de biopréservation fait recours, dans la plupart des cas, aux cultures bioprotectrices de bactéries du groupe lactique, bien réputées pour leurs effets bactéricides et bactériostatiques. En effet ces bactéries sont souvent associées à la production des composés inhibiteurs comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le gaz carbonique et le diacétyl pendant leur croissance (**Tuma *et al.*, 2008**). La production d'acides organiques qui accompagne la croissance des bactéries lactiques, conduit à l'abaissement du pH extérieur et cytoplasmique. Cette acidification inhibe l'activité de la majorité des enzymes cytoplasmiques. De plus, ces acides organiques comme l'acide lactique s'accumulent dans le milieu de culture en raison de leur faible dissociation et s'associent aux phospholipides de la membrane entraînant ainsi un dysfonctionnement des systèmes de transports membranaires (**Ammor *et al.*, 2006**).

### **2.6.2.1 Les métabolites à effet antimicrobien**

#### **a. Peroxyde d'hydrogène**

L'effet antimicrobien lié au peroxyde d'hydrogène est dû à l'oxydation des

groupements sulfhydriles des enzymes cellulaires. Cette oxydation conduit à la dénaturation puis à la perte de l'activité enzymatique. Le peroxyde d'hydrogène est, en plus, le précurseur principal des groupements superoxydes ( $O_2^-$ ) et des groupements hydroxyle (OH) qui causent des dommages irréversibles dans l'ADN bactérien (Ammor *et al.*, 2006).

#### b. Diacétyl

Le diacétyl est un composé issu du métabolisme du citrate par les bactéries lactiques. Ce composé agit sur l'utilisation de l'arginine par bactéries à Gram négatif et affecte ainsi leur croissance (Jay, 1982).

#### c. Dioxyde de carbone

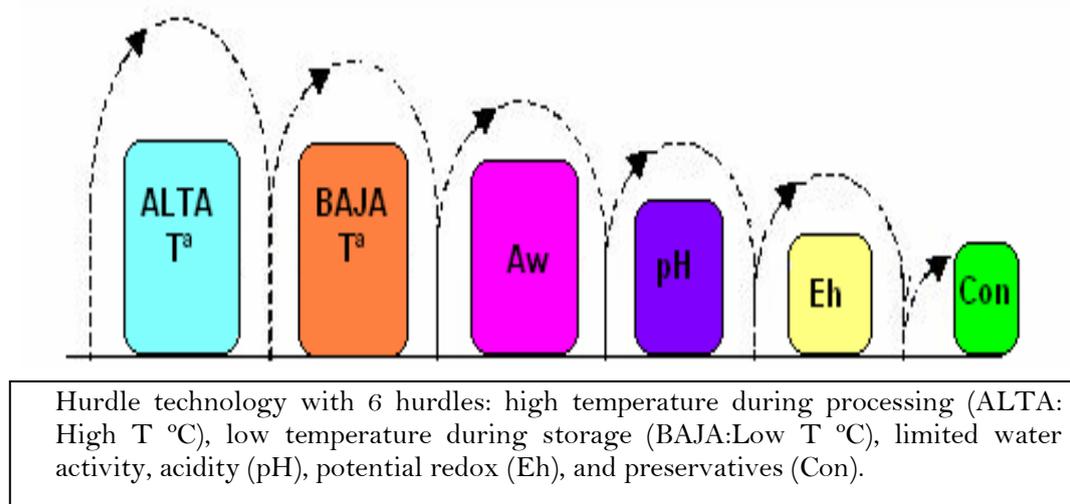
Le dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) est l'un des produits du métabolisme caractérisant des bactéries lactiques hétérofermentaire. L'accumulation du  $CO_2$  dans le milieu provoque le dysfonctionnement des lipides membranaires et conduit à la décarboxylation des enzymes cellulaires des bactéries cibles (Ammor *et al.*, 2006).

#### d. Bactériocines

En plus des mécanismes précédents, les bactéries lactiques sont aussi capables de synthétiser les bactériocines ; des molécules protéiques douées des propriétés antimicrobiennes. Il s'agit des peptides de faible poids moléculaire qui agissent par des interactions électrostatiques avec la membrane plasmique de la bactérie cible. Ces liaisons finissent par la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible. Les bactéries lactiques produisent diverses bactériocines qui sont actuellement utilisées dans le domaine de bioconservation alimentaire. Parmi ces bactériocines on peut citer la Plantaricine J produite par *Lb. plantarum*, la Lactococcine G, la Lactacine Q et la Lactacine Z produites par *Lb. lactis* QU 5 et *Lb. lactis* QU14, l'Entéroccine L50 produite par *E. faecium* L50, la Lactococcine A, la Lactococcine B et la Lactococcine M produites par *Lc. lactis lactis* sp. *cremoris* 9B4, la Thermophiline A et la Bovicine 255 produites respectivement par *Streptococcus thermophilus* ST134 et *Streptococcus gallolyticus* LRC0255, la Durancine TW-49M produite par *Enterococcus durans* QU, la Carnobactériocine A et la Piscicoline 61 synthétisées respectivement par *Carnobacterium piscicola* (*Cb. piscicola*) LV17A et *Carnobacterium piscicola* (Belkheir, 2017).

## 2.7 Bactériocines

La biopréservation est basée sur l'utilisation de la microflore (naturelle et/ou contrôlée) et/ou des substances antibactériennes produites par cette dernière. Les applications des bactéries lactiques produisant des bactériocines sont très prometteuses en sécurité alimentaire en association « *Hurdle Technology* » avec d'autres techniques de préservation des aliments (Ho, 2008) (Fig 2.4).



**Figure 2.4** : Technologie des barrières pour la préservation des aliments (adapté par Leistner (1999)) ; exemple d'un aliment modèle avec 6 barrières. Les bactéries lactiques peuvent intervenir à 2 niveaux (2 barrières) ; par l'abaissement significatif de pH et par la production des substances antimicrobiennes (bactériocines)

### 2.7.1 Définition de bactériocines

Selon Garneau *et al* (2002), les bactériocines sont des molécules de nature protéique, sécrétées dans le milieu extracellulaire et douées d'une activité bactéricide dirigée essentiellement contre des bactéries taxinomiquement proches de la souche productrice et contre certains pathogènes tels que *Bacillus*, *Clostridium* et *Listeria*. Ces bactériocines, selon Diep *et al* (2002), représentent une large classe des substances antagonistes qui varient considérablement en fonction de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action.

D'un point de vue législatif, les bactériocines sont utilisées en tant qu'additifs alimentaires. Jusqu'à présent, seule la Nisine, un lantibiotique, est acceptée comme additif alimentaire (E234) (Guinane *et al.*, 2005). Les bactériocines peuvent être

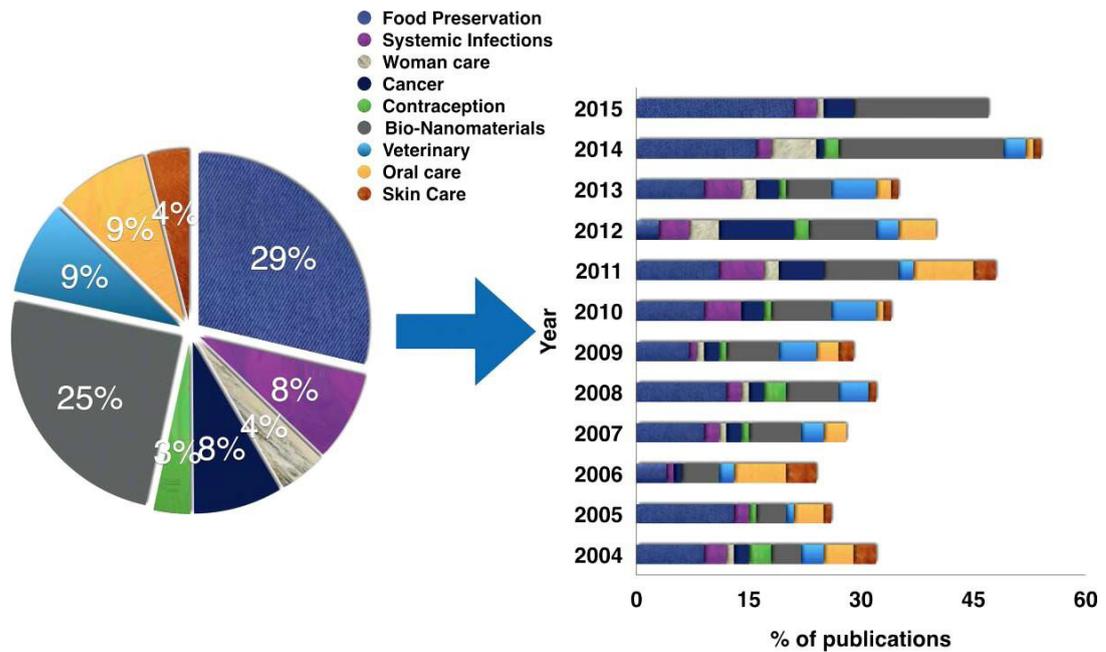
présentes dans le produit alimentaire soit conséquemment à la présence des bactéries lactiques (qui les produisent) utilisées comme cultures starter (cultures de départ), ou encore purifiées et administrées directement dans l'aliment. Cependant, pour les bactériocines des bactéries lactiques, aujourd'hui, il n'y a que la Nisine et la Pediocine PA-1 qui sont commercialement valables pour l'application alimentaire (EFSA, 2006). Plusieurs recherches au sein d'autres bactériocines sont entreprises comprenant des variantes de la Nisine qui ont présenté une efficacité croissante (Cotter *et al.*, 2005). Les études s'intéressant aux bactériocines sont en développement continu; l'antagonisme bactérien entre les cultures de bactéries probiotiques et les pathogènes d'origine alimentaire démontre que les bactériocines : Nisine, Coaguline, et Thermophiline produites par *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Bacillus coagulans* et *Streptococcus thermophilus*, respectivement sont capables d'inhiber la croissance des Clostridies producteurs de la neurotoxine botulinique (BoNT) et *Cronobacter spp.* (Kieran *et al.*, 2014).

Selon leurs caractéristiques structurales et leurs activités biologiques, trois classes de bactériocines ont été définies (Diep *et al.*, 2002) :

- ✚ Classe I : les lantibiotiques (taille < 5 KDa) : renferment dans leur séquence des acides aminés inhabituels tels que la lanthionine et la  $\beta$ -méthyllanthionine ;
- ✚ Classe II : petits peptides non lantibiotiques (taille < 10 KDa) thermorésistants;
- ✚ Classe III : protéines thermolabiles de poids moléculaire supérieur à 30 KDa.

En complément à ces trois classes, on note un quatrième groupe (la classe IV) qui renferme de petits peptides cationiques de structure cyclique (Maqueda *et al.*, 2004).

Beaucoup de pays sous-développés ont saisi l'opportunité d'initier la recherche sur l'usage des bactériocines dans la thérapie et la transformation alimentaire. Dans la décennie 2004-2015, 37% des recherches publiées sur les bactériocines s'étaient focalisées sur les applications biomédicales (Fig 2.5). Les chercheurs sont en quête de alternatives pour confronter les problèmes pathologiques tels que le cancer, les infections systémiques, respiratoires, orales, gastriques et vaginales : cependant, la conservation des aliments, les bio nanomatériaux et les usages vétérinaires ont représenté 29%, 25% et 9% respectivement (López-Cuellar *et al.*, 2016).



**Figure 2.5:** Contribution des articles publiés (%) concernant les différentes applications des bactériocines de 2004 à 2015

### 2.7.2 Mécanisme d'inhibition de la flore indésirable

Le mécanisme de la biosynthèse des bactériocines par les bactéries est généralement régulé par un système de *Quorum Sensing* qui est un mécanisme de régulation contrôlant l'expression de gènes localisés soit sur le chromosome, comme c'est le cas de la mersacidine (Altena *et al.*, 2000), soit sur un plasmide, comme c'est le cas de la sakacine A (Axelsson *et al.*, 1995), ou sur un transposon, comme c'est le cas de la Nisine (Rauch *et al.*, 1992) et de la Lacticine 481 (Dufour *et al.*, 2000). Les transposons étant des fragments linéaires d'ADN double-brin qui peuvent « sauter », avec ou sans répllication simultanée, du chromosome bactérien sur un plasmide ou d'un site sur un autre site du chromosome (Mainil, 2005).

Les bactériocines présentent des modes d'action similaires. Il se forme en effet un pore dans la membrane de la cellule cible, occasionnant une perméabilité de celle-ci et donc une dissipation de la force proton motrice, entraînant la mort cellulaire (Bauer *et al.*, 2005).

Penons l'exemple de la Nisine qui est connue de s'attacher à la membrane cellulaire par la partie C-terminale via une interaction électrostatique et puis insère sa partie N-terminale dans la phase lipidique de la bicouche lipidique ce qui entraîne un

afflux rapide des petits composés cytoplasmiques et la mort cellulaire (Milette *et al.*, 2007).

Les bactériocines sont reconnues d'être plus efficaces contre les bactéries Gram+ que les bactéries Gram-. La résistance des bactéries Gram- s'explique par la possession d'une protection externe présentée par une double paroi protectrice. De plus, les chercheurs ont trouvé que l'activité de la Nisine peut être améliorée lorsqu'elle est simultanément utilisée avec un agent détruisant la membrane externe (Belfiore *et al.*, 2007). Ghrairi & Hani, (2013) ont reporté l'amélioration de l'effet de la Nisine avec l'exposition à des agents chélateurs(EDTA), le chauffage sub-létal, le choc osmotique et la congélation, car ces traitements rendent la membrane externe des bactéries Gram- plus perméable et donc plus susceptible à la Nisine. La Nisine en combinaison avec l'EDTA démontre une activité antimicrobienne contre quelques altérants et pathogènes Gram- tels que *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium* (Martin-Visscher *et al.*, 2011). La Nisine peut être appliquée soit seule ou aussi en combinaison avec d'autres composés naturels comme conservateurs. La Nisine, par exemple, en combinaison avec la Natamycine inhibe significativement la croissance fongique (levures/champignons) dans l'huile d'olives (Hondrodimou *et al.*, 2011).

## 2.8 Les probiotiques

### 2.8.1 Définition et bienfaits

Littéralement, le terme probiotique est d'origine grecque, où : *pro* signifie en faveur de et *bios* la vie. Et par définition, « Sont considérés comme probiotiques les organismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels » (Reid, 2005; FAO/ OMS, 2002). Les probiotiques sont associés à la prévention et l'allègement des désordres intestinaux sévères comme les diarrhées associées aux antibiotiques, la maladie de l'intestin irritable, le cancer du colon, l'intolérance au lactose, les allergies aux aliments entre autres (Rijkers *et al.*, 2010 ; Alander *et al.*, 1999). Ces effets bénéfiques sont liés à un ou plusieurs mécanismes, comme la modulation du microbiote intestinal, le blocage des sites d'adhésion des pathogènes, la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte et la compétition aux nutriments (De Champs *et al.*, 2003).

Indépendamment du mécanisme, les bactéries probiotiques doivent être aptes à survivre en traversant le tractus gastro-intestinal afin de conférer des bienfaits sanitaires, ainsi pour persister en nombre suffisant dans le tube digestif pour exclure les pathogènes et interagir avec les cellules épithéliales et immunitaires de l'hôte (**Balgir *et al.*, 2013; Sathyabama *et al.*, 2012 ; Jacobsen *et al.*,1999**).

Les microorganismes probiotiques peuvent être introduits via la consommation des aliments fermentés en tant que produits fortifiants ou comme médicaments. En Europe, et à cause de l'attitude générale contre la médication, les probiotiques sont surtout pris comme composants des produits alimentaires, principalement comme des laits fermentés (**Yerlikaya, 2014**). Toutefois, plusieurs facteurs doivent être pris en considération lors de l'utilisation des probiotiques dans les produits fermentés, en particulier, leur viabilité et la présence en nombre suffisamment important au moment de la consommation (**Muller *et al.*, 2013; Vinderola *et al.*, 2011**).

Les souches les plus utilisées comme probiotiques représentent les bactéries lactiques (LAB) et les Bifidobactéries (**Sathyabama *et al.*, 2012 ; Vinderola *et al.*, 2011**). La dose effective recommandée doit être supérieure à 100 millions UFC/dose. Le nombre couramment trouvé dans des essais cliniques est au rang de 1-10 billion UFC /dose (**WGO, 2008 ; Naidu *et al.*, 2012; Reid, 2006**).

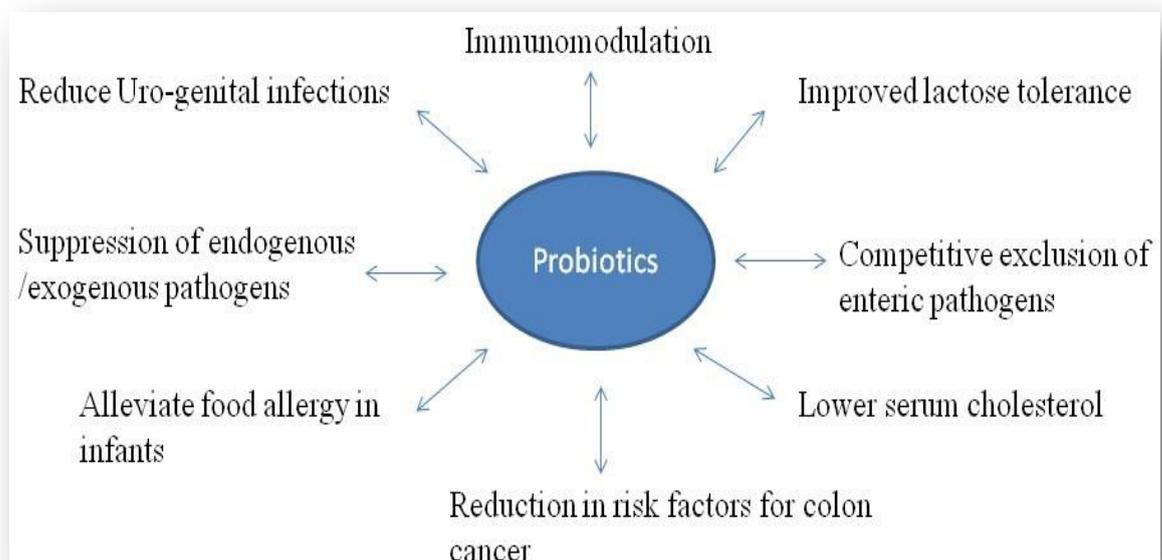
Il y a plusieurs essais souvent utilisés *in vitro* en vue de vérifier la survie dans les conditions intestinales et la persistance de la souche à potentiel probiotique en se basant sur l'exposition aux facteurs stressants gastro-intestinaux simulés (pH bas, enzymes digestives, acides biliaires) et pour vérifier sa capacité d'adhésion aux cellules épithéliales digestives cultivées ou des muqueuses isolées (**Papadimitriou *et al.*, 2015; Tuomola *et al.*, 2001**). Bien que ces tests sont importants pour une sélection préliminaire des souches à potentialité probiotique, des essais *in vivo* du probiotique sont nécessaires afin de construire une réclamation crédible sur la survie et la persistance (**De Champs *et al.*, 2003; Oozeer *et al.*, 2006**).

### 2.8.2 Une alternative prometteuse

Face aux multi-résistances des pathogènes communs à plusieurs antibiotiques traditionnels, la découverte et l'orientation concentrée vers les bactéries probiotiques est devenue une nouvelle alternative pour la gestion de diverses infections

bactériennes et fongiques (Vizioli *et al.*, 2002 ; Hancock *et al.*, 1999) ; du tractus digestif des humains et des animaux (Chou *et al.*, 1999).

On croit que les bactéries lactiques sont dominantes dans l'intestin grêle (Marco *et al.*, 2006) et sont connues de produire l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl, les bactériocines (Bhattacharya *et al.*, 2010 ; Mobaarez *et al.*, 2008) qui contribuent à la destruction des germes nuisibles *in situ*. Les bactéries lactiques sont capables d'interagir avec le système immunitaire (Ménard *et al.*, 2004 ; Martín *et al.*, 2013) et peuvent agir comme agents thérapeutiques bio dans la maladie inflammatoire des viscères (Martín *et al.*, 2013), syndrome de l'intestin irritable (Clarke *et al.*, 2012), la diarrhée du voyageur (Paredes-Paredes *et al.*, 2011), les diarrhées associées aux antibiotiques (Szajewska *et al.*, 2006), les affections entériques (Casadei *et al.*, 2009), les infections bactériennes vaginales et de la cavité orale (Dover *et al.*, 2008) et cela en plus de la propriété de réduction du cholestérol et la production de  $\beta$ -galactosidase (ICMR, 2011 ; FAO/WHO, 2002)(Fig 2.4).



**Figure 2.6** : Bienfaits sanitaires des probiotiques (Suresh K *et al.*, 2012)

Dans les dernières années, les probiotiques ont gagné encore de signification pour leurs rôles dans les soins gastro-intestinaux et immunologiques ainsi que dans l'approvisionnement du marché mondial en produits probiotiques (Vieira, 2013).

Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif des bactéries lactiques sur plusieurs types de diarrhées (Mkrtchyan *et al.*, 2010). D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique. (El-Ghaish *et al.*, 2011). Uehara *et al.* (2006) ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie.

### 2.8.3 Critères de sélection

Pour satisfaire à cette définition et assurer à la fois leur efficacité et leur innocuité pour l'hôte, les souches utilisées comme probiotiques doivent répondre à des critères fonctionnels, technologiques et de sécurité. La figure ci-après résume les caractéristiques requises.

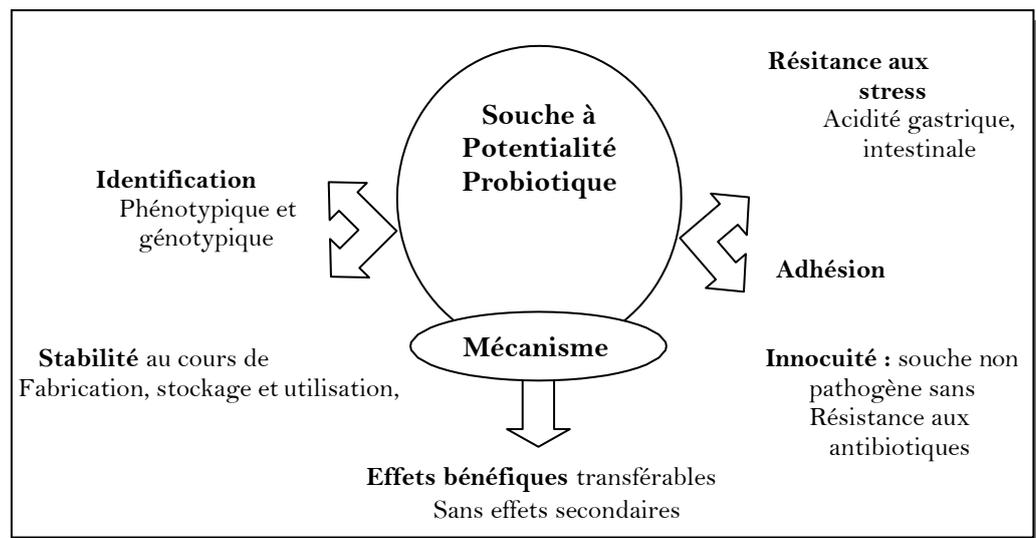


Figure 2.7: Caractéristiques des souches probiotiques (FAO/WHO, 2015)

#### 2.8.3.1 Critères sécuritaires

##### a. Identification

Il est important que l'identification taxinomique soit requise pour établir de nouvelles souches potentiellement probiotiques. Chaque souche doit être identifiée par des techniques moléculaires fiables tels que le séquençage de l'ADN codant pour

l'ARN 16S ribosomal qui est largement utilisé et confrontée à une nomenclature actualisée.. Pour la confirmation, il est recommandé que la technique d'identification moléculaire soit combinée avec des tests phénotypiques (approche polyphasique) (Sutton, 2008 ; Reid, 2005).

### **b. Origine**

Une autre information à vérifier pour la souche: elle doit être d'origine humaine pour celle destinée à l'usage humain et de préférence du même site que celui visé pour que son efficacité soit maximale (FAO/WHO, 2015).

Beaucoup d'études publiées sur les propriétés physiologiques des souches probiotiques ont considéré que celles originaires des cavités internes devraient être mieux adaptées à coloniser le tube gastro-intestinal humain et animal. Par contre, quelques souches d'origine végétale ou isolées à partir d'un produit laitier tel que *Saccharomyces cerevisiae* spp. *bouardii* et *Bifidobacterium animalis/lactis* sont, sur le plan international, reconnues pour leur statut probiotique (Andrea, 2012).

### **c. Absence d'effets négatifs**

Les souches probiotiques doivent être sûres et sans effet négatif pour la santé humaine. Pour cet effet, elles doivent subir une évaluation par des essais cliniques chez l'animal et chez l'homme afin qu'il ne soit détecté aucun des effets secondaires suivants: infections systémiques, activité métabolique nuisible, stimulation immunitaire excessive chez des individus susceptibles et transfert de gènes (par exemple de résistance aux antibiotiques) (FAO/WHO, 2015).

## **2.8.3.2 Critères fonctionnels**

### **a. Résistance à l'acidité gastrique et la bile**

Afin que leur fonctionnalité optimale soit assurée, les souches probiotiques doivent conserver leur viabilité jusqu'à atteindre le tractus intestinal; leur site d'action. Elles doivent donc résister principalement à l'environnement acide de l'estomac (pH compris entre 2,0 et 3,4) et à la bile sécrétée dans le duodénum. Le degré de tolérance à ces conditions diffère pour chaque souche (Butel, 2014 ; Sutton, 2008). A ce titre, des tests *in vitro* sont réalisés pour sélectionner les probiotiques qui maintiendront leur

intégrité cellulaire et leur activité métabolique lors du passage dans le tractus digestif humain.

### **b. Adhésion aux cellules épithéliales**

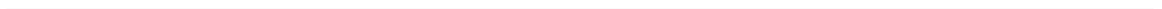
La capacité d'adhésion à la muqueuse est également une des propriétés essentielles que les souches probiotiques doivent avoir. Elle permet d'accroître le temps de rétention sur la zone d'action et met en contact étroit les bactéries et les cellules épithéliales. Ainsi, un probiotique ayant un fort pourcentage d'adhésion pourra éventuellement stimuler le système immunitaire et prévenir l'implantation de pathogènes par compétition (**Foligné, 2013 ; Sutton, 2008 ; Saarela, 2000**). Parmi l'ensemble des critères, l'aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé demeure encore délicate à évaluer notamment du fait que les modes d'action par lesquels les probiotiques exercent un rôle fonctionnel *in vivo* restent encore méconnus.

### **c. Critères technologiques**

Afin de pouvoir bénéficier de leurs propriétés, les souches retenues doivent supporter les différentes étapes de la fabrication du produit probiotique fini et retrouver leur pleine efficacité lors de leur utilisation sans contamination ni variation de leurs propriétés. Du fait que les techniques de production et les procédés de conditionnement et de conservation industrielle sont susceptibles d'altérer l'intégrité structurelle et fonctionnelle des probiotiques, leur mise en œuvre doit être basée sur un choix inoffensif et être suivi de contrôle de qualité (taux de survie et persistance d'activité) et de pureté. Il faut que la viabilité mais aussi la stabilité des probiotiques soient maintenues dans le temps (**Iaconelli, 2015 ; Perraut, 2015**).

**Partie 2.**

**Etude expérimentale**



## **Partie 2**

### **Eude expérimentale**

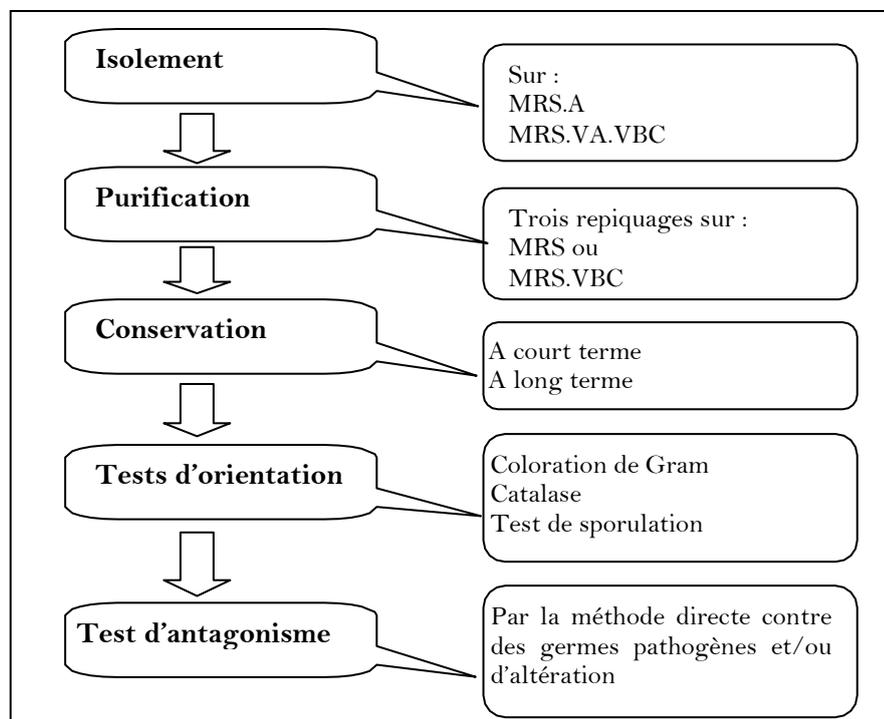
## Chapitre 3

### Matériel et méthodes

#### 3.1 Objectifs

Les objectifs à emprunter au cours de la présente étude se résument en :

- ✚ L'isolement et la purification des bactéries lactiques à partir d'un produit alimentaire traditionnel de terroir, à savoir, la viande salée et séchée, et cela en s'appuyant sur des méthodes et des milieux d'isolement qui en sont fiables.
- ✚ L'étude de l'activité antagoniste de ces isolats lactiques à l'encontre des germes pathogènes et/ou d'altération par la méthode directe dite de spot.
- ✚ L'identification au moins au rang du genre, aussi l'étude de quelques propriétés technologiques et la mise en crête de quelques potentialités probiotiques des isolats les plus performants en terme d'activité antagoniste. Les différentes étapes sur lesquelles s'articulera le travail expérimental jusqu'au test d'antagonisme sont ci-après démontrées en bref, (**Fig 3.1**).



**Figure 3.1 :** Diagramme des étapes arpentées de l'isolement au test de l'activité Antagoniste

## 3.2 Lieu de réalisation de l'étude

Cette expérimentation s'est quasiment déroulée au sein du laboratoire de la Microbiologie appliquée relevant du centre universitaire NOUR Bachir-El-Bayadh durant la période s'étalant du 17 décembre 2017 au 04 juin 2018.

## 3.3 Isolement et identification présomptive de bactéries lactiques

### 3.3.1 Matériel, milieux et réactifs

#### a. Matériel de paillasse et produits de laboratoire

- ◆ Stomacher et sachet stomacher(400 sachets) NAHITA ,700/4 ;
- ◆ Sachets de prélèvements stériles ;
- ◆ Agitateur plaque chauffante, LABTECH model : lms-1003 ;
- ◆ Réfrigérateur ENIEM 240 L;
- ◆ Etuve BINDER température nominale 70° ;
- ◆ Etuve à régulation électronique 32L, MEMERT UN30 ;
- ◆ Microscope optique binoculaire NAHITA revolver 4 positions équipées de 04 objectifs 4x, 10x, 40x et 100 ;
- ◆ Autoclave 1 WISECLAVE WAC°- 60 L ;
- ◆ Balance de précision 0.1 mg max 400 g OHAUS modèle SE402F ;
- ◆ bain marie MEMERT affichage numérique;
- ◆ Tubes à essais + cloches de durham ;
- ◆ Boîtes de pétri en matière plastique ;
- ◆ Compteur de colonie SCHÜTT® ;
- ◆ Dessiccateur en verre ambré ;
- ◆ Anse de platine ; fil à boucle et fil droit;
- ◆ Pince en bois ;
- ◆ Pipette en verre de 1, de 20 ml ;
- ◆ Pipette Pasteur ;
- ◆ Bec Bunsen (diamètre 13 mm) ;
- ◆ Bac de coloration ;
- ◆ PH-mètre de paillasse OHAUS;
- ◆ Burette avec statif ;
- ◆ Portoir métallique à tubes à essai ;
- ◆ Papier collant ; Papier filtre ; Papier hygiénique ;
- ◆ Ciseaux ;
- ◆ Bistouris stériles ;
- ◆ Pince stérile ;
- ◆ Spatule ;
- ◆ Coton cardé ;
- ◆ Parafilm ;
- ◆ Marqueur noir permanent;
- ◆ Appareil photo numérique.

**b. Milieux**◆ **Bouillon TSE (Tryptone Sel Eau):**

Formule par litre :

Tryptone	1 g
Na Cl	8.5 g

**Préparation du milieu :** additionner les ingrédients à l'eau distillée dans un volume de 1 litre, agiter avec chauffage, distribuer dans des tubes à essais et autoclaver 15 min à 15 psi (121 °C). Le pH du milieu est ajusté à  $7.5 \pm 0.2$  à 25 °C.

◆ **Bouillon MRS (*De Man., Rogosa & Sharpe, 1960*)**

Formule par litre :

Peptone	10 g
Extrait de viande	8.5 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Acétate de sodium	5 g
Tween-80	1 ml
Citrate d'ammonium	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 g
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	

**Préparation du milieu :** additionner les ingrédients à l'eau distillée dans un volume de 1 litre, agiter avec chauffage, distribuer dans des tubes à essais et autoclaver 15 min à 15 psi (121 °C). Le pH du milieu est ajusté à 6 à 25 °C.

◆ **Bouillon MRS (Fluka®)**

**Préparation du milieu :** dissoudre 52.25 g dans un volume de 1 litre d'eau distillée, agiter avec chauffage jusqu'à l'ébullition, distribuer dans des tubes à essais et autoclaver 15 min à 15 psi (121 °C). Le pH du milieu est ajusté à 6 à 25 °C.

◆ **Gélose MRS**

Préparée à partir du bouillon MRS (Fluka®), additionnée de 15.0 g/L d'agar.

◆ **Lait écrémé 40 %.**

**Préparation:** additionner le lait écrémé anhydre (40 %) à l'eau distillée (60 %) (w/w). Agiter avec chauffage jusqu'à la parfaite homogénéisation, mettre dans un flacon en verre ou distribuer dans des tubes à essais et autoclaver 15 min à 15 psi (121 °C).

◆ **Gélose MRS-A**

Gélose MRS acidifié à pH 5.2 par l'acide chlorhydrique (HCl solution à 1M).

◆ **Gélose MRS-VA-VBC**

Gélose MRS supplémenté de 25 mg/L de vert de Bromocrésol et de 25 mg/L de vancomycine.

◆ **Soude solution 1 N**

Formule par litre	
Na OH	40 g
Eau distillée	1 L

**Préparation de la solution :** dissoudre 40 g de la soude caustique dans 1 litre de l'eau distillée.

◆ **Solution de Phénolphtaléine**

**Préparation de la solution :** dissoudre 1 g de la Phénolphtaléine anhydre dans un volume de 60 ml de l'éthanol à 95° et compléter à 1 L avec de l'eau distillée.

**c. Réactifs**

- ◆ Vert de Bromocrésol ;
- ◆ Vancomycine anhydre en flacon de 1g ;
- ◆ Huile à immersion ;
- ◆ Ethanol à 95° ;
- ◆ Solution tampon phosphate, pH 7.01 ;
- ◆ Eau oxygéné à 10 % (10 V) ;
- ◆ L'huile de paraffine ;
- ◆ Glycérol entier ;
- ◆ La gélose blanche ;

**Préparation:** additionner 15 g de l'agar agar bactériologique à 1 L de l'eau distillée, agiter avec chauffage jusqu'à atteindre l'ébullition, distribuer dans des tubes à essais et autoclaver 15 min à 15 psi (121 °C).

- ◆ Violet de gentiane ;
- ◆ Lugol ;
- ◆ Fuschine de Ziehl.

Formule pour 10 ml	
Fuschine basique	0.1 g
Éthanol à 95°	1 ml
Phénol	0.5 g

**Préparation du réactif :** additionner les ingrédients à l'eau distillée ensuite filtrer et diluer avant l'utilisation au 1/15<sup>ième</sup> (Guiraud, 1980).

### 3.3.2 Collecte des échantillons

La viande salée et séchée (*Khliia*) a fait l'objet de cette étude comme matériel biologique. Pour se faire, cinq (5) échantillons préparés à base de la viande ovine ont été collectés et réceptionnés de différents points géographiques et codés : K1, K2, K3, K4 et K5 (Tab 3.1).

**Tableau 3.1** : Codification, origines et âge des échantillons de *Khliia*

Échantillon	Provenance	Age approximatif
K1	Adrar	8 mois
K2	Adrar	8 mois
K3	Bougtob	3 mois
K4	ElkafLahmar	6 mois
K5	ElkafLahmar	6 mois

### 3.3.3 Isolements des bactéries lactiques

Dans les conditions d'asepsie, et dès leur avènement au laboratoire, les échantillons de *Khliia* ont subi une préparation en vue de leur analyse; 10 g de chaque échantillon ont été pesés et découpés en petits morceaux à l'aide de lame bistouri et en se servant d'une pince métallique stérile, puis aseptiquement introduits dans des sachets Stomacher stériles avec 90 ml de diluant TSE et digérés par le Stomacher pendant 1 min en deux à trois reprises selon la convenance. Et dès lors, les dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  ont été réalisées à partir de l'homogénéisât dans le même diluant (Mekriet *al.*, 2015), signalant que l'étape de préparation des dilutions était précédée par un préenrichissement par incubation des prises d'essai (dilutions mères) 24 h à 37 °C en guise d'amplifier la microfaune cible de la recherche (Najjari *et al.*, 2007 ; Schillinger *et al.*, 2003).

Par la suite, 0.1 ml de chacune des dilutions :  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  est inoculé par étalement en surface (annexe.3) et en double série, à la fois sur la gélose MRS acidifiée au pH 5.2 (MRS-A)(Khalisanni *et al.*, 2012) et sur la gélose MRS à la vancomycine et au vert de Bromocrésol (MRS-VA-VBC)(Dal Bello *et al.*, 2006 ; Hartemink *et al.*, 1997). Ce dernier comme milieu électif pour *Lactobacillus spp.* et les *Leuconostocs spp.* L'incubation est réalisée dans les conditions d'anaérobiose partielle (microaérobie) assurées par la méthode classique à la bougie en se servant d'un dessiccateur (Guiraud, 1980). Les colonies typiques de bactéries lactiques isolées ont

fait l'objet d'une purification par trois repiquages successifs sur milieu MRS suivant la technique d'épuisement et dans les mêmes conditions de culture (Mekri *et al.*, 2015).

### 3.3.4 Conservation des isolats

Une conservation a été réalisée afin de maintenir les microorganismes disponibles, à l'identique, viables et en plein propriétés physiologiques. Elle est de court et de long terme.

#### 3.3.4.1 Conservation à court terme

Pour un usage journalier ou hebdomadaire, le maintien des souches pures à court terme a été effectué sur gélose MRS solide inclinée suivi d'une incubation à 30 °C pendant 16 h (culture jeune). Des cultures tellement obtenues sont à conserver à une température de +4 °C à renouveler toutes les quatre semaines (Merzouk *et al.*, 2013 ; Kanza *et al.*, 2012 ; Badis *et al.*, 2005).

#### 3.3.4.2 Conservation à long terme

Pour une conservation à long terme, les souches sont conservées à -20 °C dans du lait écrémé (70 %) additionné de glycérol (30 %) (v/v) (Merzouk *et al.*, 2013; Kanza *et al.*, 2012 ; Badis *et al.*, 2005). Pour se faire, et afin de conserver les cellules en plein propriétés physiologiques, une culture de la veille est centrifugée 10 min à 6000 rpm, le culot est retenu et additionné avec un mélange du lait écrémé à 40 % et de glycérol, dans le rapport (70%) conjugué à (30 %) v/v, respectivement.

### 3.3.5 Identification préliminaire des bactéries lactiques

Une fois purifiés, les isolats obtenus font l'objet d'une identification au niveau du genre selon leurs caractéristiques morphologiques (macroscopiques et microscopiques), physiologiques, ainsi que certaines propriétés biochimiques qu'ils vont exprimer (Stiles & Holzapfel, 1997).

Cette identification préliminaire fait référence à la coloration de Gram, la recherche de l'enzyme catalase, et d'éventuelle production des spores (Mekri *et al.*, 2015) ; trois tests d'orientation à entreprendre avant l'évaluation de l'activité antagoniste, pour que l'identification se poursuive que pour les isolats les plus performants.

### 3.3.5.1 Examen macroscopique

Les isolats de bactéries lactiques purifiés ont été décrits par examen macroscopique de leurs colonies à l'œil nu : forme, taille, couleur, et aspect des colonies, ont été prélevés (Najjari A et al., 2007).

### 3.3.5.2 Tests d'orientation

#### a. Test catalase

Pour mettre en évidence l'activité catalasique de ces isolats, un petit volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10 % a été directement introduit dans un tube contenant l'inoculum bactérien (une culture jeune en suspension). Un dégagement de bulles de gaz témoigne la présence de l'enzyme catalase qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène en libérant ainsi de l'oxygène (Hart, 1997 ; Larpent-Gourgaud *et al.*, 1997).

#### b. Examen microscopique après fixation (coloration de *Gram*)

La technique de Gram a été réalisée selon la procédure conventionnelle (Chaskes, 2009) et les lames destinées à l'observation sous microscope optique ont été préparées pour chaque isolat de la manière suivante :

- ◆ Une suspension bactérienne a été étalée sur d'environ 2 cm<sup>2</sup> de la lame;
- ◆ Fixation de la suspension par passage au-dessus de la flamme du bec Bunsen ; pendant une minute ;
- ◆ Inondation du frottis par le violet de gentiane (1 min) ;
- ◆ Lavage avec de l'eau ;
- ◆ Addition du lugol (1 min) ;
- ◆ Lavage avec de l'eau ;
- ◆ Décoloration pendant 15 secondes avec de l'éthanol à 95° ;
- ◆ Inondation par la fuschine de Ziehl diluée au 15ème pendant (1mn) ;
- ◆ Lavage avec de l'eau ;
- ◆ Séchage, examen au grossissement x100 avec immersion de l'objectif.

L'observation microscopique fait constat soit à des bactéries Gram positif de couleur bleu pourpre ou encore à des bactéries Gram négatif qui se colorent en rose.

#### c. Test de sporulation

Le test de sporulation des isolats a été réalisé sur gélose MRS en anaérobiose partielle après pasteurisation des suspensions bactériennes durant 10 min à 80 °C dans un bain marie (Guiraud, 1980). Les bactéries asporogènes donnent des cultures négatives au terme de l'incubation (30 °C pendant 24 h).

### 3.4 Test d'antagonisme et sélection des bactéries lactiques à potentiel inhibiteur élevé

#### 3.4.1 Matériel, milieux et réactifs

##### a. Matériel

- ◆ Réfrigérateur ENIEM 240 L ;
- ◆ Congélateur, LIEBHERR capacité 217 L;
- ◆ Spectrophotomètre SPECTRONIC© 1201 + cuvette en quartz ;
- ◆ Centrifugeuse, NAHITA 2660 capacité 12x15 ml, 6000 t/m angle 45° ;
- ◆ Compteur de colonie, fichier scientifique ;
- ◆ Micropipette 10-100 µl + embouts stériles ;
- ◆ Boîtes de pétri en matière plastique ;
- ◆ Bocaux ;
- ◆ Cryotubes avec caps à vis ;
- ◆ Anse à fil droit ;
- ◆ Vortex IKA® LABORTECHNIK ;
- ◆ Règle millimétrique ;
- ◆ Appareil photo numérique.

##### b. Milieux

##### ◆ Gélose nutritive GN

**Préparation du milieu :** Le milieu est préparé à partir du bouillon nutritif Merck© (8 g/L), mélangé d'agar (15.0g/L). Additionner les ingrédients à l'eau distillée dans un volume de 1 litre, agiter ensuite avec chauffage et distribuer dans des tubes à essai. Enfin autoclaver 15 min à 15 psi (121 °C). Le pH du milieu est ajusté à  $7.0 \pm 0.2$  à 25 °C.

##### ◆ Solution tampon phosphate, pH 7.02, 0.1 M

**Préparation de la solution :**

Solution (A) à 0.1 M :	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.44 g
Eau distillée	195 ml
Solution (B) à 0.1 M:	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.44 g
Eau distillée	305 ml

Les deux solutions (A) et (B) sont mélangées dans le rapport 19.5 parts et 30.5 parts dans un total de 100 parts, homogénéisées par agitation puis le volume est complété à un litre.

◆ **Solution standard de sulfate de barium BaSO<sub>4</sub> "0.5 McFarland "  
(Roe-Carpenter, 2007)**

**Préparation de la solution :**

Solution (A) : BaCl <sub>2</sub> à 0.048 mol/ L :	
BaCl <sub>2</sub>	1.1 75 g
Eau distillée	100 ml
Solution (B) : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 0.18 mol/L :	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
Eau distillée	100 ml

0.5 ml de la solution A est ajouté à 99.5 ml de la solution B, l'agitation est utilisée pour le maintien d'une suspension homogène.

◆ **Milieu différentiel ADH au BCP**

Formule par litre :	
extrait de levure	3 g
NaCl	5 g
Glucose	1 g
Arginine	5 g
BCP	0.17 g

Etant donné que pour la recherche de l'ADH, la même formule avec la soustraction de l'arginine sert de témoin négatif.

◆ **Solution de sucres**

**Préparation de solution à 10 % :** dissoudre 0.5 g de chaque sucre D (+) glucose, D (+) maltose, D (+) galactose, saccharose, D mannitol, L rhamnose, D (+) lactose, arabinose, D fructose, raffinose, D xylose, sorbitol dans 5 ml d'eau distillée stérile, autoclaver à 118 °C pendant 10 min.

◆ **Gélose uréase**

Formule par litre :	
Peptone	1 g
Na Cl	5 g
Mono potassium phosphate	2 g
Glucose	1 g
Urée	20 g
Agar	15 g
Vert de bromocrésol	0.025

**Préparation du milieu :** additionner les ingrédients à l'eau distillée dans un volume de 1 litre, agiter avec chauffage, distribuer dans des tubes à essais et autoclaver 15 min à 15 psi soit 121 °C. Le milieu est ajusté à pH 6.8 ± 0.2 à 25 °C.

- ◆ **Bouillon TSE** (*cf.* isolement et identification, milieux).

### c. Réactifs

- ◆ Huile de vaseline stérile ;
- ◆ Bromocrésol pourpre (BCP).
- ◆ Glycérol ;
- ◆ Réactifs de révélation des tests biochimiques :
- ◆ VPI et VPII ;

### 3.4.2 Souches bactériennes

Pour détecter une activité antagoniste de isolats obtenus, un matériel bactérien comprenant 6 souches de référence indicatrices mentionnées C1, C2, C3, C4, C5 et C6 a été utilisé, ces bactéries indicatrices représentent des germes pathogènes et/ou d'altération le plus souvent associés à la viande et aux produits à base de viande. La référence et la codification de ces souches sont démontrées, pour chacune (**Tabl 2.2**).

**Tableau 3.2 :** Bactéries indicatrices candidates à l'épreuve d'antagonisme

Souches indicatrices	Référence	Codification
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	C1
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	C2
<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC 19119	C3
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	C4
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300	C5
<i>Staphylococcus sp.</i>	-	C6

Ces souches ont été, en premier lieu, sujettes d'une régénération dans du TSB à 37 C° pendant 24 h, repiquées ensuite à la même température sur boîtes contenant de la gélose nutritive, et enfin maintenues sur gélose nutritive inclinée à une température de +4 C° pour un usage à court terme. En vue de contrôler leur pureté, ces souches ont été mises à l'épreuve afin de confirmer l'identité par la coloration de Gram et du test catalase.

### 3.4.3 Evaluation de l'activité antibactérienne

Le point d'aboutissement de cette étape est la sélection d'isolats bactériens prouvant une action inhibitrice sur la croissance des souches pathogènes et/ou d'altération figurant sur le tableau précédent. Les candidats bactériens sont soumis à ce screening en utilisant la méthode directe (*spot agar test*) ; dont le principe est d'ensemencer simultanément les cultures jeunes des deux candidats permettant ainsi contact cellulaire directe sur le même milieu de culture et sous les mêmes conditions

d'incubation. Pour exclure l'inhibition due à l'abaissement du pH par la production des acides organiques (l'acide lactique notamment), le même test a été refait en utilisant pour scène d'interaction la gélose MRS tamponnée préparée dans une solution tampon phosphate pH 7.02. La lecture se fait de la même manière, et la constatation d'un effet inhibiteur cette fois-ci laisse prétendre l'existence d'autres facteurs inhibiteurs hors l'effet acide et dont le plus probable est la production des bactériocines ; substances de nature protéique à action antibactérienne. A l'issue de ce test, un screening dit secondaire a été réalisé par la technique de puits (*well diffusion assay*), qui repose sur une interaction entre le métabolite supposé être inhibiteur et les germes ciblent, toujours, sur gélose MRS tamponné et non tamponné. La lecture des résultats a été faite comme précédant et les cultures ont été dans les mêmes conditions incubation.

#### 3.4.3.1 Spot agar test (détection directe)

Ce screening est orienté à vérifier la présence d'une action antagoniste putative des souches de bactéries lactiques isolées, inspiré du protocole décrit par **Fleming, (1975) & Schillinger, (1989)**.

Après avoir reçu un volume de 12 ml de gélose MRS, des boîtes de pétri sont recouvertes de 0.1 ml de la suspension bactérienne de culture indicatrice (6 pour chaque isolat à tester) dont la charge microbienne est préalablement ajustée à une longueur d'onde de l'ordre de 450 nm se trouvant dans l'intervalle de densité optique égale à 0.08 - 0.1 qui correspond à une concentration cellulaire de 1 à  $2 \times 10^8$  UFC (**Domínguez, 2001**). Les précultures des bactéries indicatrices (C1, C2, C3, C4, C5, C6) ont été préparées par ensemencement dans du TSB à une température optimale de 37 °C pendant 24 h. La standardisation a été faite selon le principe de la dilution en utilisant du TSE comme diluant.

Après une incubation à 30 °C pendant 48 h, les candidats bactériens test ont été ensemencés à l'aide d'une anse de platine par touche (spot) sur la surface pré inondée de sorte que chaque boîte de pétri reçoit 7 isolats test dans un espacement approximatif de 3 cm (**annexe.4**). Le site d'inoculation en spot est préalablement marqué par l'empreinte de l'anse (fil enlevé) surchauffée dans la flamme du bec. L'incubation a été faite dans des conditions de microaérophilie à 30 °C pendant 24 h.

Pour l'interprétation des résultats, les boîtes sont placées couvercles en bas sur le compteur de colonies muni d'un système d'éclairage, l'activité antagoniste de l'isolat envers les souches indicatrices est exprimée par la présence d'une zone claire (halo transparent) autour des spots correspondants et dont les diamètres ont été mesurés par une règle millimétrique.

#### 3.4.3.2 Exclusion de l'inhibition par l'abaissement du pH

La possibilité des inhibitions des souches indicatrices par l'abaissement du pH consécutif à la production d'acides organiques (l'acide lactique notamment et l'acide acétique) est levée par réaliser le test sur milieu MRS tamponné à pH 7.02 à l'aide de tampon phosphate ( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ) (Mami, 2012) et cela conformément à la méthode directe de Fleming, (1975) fraîchement élucidée.

#### 3.4.3.3 Diffusion en puits sur gélose (détection indirecte)

Les dix-neuf (19) isolats jugés être les plus performants dans le screening primaire ont été retenus pour cette étape (*well-diffusio assay*). Ils ont fait l'objet d'une culture de 24 h à 37°C sur bouillon MRS. Les cultures jeunes ont été centrifugées à 6000 rpm pendant 20 min (Jones, 2008). Pour exclure toute forme de vie, les surnageants ainsi obtenus font l'objet d'un traitement thermique de 10 min à 80°C dans un bain marie l'élimination des formes végétatives (Harris, 1989) suivi d'un refroidissement brusque à +4 °C. L'activité antibactérienne de ces surnageants est ensuite évaluée envers les mêmes six souches indicatrices (Tab 3.2) par la méthode de diffusion en puits (Schillinger, 1989) légèrement modifiée :

Dix (10) ml de gélose TSA à 1.5 % Agar sont coulés dans des boîtes de pétri et laissées se solidifier à la température ambiante. Après solidification, 10 ml de la gélose TSA à 0.75 % Agarensemencés avec 0.2 ml de culture indicatrice (avec une charge bactérienne ajustée à une densité optique comparable à celle du standard 0.5 Mc Farland) ont été coulés en superposition à la gélose précédente. Une courte incubation à température ambiante (environ 20 °C) facilitera par la suite la confection des puits (Ayr-Hartinag, 1972). Sept puits de 7 mm de diamètre par boîte ont été pratiqués à l'aide de l'extrémité ouverte de la pipette Pasteur stérilisée dans un espacement de 3 cm environ. Ainsi, le puits reçoit un volume de 50 microlitres de surnageant pour être rempli. Le septième puits au centre témoin est rempli de 50 µL de bouillon MRS pour servir de témoin.

Une fois préparées, les boîtes sont entreposées pendant 2 h à 20 °C pour que le surnageant puisse se pré diffuser, puis incubées à 30 °C pendant 24 h dans des conditions d'anaérobiose. L'observation, au terme de l'incubation, consiste à la constatation des halos d'inhibition de la même manière que dans le screening primaire.

La zone d'inhibition à la périphérie des puits suggère une activité antibactérienne due à la production d'éléments antimicrobiens et cette fois-ci le test est en qualité de confirmation de l'activité antagoniste de façon indirecte (les éventuels métabolites en absence des cellules). L'expérience a été réalisée simultanément sur milieu tamponné et milieu non tamponné et a été répétée maintes fois.

#### **3.4.4 Identification phénotypique et biochimique des isolats à potentiel inhibiteur élevé**

##### **3441 Production de CO<sub>2</sub> à partir du glucose**

Durant leur croissance, les bactéries lactiques dégradent les sucres existants dans leur milieu de culture en empruntant soit une voie homofermentaire en produisant que l'acide lactique, soit une voie hétérofermentaire en produisant de l'acide lactique et aussi en plus de l'éthanol, de l'acétate, et du CO<sub>2</sub> (**De Rossart & Luquet, 1994**).

Pour se faire, le milieu MRS préalablement fondu, refroidi et solidifié a été ensemencé par les cultures bactériennes par piqûre centrale, puis un bouchon de 1 ml de la gélose blanche stérile a été coulé en surface. L'incubation est faite à 37 °C pendant 7 jours. Le développement d'une bactériehomolactique ne provoque pas de discontinuité entre le milieu et le bouchon de la gélose blanche. Le gaz produit par un métabolisme hétérofermentaire pousse, au contraire, le bouchon de gélose vers le haut du tube (**Larpent, 1997**).

##### **3442 Croissance à différentes températures**

L'habilité à croître à différentes températures a été testée sur milieu MRS liquide dont le pH a été ajusté à 6.39 à 25 °C avant l'autoclavage. Pour chaque isolat trois tubes à essai ont été ensemencés à partir de cultures jeunes. Chaque tube à essai a été incubé à une température différente des deux autres tubes : le premier à 10 °C pendant 7 à 10 jours. Le deuxième et le troisième à 15 °C et à 45 °C pendant 3 à 5 jours (**Schillinger, 1987**).

### 3443 Test de tolérance à NaCl

L'habilité à croître cette fois-ci à différentes concentrations en Na Cl a été testée sur milieu MRS solide en adoptant la méthode d'ensemencement par des gouttes (Hossein Naghili et al., 2013). A partir d'une culture de 18 h des LAB. Le volume de l'inoculum est de 10 µl avec des concentrations en NaCl de 6.5 et 10 %, en ajustant le pH à 6.38 à 25 °C avant l'autoclavage. L'incubation s'est faite à 30 °C pendant 2 à 3 jours (Schillinger, 1987).

### 3444 Croissance à différents pH

La croissance à différentes valeurs de pH a été testée sur milieu MRS solide par la méthode des gouttes (Hossein Naghili et al., 2013). pH est ajusté aux valeurs : 3.9, 4.4, et à 9.6. Après ensemencement à partir d'une culture jeune de 18 h les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 2 à 3 jours (Schillinger, 1987).

### 3445 Tests biochimiques divers

#### a. Recherche de l'Arginine DiHydrolase (ADH)

L'arginine dihydrolase est l'enzyme responsable de la dégradation de l'arginine en ornithine. La recherche de cette enzyme repose sur la modification du pH notée par le virage de l'indicateur de pH dans le milieu. Un tube contenant 3 ml de milieu différentiel ADH au BCP était additionné de 5 g/l d'arginine. Le tube témoin contenait le milieu de base sans arginine. Les deux tubes étaient ensemencés par la même culture et incubés à 30 °C pendant 24 à 48 h. La croissance des bactéries dans le milieu de base se manifeste par une acidification et un virage du violet au jaune de l'indicateur de pH dû au métabolisme du glucose. La dégradation de l'arginine et la libération de l'amine dans le deuxième tube entraînent une alcalinisation et le retour à la couleur primaire du milieu (le violet). Donc la persistance de la coloration violette implique une activité ADH positive (Belkheir, 2017).

#### b. Uréase

Ce test a été réalisé sur gélose uréase solide inclinée ensemencée par stries serrées puis incubée à 30 °C pendant 3 jours. Le virage de la couleur indique la décomposition de l'urée (Forouhandeh, 2010 ; Guiraud, 1980).

## 3446 Profil de fermentation des sucres

Le profil fermentatif des douze (12) sucres a été réalisé en se basant sur la technique employée par **Guessas & Kihel, (2004)** en gardant le principe reposant sur l'utilisation de milieu liquide, et dont les solutions des sucres préparées à part (solution à 10 %) sont ajoutées aseptiquement au milieu de culture pour obtenir une concentration finale (solution à 2 %). L'anaérobiose est assurée par l'ajout d'huile minérale stérile. L'incubation est à 30 °C pendant 48 h. Un virage de coloration de milieu au jaune indique la fermentation du sucre. Pour faciliter l'exécution de ce test, une sorte de galerie est réalisée en miniaturisant les volumes des milieux de culture sur une matrice de la gélose blanche simulant les microplaques comme suit : une boîte de Pétri reçoit 30 ml de la gélose blanche à 1.7 % d'agar agar. Ensuite des puits au nombre des sucres sont confectionnés de façon équilibrée dans la gélose à l'aide de l'extrémité cylindrique de la pipette Pasteur stérile puis remplis à ras d'environ 150 µl par le milieu de culture ADH-BCP base (sans arginine ni glucose). Enfin, chaque puits est additionné de l'une des solutions des sucres (à 2 %), un volume d'environ 5 µl, et les puits de chaque boîte furentensemencés par une anse à partir de la culture jeune de chaque isolat (une boîte par isolat). L'opération est achevée par recouvrir les puits par une ou deux gouttes de l'huile de vaseline stérile avant l'incubation. La fermentation du sucre s'accompagne de l'acidification du milieu et, en présence de l'indicateur coloré, elle se traduit par une coloration jaune dans et autour du puits. Il est lieu de signaler que la durée d'incubation est abrégée à 18 h au maximum en raison de la miniaturisation des milieux de culture et pour que les résultats ne s'interfèrent par l'ultime contiguïté et en soient plus perceptibles.

### 3.5 Etude de quelques propriétés technologiques et critères probiotiques

#### 3.5.1 Propriétés technologiques

Dans la fabrication des aliments, et en plus du goût acidulé qu'elles confèrent au produit, les LAB sont utilisées comme agents aromatisants et texturants. Elles produisent plusieurs composants tels que les exopolysaccharides (EPS), l'acétate, l'éthanol, le diacétyl et acétaldéhyde qui peuvent améliorer la texture, l'arôme et la saveur des produits alimentaires fermentés. Elles exercent souvent des activités protéolytiques et lipolytiques, et produisent des composants aromatiques à partir des acides aminés (**Ho et al., 2007; Cholet, 2006 ; Gerrit et al., 2005; Bourgeois & Larpent , 1996** ).

### 3.5.1.1 Pouvoir protéolytique

Pour déterminer l'activité protéolytique des bactéries lactiques, et selon la méthode de **Veuillemard, (1986)** légèrement modifiée. La gélose MRS additionnée de lait écrémé à 10 % a été coulée, solidifiée et séchée puis des spots en nombre de 7 par biote ont été déposés en surface de la gélose. Les spots sont appliqués par l'anse à partir des colonies jeunes. Après une incubation à 37 °C pendant 24 h, la protéolyse est révélée par des zones claires autour des spots.

### 3.5.1.2 Pouvoir lipolytique

L'activité est recherchée sur milieu MRS solide tamponné à pH 7.02 (tampon phosphate) additionné à 1 % et à 3 % de tween 80 comme unique source lipidique. Après la solidification du milieu, les souches lactiques sontensemencées par touches en nombre de 7 par biote à partir des cultures de 18 h. Après une incubation à 30 °C pendant 7 jours, une activité lipolytique se traduit par l'apparition d'un halo opaque autour de la colonie (**Guiraud & Galzy, 1980**).

### 3.5.1.3 Production des exopolysaccharides (EPS)

La production des EPS est recherchée pour sa contribution à l'augmentation de la viscosité et la fermeté, l'amélioration de la texture et la réduction de la sensibilité à la synérèse. Les souches à tester ont étéensemencées en stries sur gélose hypersaccharosée déjà coulée et solidifiée, chaque boîte avec trois secteurs a reçu trois cultures. Après incubation à 37 °C pendant 24 h, la production des exopolysaccharides se manifeste par l'apparition de colonies larges et gluantes (**Leveau *et al.*, 1991**).

### 3.5.1.4 Production d'acétoïne

Pour la réalisation de ce test, tubes contenant du lait écrémé stérile (à 9 %) ont étéensemencés chacun par une culture à tester. Après une incubation pendant 24 h à 37 °C et la vérification de la coagulation, des gouttes des deux réactifs de Vogues Proskauer VPI et VPII ont été ajoutés à chaque tube positif, suivi d'une agitation intense. Après un délai de 10 minutes, une coloration rose traduit la formation d'acétylméthylcarbinol. Cette substance se transforme en acétoïne sous l'action de la soude (VPII) et se combine avec l'a-naphtol (VPI) en donnant un complexe rouge.

### 3.5.2 Critères probiotiques

Les souches probiotiques doivent avoir certaines caractéristiques pour d'une part, atteindre leur site d'action, en général l'intestin et, d'autre part, agir au profit de l'hôte. Les épreuves requises à être surmontées dans un cadre expérimental *in vitro* sont la survie dans les conditions gastriques et intestinales simulées.

#### 3.5.2.1 Résistance aux conditions gastriques simulées

Un jus gastrique simulé a été préparé *in vitro* par la suspension de 3 mg/ml de la pepsine dans de l'eau physiologique (0.85 % NaCl, m/v) et l'ajustement de pH à 3.0 par une solution HCl 1.0 M. 1 ml des cultures jeunes de 24 h des souches lactiques a subi une centrifugation pour 10 min suivie de deux lavages par de l'eau physiologique afin d'éliminer les traces du milieu de culture. Le culot ainsi obtenu a été ensuite suspendu dans le jus gastrique simulé. La résistance aux conditions gastriques est évaluée par numération des cellules viables sur MRS solide au terme de deux heures (2 h) d'incubation à 42 °C (Musikasang *et al.*, 2012).

#### 3.5.2.2 Résistance aux sels biliaries

Un bouillon MRS supplémenté de 0.3 % de sels biliaries (*Bovine bile salt*, Sigma) est inoculé de 1 % d'une culture d'une nuit des bactéries lactiques et incubé à 37 °C pour 24 h. Au terme de ce challenge, les cellules sont ensemencées sur la gélose MRS et la viabilité est déterminée au bout de 48 h d'incubation à 30 °C (Atte, 2016).

## Chapitre 4

### Résultats

#### 4.1 Résultats de l'isolement des bactéries lactiques sur milieu MRS

##### 4.1.1 Collecte des échantillons et isolement

L'isolement des bactéries des cinq échantillons sur les milieux gélosés MRS-A et le MRS-VA-VBC a donné des colonies bactériennes de différentes caractéristiques morphologiques (**Fig 4.1**) et parmi lesquelles 50 isolats, qui ont été numérotés de 1 à 50, ont fait l'objet d'une purification sur gélose MRS par trois repiquages successifs. Ces isolats ont été choisis au hasard à l'ordre de moyennement dix colonies de toutes les deux boîtes issues des deux dilutions du même échantillon. Par la même occasion, un dénombrement des bactéries lactique (LAB) était entrete nu et les charges étaient proches des  $10^6$ , où celle de la dilution  $10^{-4}$  était de  $2.5 \cdot 10^6$  qui est la charge en unité formant colonie (UFC/g) la plus importante qu'a représentée l'échantillon K1. Il est lieu de signaler qu'aucune colonie bactérienne n'a été détectée pour l'échantillon K 5 sur les milieux d'isolement, tous deux (**Tab 4.1**).

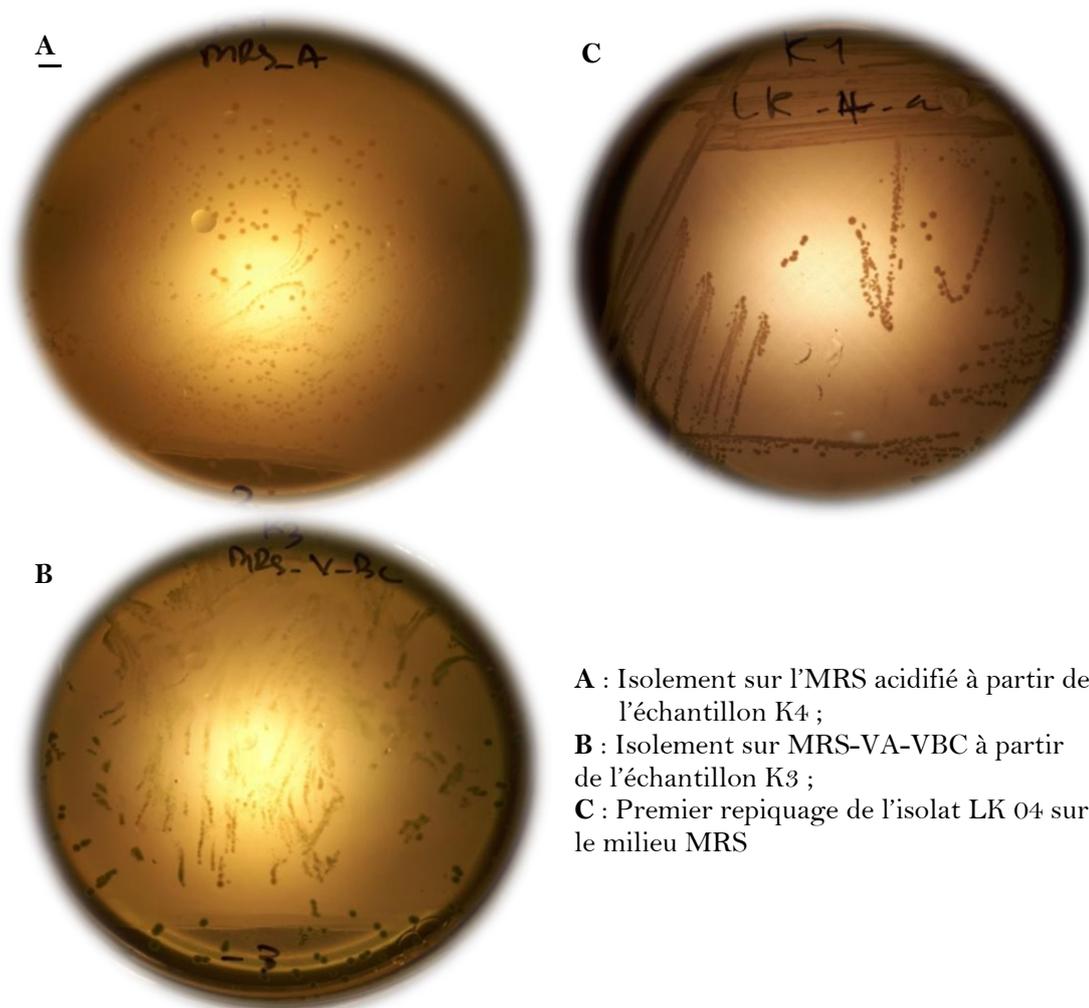
**Tableau 4.1** : Dénombrement des bactéries lactiques

Échantillons	K 1	K 2	K 3	K 4	K 5
UFC/g	$2.5 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$1.3 \cdot 10^6$	$1.8 \cdot 10^6$	-

#### 4.1.2 Résultats de l'identification présomptive des bactéries lactiques

##### 4.1.2.1 Examen macroscopique

Les colonies bactériennes ont exhibé différentes tailles, formes, sur le MRS-A, il s'agissait des colonies de petite taille, ponctiformes, crémeuses, lisses, à contours réguliers, et concernant celles isolées sur le MRS-VA-VBC. Elles ont présenté une gamme de rapport entre le vert et le blanc variant entre le clair et le foncé (colonies claires avec centre vert, larges grises avec centre vert, grises foncées, vertes foncées). Sont représentées ci-joint les caractéristiques macroscopiques constatables des isolats, chacun sur son milieu d'isolement ou lors du repiquage sur l'MRS gélosé (**Tab 4.2**).



**A** : Isolement sur l'MRS acidifié à partir de l'échantillon K4 ;  
**B** : Isolement sur MRS-VA-VBC à partir de l'échantillon K3 ;  
**C** : Premier repiquage de l'isolat LK 04 sur le milieu MRS

**Figure 4.1** : Macroscopie des isolas des bactéries lactiques sur le milieu d'isolement et le milieu de purification

**Tableau 4.2** : Caractéristiques macroscopiques des isolats.

Isolats	Caractéristiques des colonies	Milieu sélectif d'isolement
04, 05, 07, 23, 43, 44, 46, 47, 48	Crème, ponctiforme, régulière, lisse	MRS-A
25, 20, 21, 22, 24, 37, 38, 39, 40, 45, 49	Crème, régulière, lisse, - 3 mm de diamètre	
26, 27, 42, 36, 06	Crème, régulière, lisse, + 3 mm de diamètre	
41	Blanche, régulière, lisse,	
16, 29, 32, 28, 34, 15, 13, 03, 12, 19, 08	Verte claire avec centre vert	MRS VA-VBC
09	Verte, large avec centre vert	
33, 30, 18, 10	Blanche avec centre vert	
35, 50, 10	Verte foncée	
31, 11, 17	Grise	
01	Translucide, - 3 mm de diamètre	
02	Blanche, - 3 mm de diamètre	

#### 4.1.2.2 Tests d'orientation

##### a. Catalase

Il s'agit de la recherche de la possession de l'enzyme catalasique dégradant le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  en eau  $H_2O$  et en Oxygène  $O_2$ . Ainsi, tous les isolats obtenus ont été retenus (catalase négative) mis à part l'isolat LK 1 qui a été catalase positive.

##### b. Examen microscopique après fixation (coloration de Gram)

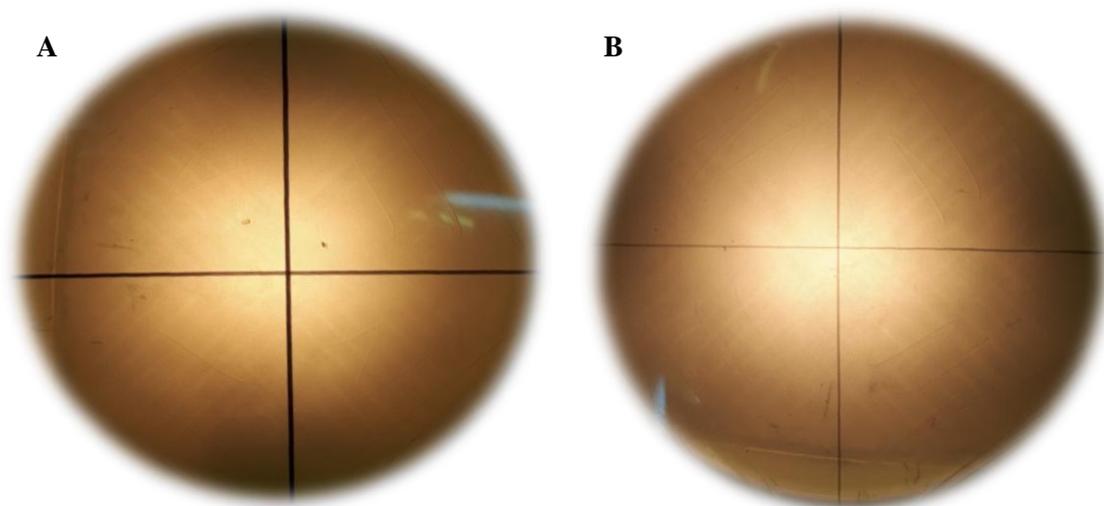
La technique de Gram, renseignant sur le type de la paroi bactérienne, a permis de retenir tous les isolats de bactéries lactiques obtenus avec une coloration pourpre de type Gram positif, et par la même occasion, le prélèvement de leurs caractéristiques microscopiques perceptibles (forme, mode d'assemblage) (**Fig 4.3 et 4.4**). Cependant, les formes des cellules ont oscillé entre la forme allongée (bacille), la forme sphérique (cocci) et la forme intermédiaire (coccobacille) avec différents modes d'arrangement et disposition (isolé, pair, amas, tétrade et chaînette)(**Tab 4.3**). Par conséquent, la répartition a donné ce qui suit :

- ✚ Allongée (07 isolats) : LK 06, 08, 11, 12, 26, 29 et LK 33 ;
- ✚ Sphérique (17 isolats): LK 02, 03, 04, 05, 10, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 44, 46, 47, 48, 49 et LK 50;
- ✚ Intermédiaire (20 isolats) : LK 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 32, 34, 35, 38, 43 et LK 45.

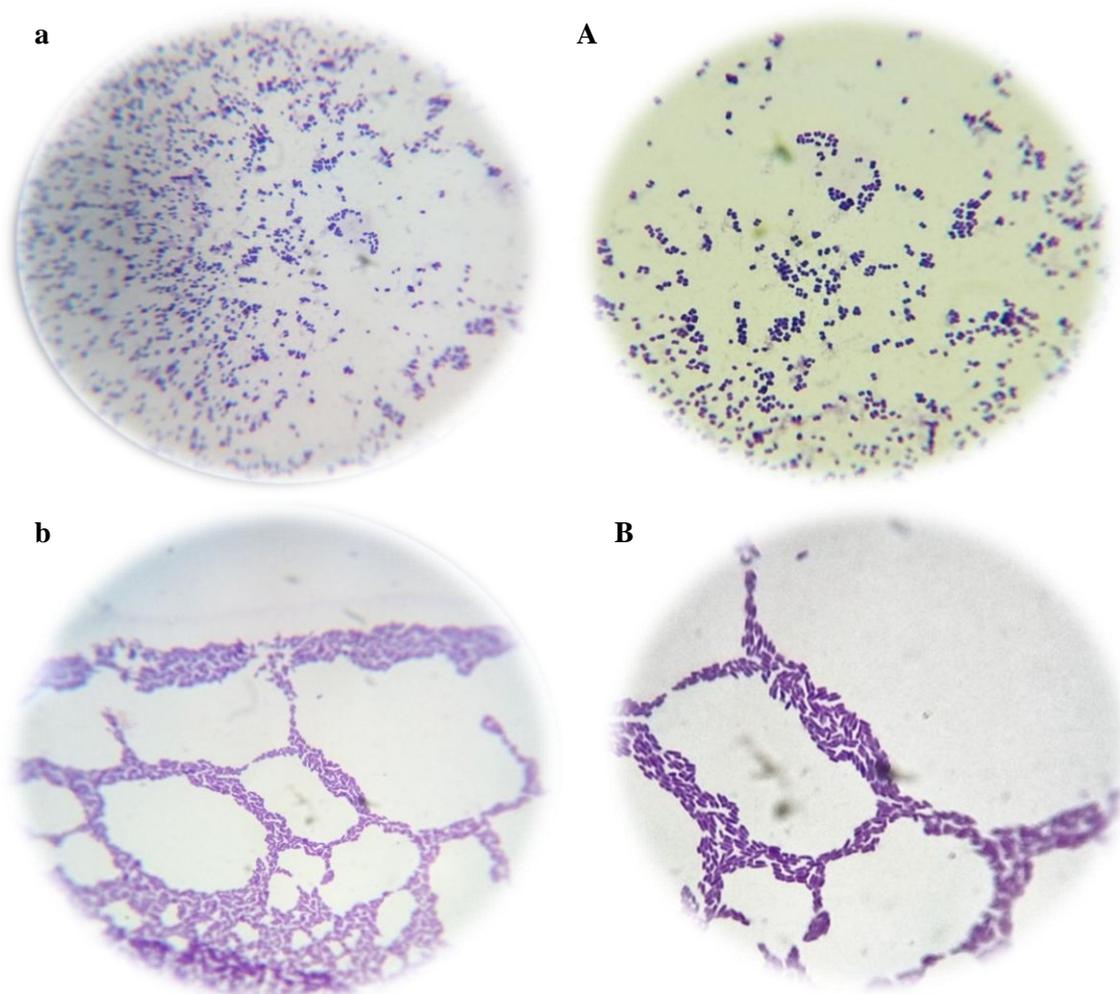
Il est à noter que les isolats, faisant défaut sur le tableau (**Tab 4.3**), parmi d'autres, ont été perdus au cours des trois repiquages de purification, il s'agit de l'isolat : LK 07, 09, 13, 14, 21, 31, 34, 35 et 48 qui ont donné des cultures négatives ; ça sera de même pour l'isolat LK 19. Quant à l'isolat LK 1, il a été proscrit par l'épreuve de la catalase.

##### c. Test de sporulation

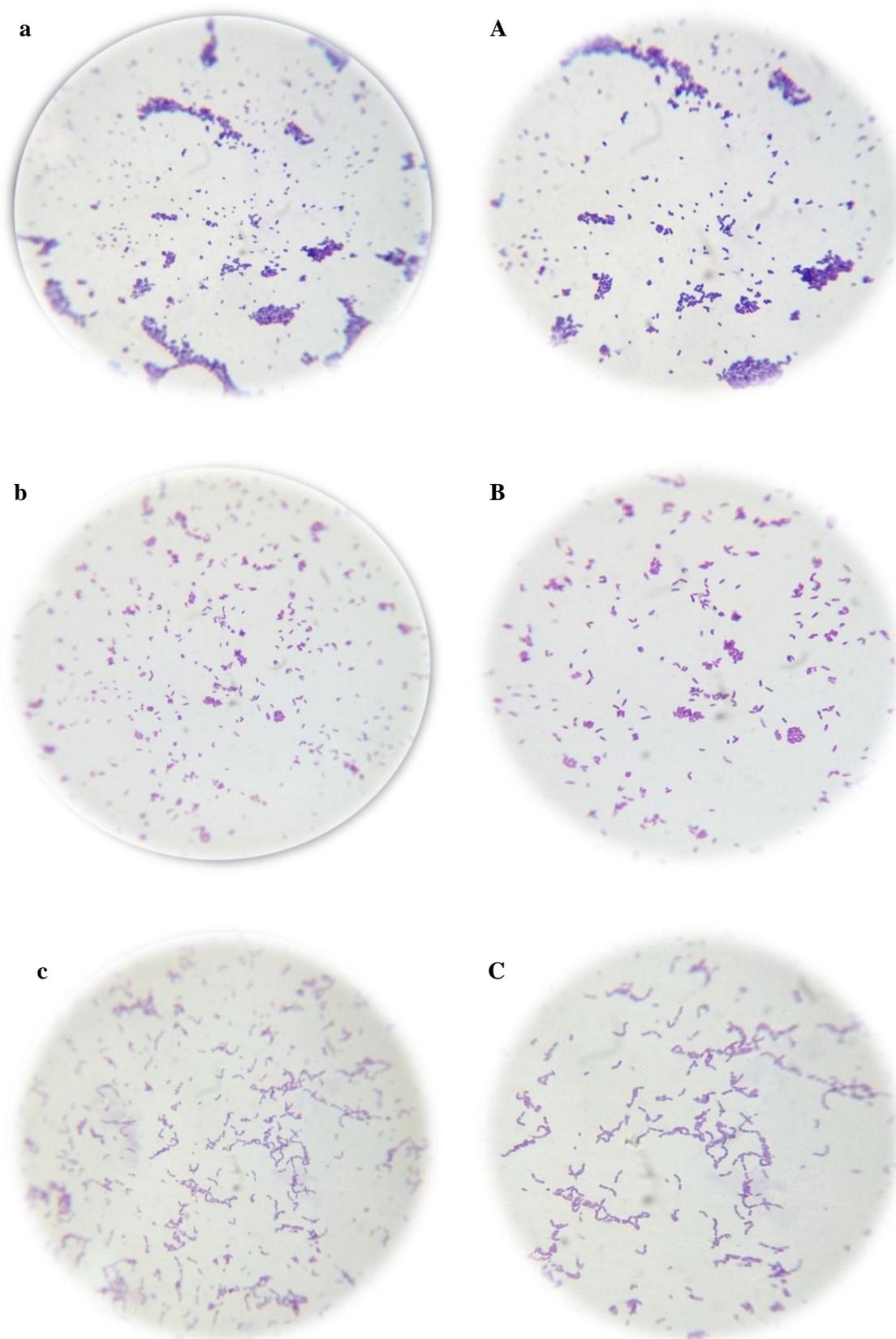
Après un traitement thermique à 80 °C durant 10 min, et au terme de 24 h d'incubation à 37 °C, tous les isolats ont présenté une culture négative (**Fig4.2**). Ils sont alors incapables de produire des spores (asporulés).



**Figure 4.2** : Résultats négatifs du test de sporulation ; (A) les isolats LK 31, 35 ,06 et 47. (B) les isolats LK 23, 32,30 et 37sur l'MRS



**Figure 4.3** : Observation microscopique par la technique de Gram, grossissementx100 (objectif à immersion) ; (a) l'isolat LK 3 ; des cocci isolés et en tétrades ;(b) l'isolat LK 12 ; des bacilles en palissade. (A et B représentent en zoom les champs juxtaposés).



**Figure 4.4 :** Observation microscopique par la technique de Gram, grossissementx100 (objectif à immersion) ;  
(a) l'isolat LK 16 ; des cocci isolés et en diplocoques ; (b) l'isolat LK 11 ; des petits bacilles en palissade ; (c) l'isolat LK 50 ; coccobacilles en chainettes. (A, B et C représentent en zoom les champs juxtaposés)

Tableau 4.3 : Représentation récapitulative des résultats des tests d'orientation

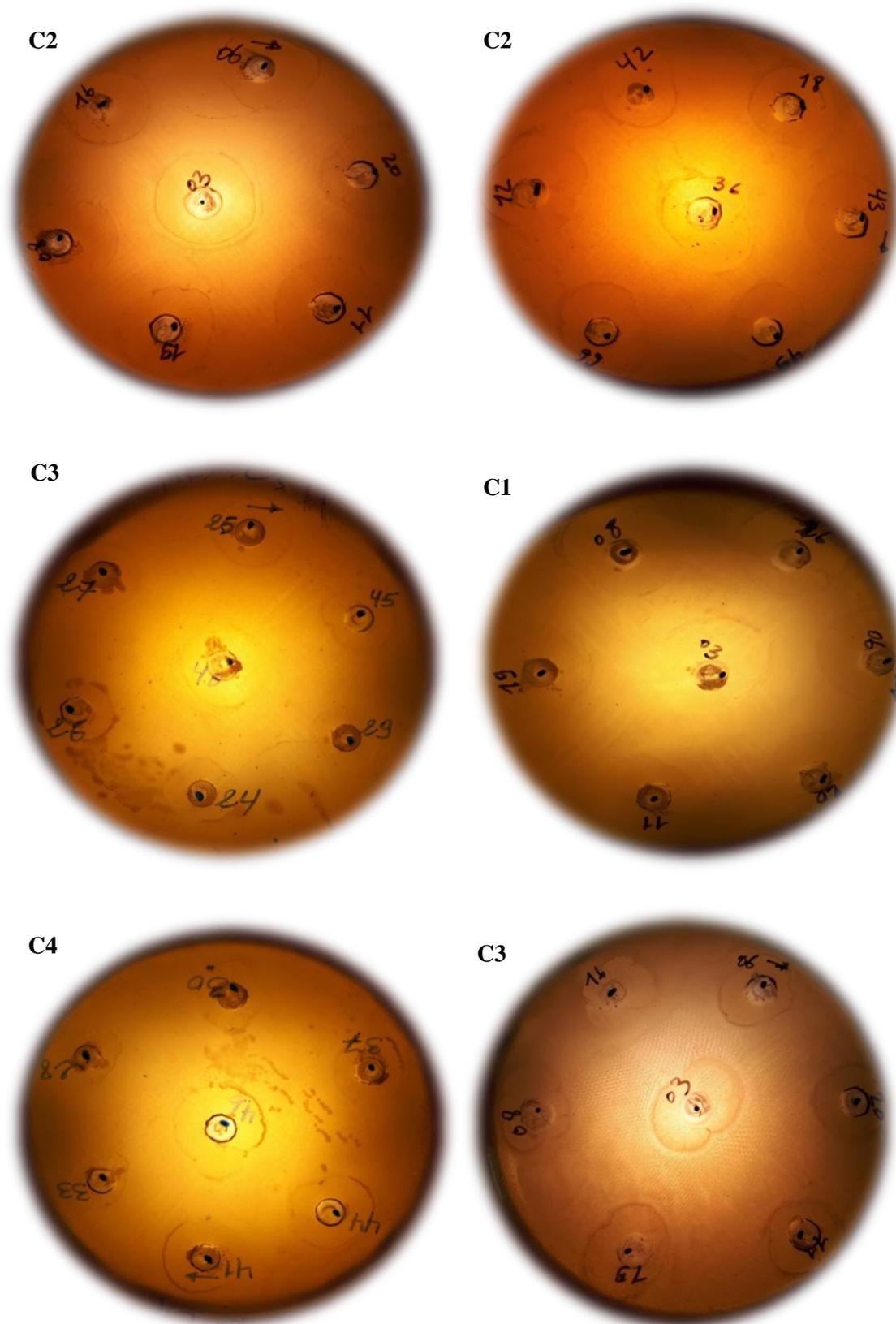
LK	Microscopie										Sporulation	
	Gram	Cocci	Bacille	Coco- bacille	Isolé	Pairs	Tétrades	Amas	Palissade	Chainette	Cat	
02	+	+					+++					
03	+	+			+		+++				-	-
04	+	+			+		+++				-	-
05	+	+				+	+	+			-	-
06	+		+					+	++		-	-
08	+		+					+	++		-	-
10	+	+			+		+++				-	-
11	+		+						++		-	-
12	+		+						++		-	-
15	+	+		+	+		++	+			-	-
16	+	+		+	+	+		+			-	-
17	+	+		+			+	+			-	-
18	+	+		+		+	+++				-	-
19	+	+		+		+	+	+			-	-
20	+	+		+	+	+	++				-	-
22	+	+		+	+			+			-	-
23	+	+		+			+	+			-	-
24	+			+		+	++	+			-	-
25	+	+		+			++	+			-	-
26	+		+						++		-	-
27	+			+		++				+	-	-
28	+			+					++		-	-
29	+		++					+	++		-	-
30	+	+		+	+	+					-	-
31	+	+		+		++					-	-
32	+	+		+	+			+			-	-
33	+		+						+++		-	-
34	+			+	+				++		-	-
35	+			+		+	+				-	-
36	+	+				+	+++				-	-
37	+	+			+	++					-	-
38	+			+				+			-	-
39	+	+				+	+	+			-	-
40	+	+			+	+	+	+			-	-
41	+	+				+	+++				-	-
42	+	+				+		+			-	-
43	+	+		+		++					-	-
44	+	+			+			++			-	-
45	+	+		+		+		++			-	-
46	+	+			+			+			-	-
47	+	+				+					-	-
48	+	+				++					-	-
49	+	+			+	++					-	-
50	+	+								+++	-	-

## 4.2 Résultats de l'évaluation de l'activité antagoniste et la sélection des bactéries à potentiel inhibiteur élevé

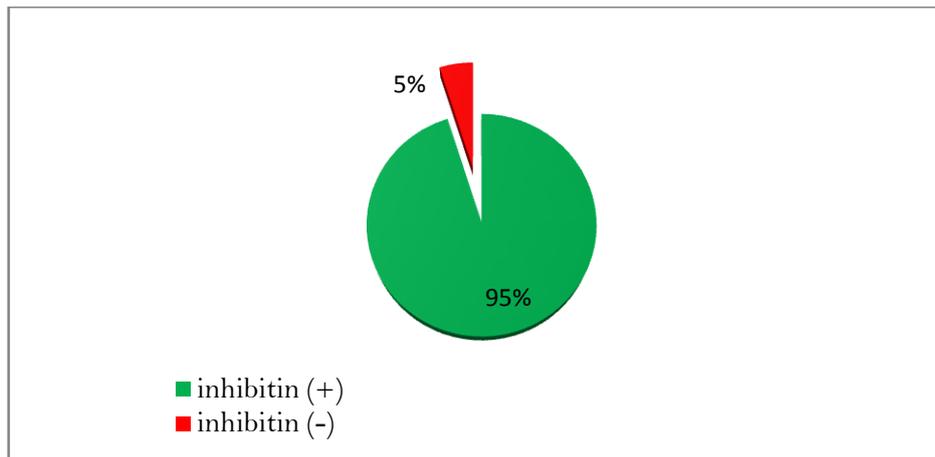
Étant le test essence pour cette expérimentation, l'évaluation de l'activité antagoniste vise à mettre en évidence un éventuel pouvoir inhibiteur des 42 isolats de bactéries lactiques retenus à l'encontre des six souches pathogènes et/ou d'altération (Tab 4.4 et 4.5).

### 4.2.1 Spot agar test (méthode directe)

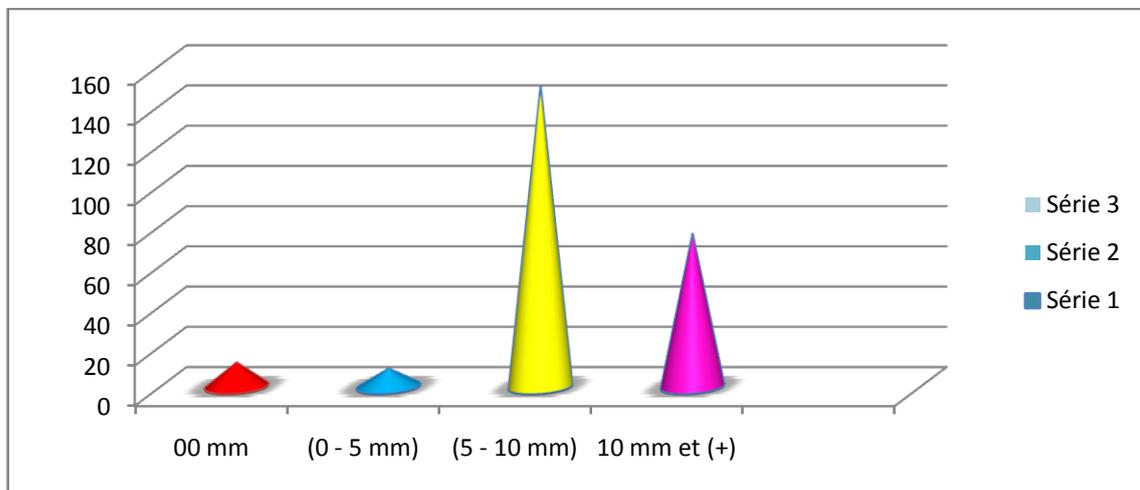
Les résultats pour la méthode de détection directe ont été exprimés par la constatation des zones d'inhibition de la croissance du pathogène en limitrophe et autour des cultures test, exprimés en mm (Fig 4.5) (Tab 4.4). Parmi l'ensemble des bactéries indicatrices, le *Staphylococcus aureus sp.* a marqué une résistance à l'encontre de huit isolats tests (LK 43, 49, 46, 12, 42, 18 et LK 36). Les cinq restants des bactéries indicatrices ont marqué une sensibilité des diamètres variés ; des diamètres notés par (+++) correspondant à 10 mm et plus, ont été constaté, en premier degré, contre les trois pathogènes *Bacillus cereus ATCC 11778*, *Enterococcus faecalis ATCC 29212* et *Staphylococcus aureus ATCC 25923* et, en deuxième degré, *Listeria ivanovii ATCC 19119* pour presque tous les isolats tests. Alors que, des diamètres notés par (+ ou ++) correspondant à 0 à 5 mm (5 mm inclus) ou à 5 à 10 mm (10 mm non inclus), respectivement, ont été constatés contre toutes les bactéries indicatrices par la totalité des isolats lactiques tests (Tab 4.4). Ce qu'est clarifié par la figure 4.6 est que 95 % de l'ensemble des contacts des isolats lactiques ont été inhibiteurs à l'égard de toutes les bactéries indicatrices. D'ailleurs, l'évaluation de l'action antibactérienne de l'entièreté des isolats est secondée à l'aide des représentations graphiques, et cela à la base de la mise en place des intervalles de mesure des zones fractionnant les différents ampleurs de l'action inhibitrice (Fig, 4.7 et 4.8). Ces graphes renfoncent les résultats en démontrant la concentration de l'activité inhibitrice dans les deux intervalles (++et+) et que *Staphylococcus aureus ATCC 25923*, *Enterococcus faecalis ATCC 29212*, *Bacillus cereus ATCC 11778* et *Listeria ivanovii ATCC 19119* étaient les plus sensibles.



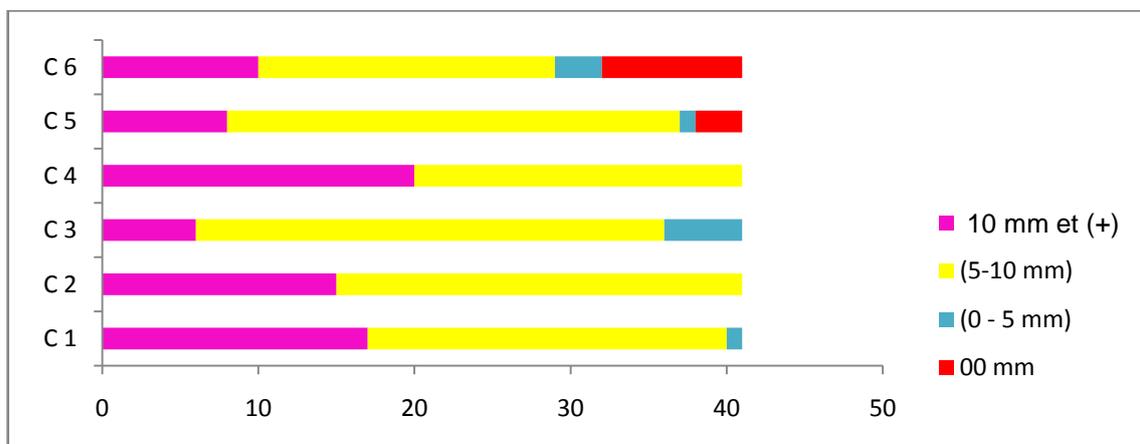
**Figure 4.5 :** Résultats du *spot agar test* des isolats LK(06, 20, 11, 19, 08,16,03,43,49,12, 42 et 36), LK(25,45,29,24,26, 27 et 46), LK(16,06,20,11,19,08,16, 03), LK(41,33,28,30,37,44,46) à l'encontre du C2, C3, C1 et C4 respectivement sur le milieu MRS



**Figure 4.6 :** Taux global de l'effet inhibiteur des 41 isolats lactiques sur les 6 germes indicateurs



**Figure 4.7:** Importance de l'action inhibitrice du microbiote lactique contre les 6 germes indicateurs exprimée en diamètre de la zone d'inhibition



**Figure 4.8 :** Evaluation de la sensibilité et la résistance des bactéries indicatrices à l'action inhibitrice du microbiote lactique

Tableau 4.4 : Résultats du test d'antagonisme *spot agar test* sur le milieu MRS

LK	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	LK	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6
43	++	+++	++	++	+++	-	38	+++	+++	++	++	++	++
49	++	+++	+	++	+++	-	39	+++	++	++	++	++	++
46	+	+++	+	+++	+++	-	23	+++	++	++	++	++	++
12	++	+++	+	+++	+++	-	04	+++	++	++	++	++	++
42	++	+++	++	+++	+++	-	50	+++	++	++	++	++	+++
18	++	+++	++	+++	++	-	47	+++	++	++	++	++	+++
36	++	+++	+	+++	++	-	32	++	++	++	++	+++	+++
22	++	++	++	+++	-	++	25	++	++	++	+++	++	++
10	+++	++	++	+++	++	-	45	+++	++	++	++	++	++
05	++	++	++	++	++	+++	29	++	++	++	++	++	++
15	++	++	++	+++	++	+	24	++	++	++	++	++	++
02	++	++	++	+++	++	-	26	++	++	++	++	++	+
17	+++	+++	++	+++	++	++	27	++	++	++	++	++	++
06	+++	+++	+++	+++	++	+++	40	+++	+++	++	+++	+++	++
20	+++	+++	++	+++	++	+++	41	++	++	++	+++	++	++
11	+++	+++	+++	++	-	+++	33	++	++	++	++	++	++
19	+++	++	+++	+++	++	+++	28	++	++	+	++	++	++
08	+++	+++	+++	+++	-	+++	30	++	++	++	++	++	++
16	+++	++	+++	+++	+	+++	37	++	++	++	++	++	++
03	+++	++	+++	+++	++	++	44	++	++	++	+++	++	++
46	++	+++	++	+++	+++	+							

- : Pas d'inhibition, + : diamètre d'inhibition de 0 à 5mm (5mm inclus), ++ : diamètre d'inhibition de 5 à 10 mm (10 mm non inclus), +++ : diamètre d'inhibition de 10 mm et plus

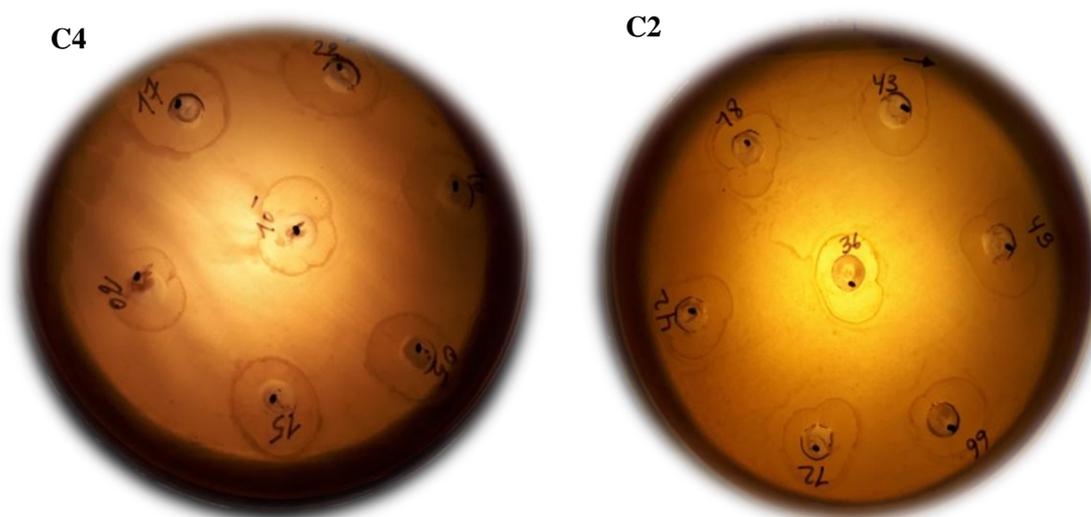
#### 4.2.2 Exclusion de l'inhibition par l'abaissement du pH

Ce test est réalisé dans un pas de déterminer la nature de l'agent inhibiteur par lever l'effet acide. Les résultats exprimés et traités avec les mêmes intervalles de mesure des zones. Les résultats de ce test (**tableau 4.5**) n'étaient pas loin d'avoir le même poids que ceux du test précédent tantôt sur le plan qualitatif ou tantôt sur le plan quantitatif avec des diamètres atteignant les 10 et 12 mm et même plus de 12 mm (diamètre de puits non inclus) notamment avec *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Listeria ivanovii* ATCC 19119, dans le même ordre (**Fig 4.9 et 4.10**).

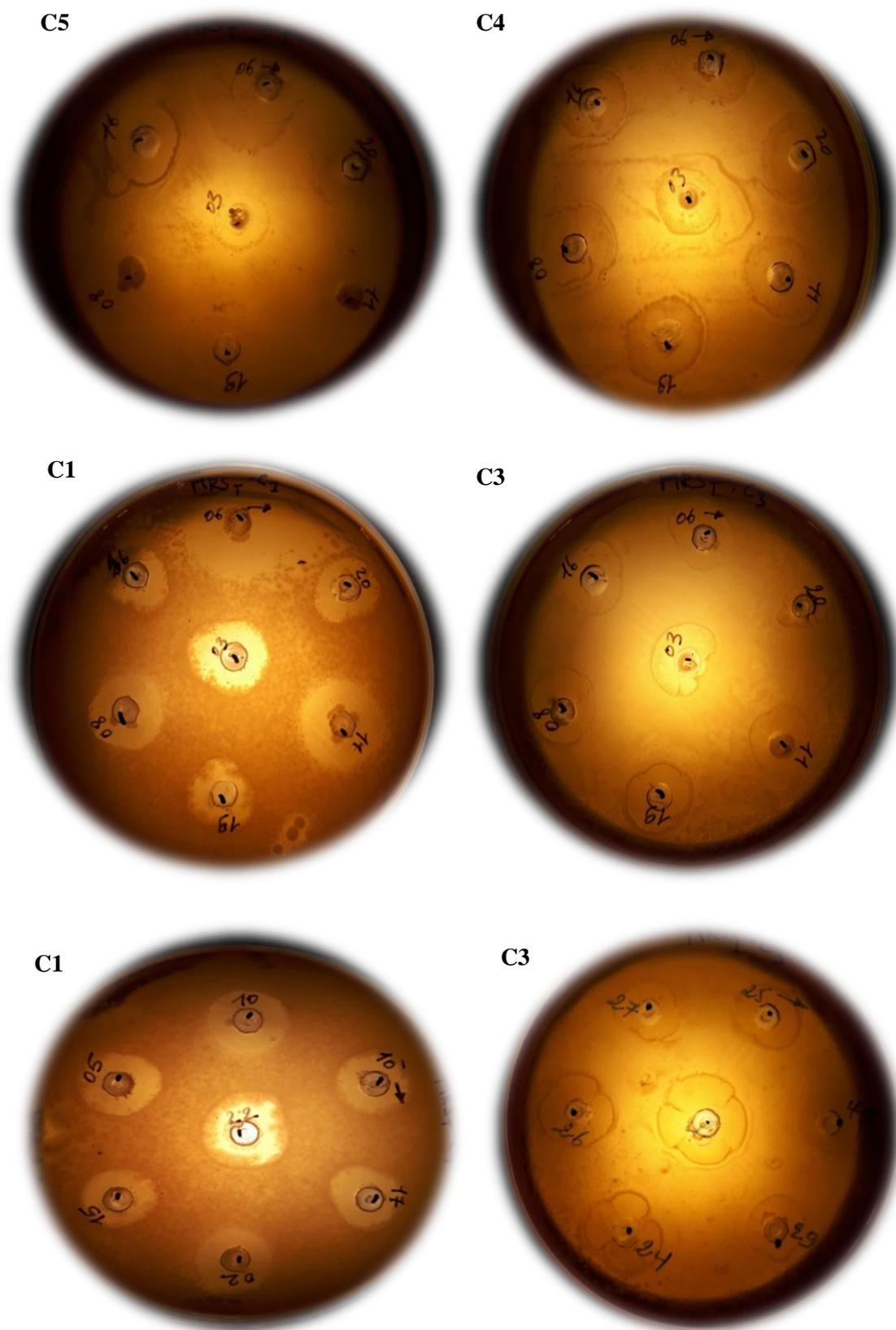
**Tableau 4.5** : Résultats du test d'antagonisme *spot agar test* sur le milieu MRS tamponné

LK	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	LK	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6
43	+++	+++	++	+++	++	++	38	++	++	++	+++	++	++
49	+++	+++	++	+++	++	+	39	+++	++	+++	++	++	++
66	++	++	++	+++	+	++	23	+++	++	++	++	+++	++
12	+++	++	++	+++	+	++	04	+++	++	++	++	+++	++
42	+++	++	+++	+++	+++	++	50	+++	++	++	++	+++	++
18	+++	++	++	++	++	++	47	+++	+++	++	+++	++	++
36	++	++	+	++	+	-	32	+++	++	+++	++	+++	+++
22	+++	++	++	+++	+++	++	25	+++	+++	+++	++	++	++
10	+++	++	++	++	+++	++	45	++	++	+++	++	++	++
05	+++	++	+++	++	+++	-	29	++	++	+++	++	++	++
15	++	++	+++	+++	++	++	24	++	++	+++	+++	++	++
02	+++	++	++	++	+++	+	26	+++	++	+++	+++	++	++
17	+++	++	++	+++	+++	-	27	+++	++	+++	++	++	++
06	+++	+++	+++	+++	+++	+++	40	++	++	+++	+++	++	++
20	+++	++	++	+++	+++	++	41	++	++	++	++	++	++
11	+++	++	+++	+++	++	++	33	++	++	++	++	++	++
19	++	+++	+++	+++	++	+++	28	++	++	++	+++	++	++
08	+++	++	+++	+++	+	+++	30	++	++	++	++	++	++
16	+++	++	+++	+++	+++	+++	37	++	++	++	+++	++	++
03	+++	+++	+++	++	++	++	44	++	++	++	+++	++	++
46	+++	+++	+++	+++	++	++							

- : Pas d'inhibition, + : diamètre d'inhibition de 0 à 5mm (5mm inclus), ++ : diamètre d'inhibition de 5 à 10 mm (10 mm non inclus), +++ : diamètre d'inhibition de 10 mm et plus



**Figure 4.9:**Résultat du *spot agar test* des isolats LK (17, 02, 22, 15, 10 et 05) et LK(18, 43, 49, 36, 12 et 42) respectivement contre C4 et C2 sur le milieu MRS tamponné



**Figure 4.10:**Résultat du *spot agar test* des isolats LK(10, 05, 22, 15, 02,17) contre C1 LK(25,27, 42,29, 24, 26) contre C3,et LK(19, 08, 11, 03, 20,16,06) contre C1, C3, C4 et C5 sur le milieu MRS tamponné

Parmi les 41 isolats lactiques, 20 ont été qualifiés être les plus performants à l'issue du test de l'activité antagoniste de screening primaire. Il s'agit des isolats retenus pour le screening secondaire : LK 46, 50, 17, 43, 49, 47, 03, 16, 40, 20, 06, 25, 08, 12, 32, 22, 42, 18 et LK 11.

#### 4.2.3 Diffusion en puits sur gélose (détection indirecte)

Les résultats de ce test n'étaient pas tellement perceptibles, car quelques isolats ont permis voir une action inhibitrice positive mais ne dépassant pas le 1 mm de diamètre, plus ou moins prononcés sur la gélose TSA tamponnée (**Fig 4.11 a**).

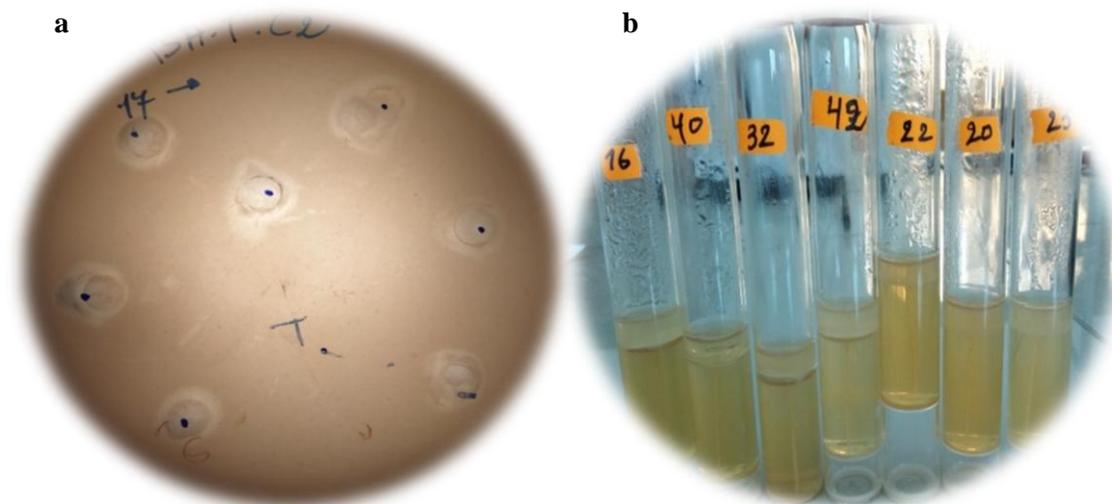
### 4.3 Résultats de l'identification phénotypique et biochimique au niveau du genre des isolats à potentiel inhibiteur élevé

#### 4.3.1 Production de CO<sub>2</sub> à partir du glucose

Le type fermentaire recherché sur le milieu MRS a permis de déterminer le type du métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé pour différencier entre les souches homofermentaires (ne produisent pas le CO<sub>2</sub>) et celles hétérofermentaires (produisent de CO<sub>2</sub>). Les résultats montrent que la production de gaz (CO<sub>2</sub>) à partir du glucose a été observée chez les isolats : LK 20, 25, 40, 32, 16, 22 et LK 42. Ces isolats sont considérés comme hétérofermentaires. Le reste des isolats : LK 17, 47, 49, 03, 11, 18, 19, 46, 43, 08, 06, 12 et LK 50 sont, par contre, considérés comme homofermentaires. Il est à noter que la production de gaz a été constatée par une séparation du milieu par l'emprisonnement du gaz (CO<sub>2</sub>) entre la gélose et la paroi du tube en raison de la communication de la piqûre d'ensemencement avec la base du tube (**Fig 4.11 b**).

#### 4.3.2 Croissance à différentes températures

Ce test est employé dans l'objectif de détecter l'aptitude des isolats de bactéries lactiques à croître à différentes valeurs de température selon leur caractère psychrophile, mésophile ou thermophile. Au terme de l'incubation, les isolats : LK 46, 50, 17, 43, 49, 47 et LK 03 et, à degré moindre, LK 11 ont prouvé une aptitude de croissance dans les quatre valeurs de température. Quant aux autres isolats, ils n'ont pas pu pousser à 45 °C ni à 10 °C et ils l'ont été à 30 °C et à 10 °C (**Tab 4.6**).



**Figure 4.11 :**(a) Résultats de l'activité antagoniste sur milieu tamponné par la méthode des puits et (b) résultat de la recherche du type fermentaire pour les isolats hétérofermentaires

**Tableau 4.6 :** Résultats de croissance à différentes conditions d'incubation

LK	Croissance à								
	6.5%NaCl	10%NaCl	10 °C	15 °C	30 °C	45 °C	Ph 3.9	Ph 4.4	Ph 9.6
46	-	-	+	+	+	+	-	-	+
50	+	-	+	+	+	+	+	+	+
17	-	-	+	+	+	+/-	+	+	-
43	+	-	+	+	+	+	-	-	+
49	-	-	+	+	+	+	-	-	+
47	+/-	-	+	+	+	+	-	+/-	+
03	-		+	+	+	+	+	+	+
16	+/-	-	-	+	+	-	+/-	+	-
40	-	-	-	+	+	-	+	+	-
20	-	-	-	+	+	-	+	+	-
06	-	-	-	+	+	-	+	+	+
25	-	+/-	-	+	+	-	+/-	+	-
08	+	-	-	+	+	-	+	+	+
12	-	-	-	+	+	+/-	+	+	+
32	+/-		-	+	+	-	+	+	+
22	-	-	-	+	+	-	+	+	+
42	+	-	-	+	+	+/-	+	+	+
18	+/-	-	-	+	+	+/-	+	+	-
11	-	-	+/-	+	+	+/-	+	+	-

\* l'isolat LK 19 fut perdu lors du repiquage mensuel

### 4.3.3 Test de tolérance à NaCl

Les isolats lactiques LK 50, 43, 08 et LK 42 ont toléré une concentration de 6.5 % en NaCl ainsi qu'à faible degré les isolats LK 47, 16, 32, et LK 18, alors que la concentration de 10% NaCl n'a permis la croissance d'aucun des isolats sauf le LK 25 qui a donné une croissance faiblement décelable (**Tab 4.6**).

### 4.3.4 Croissance à différentes valeurs de pH

Les isolats lactiques LK 50, 03, 06, 08, 12, 32, 22 et LK 42 étaient capables de supporter les trois valeurs de pH utilisées. Cependant les LK 17, 16, 40, 20, 25, 18 et LK 11 ont marqué une croissance aux pH 3.9 et 4.4 et étaient inaptes de croître au pH 9.6. Au contraire, les LK 43, 46 et LK 49 ont survécu seulement au pH 9.6. Quant à LK 47, il a pu supporter le pH 9.6 et a donné une faible croissance à la valeur 4.4 (**Tab 4.6**) (**Fig 4.12**).

### 4.3.5 Résultats de la recherche de l'ADH

Les bactéries lactiques fermentent le glucose et produisent essentiellement l'acide lactique et en présence du BCP le milieu prend la coloration jaune. Pour les bactéries lactiques possédant l'ADH, elles dégradent l'arginine et en résulte de l'ammoniac responsable de l'alcalinisation du milieu qui reprend sa couleur initiale (violette), et les bactéries sont dites dans ce cas (ADH+). Tous les 19 isolats ont affiché la possession de l'enzyme ADH (**Fig 4.13 a**).

### 4.3.6 Résultats de la recherche de l'uréase

La dégradation de l'urée conduit au changement de la couleur du milieu pour les bactéries lactiques qui possèdent l'enzyme uréase. Les 19 isolats n'ont pas dégradé l'urée, ils sont donc uréase négative (**Fig 4.13 b**).

### 4.3.7 Profil fermentaire des sucres

Les résultats positifs d'utilisation des sucres correspondent aux puits présentant un virage de la couleur de l'indicateur coloré vers le jaune, due à l'acidification du milieu par fermentation du sucre en question (**Fig 4.14 et Tab 4.7**). Les LK 08, 47, 49, 43, 03 et LK 17 ont montré un résultat positif pour la totalité des sucres (fermentation+). Les LK 06, 20, 11, 46, 40, 22 et 12 ont montré un résultat négatif seulement pour le L rhamnose (fermentation-). Le LK 50 a montré un résultat négatif avec deux sucres le L rhamnose et le D manitol. LK 18, 32, 16 et LK 48 ont montré un résultat négatif avec le L rhamnose, le D manitol et respectivement le sorbitol, l'arabinose, le sucrose et le D+ lactose.

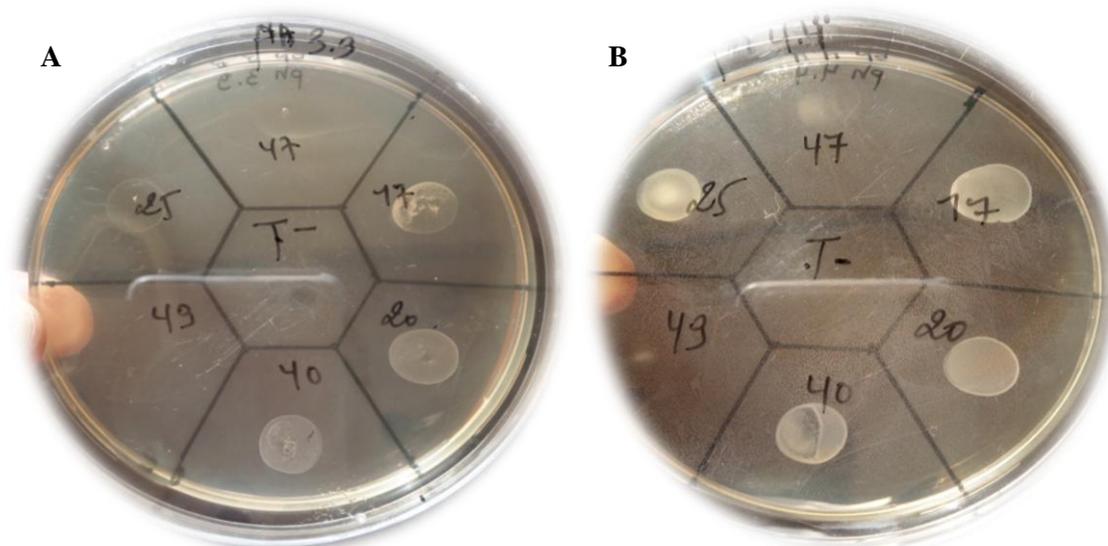


Figure 4.12 : (A et B) Résultats de la croissance à différentes valeurs de pH

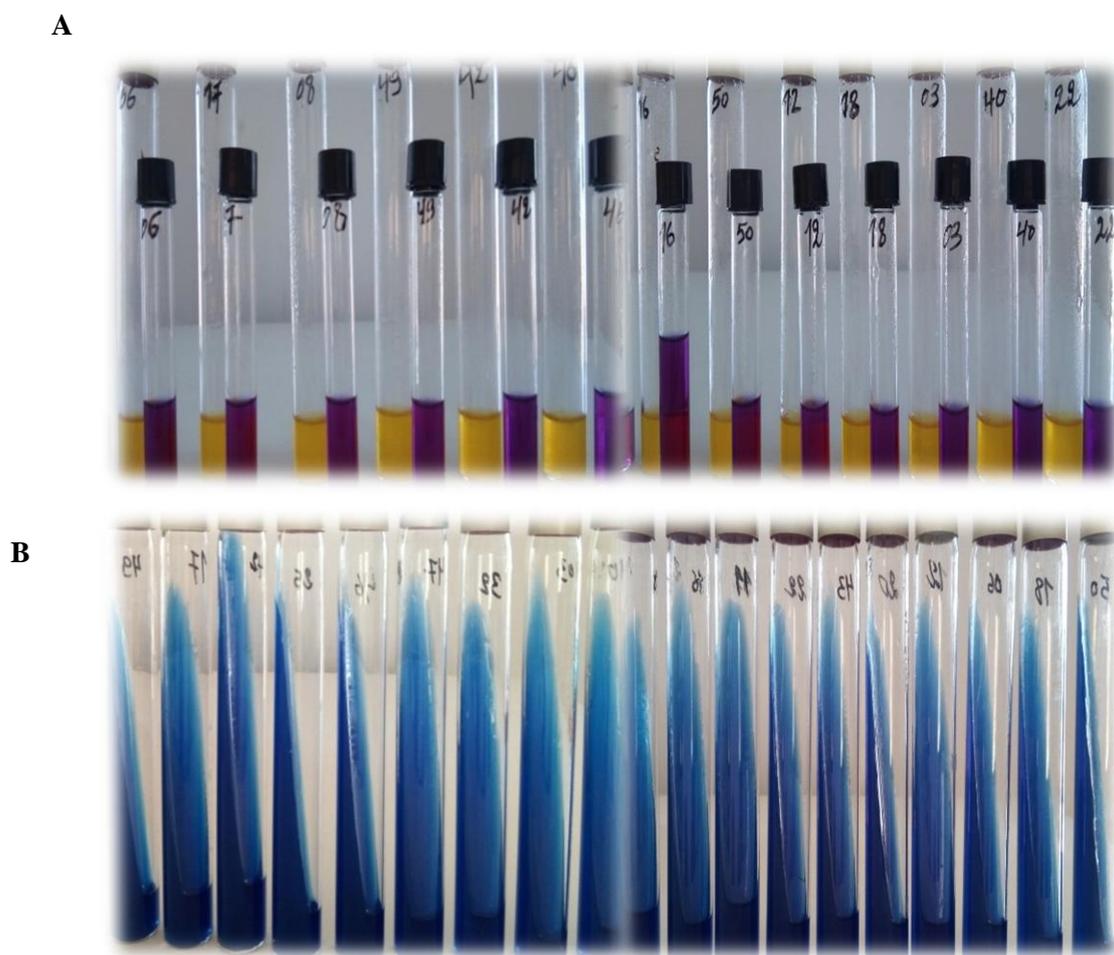
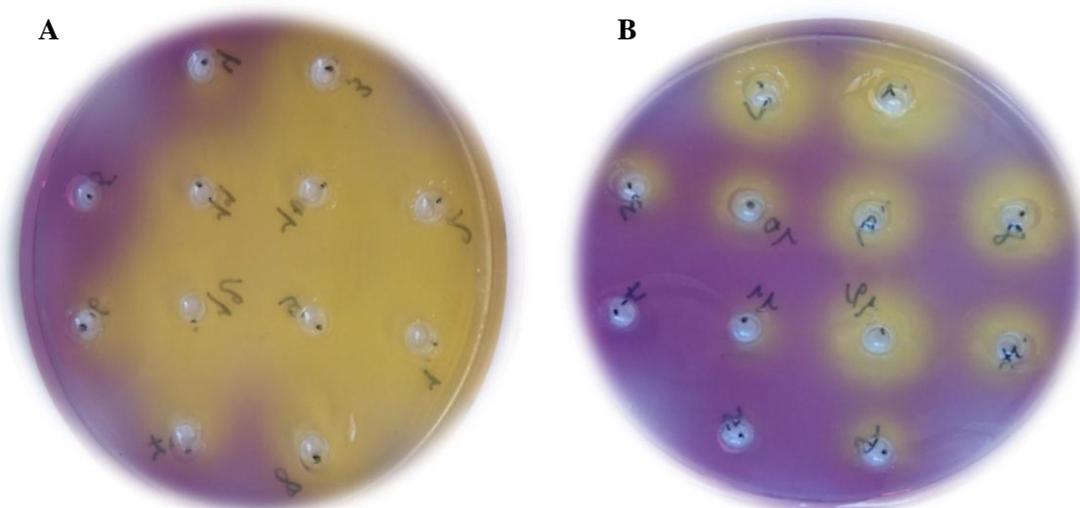


Figure 4.13 : (A) Résultats de l'hydrolyse de l'arginine et (B) résultats de la recherche de l'uréase



**Figure 4.14 :** Résultat du profil fermentaire des sucres relatif à l'isolat LK 12 (A) et LK 18 (B), pour les sucres : D (+) glucose, D (+) galactose, Saccharose, Dmanitol, L rhamnose, D(+) Lactose, Arabinose, D fructose, Raffinose, D xylose, Sorbitol et Maltose

**Tableau 4.7 :** Résultats du profil fermentaire des sucres

Sucres													
	D (+) gluc	D(+) galac	Sacchar	D manit	rhamn	D (+) Lact	Arabin	D fruct	Raffinn	D xyl	Sorbi	Malt	
LK													
42	+	+	+	-	-	-	+/-	+	+	+	+	+	+
06	+	+	+	+	-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+/-	+	+
17	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
03	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
46	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
08	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

## 4.4 Résultats de l'étude des propriétés technologiques

### 4.4.1 Pouvoir protéolytique

Chacun des isolats : LK 08, 46, 11, 18, 25, 43, 32, 49, 03, 12, 50, 20, 47, 40, 43 17 et LK 06, ayant exprimé un pouvoir protéolytique constaté par l'apparition d'un halo clair de protéolyse entourant les spots d'ensemencement (**Fig 4.15**). La zone de protéolyse était d'importance sensiblement comparable entre ces isolats et légèrement prononcée pour LK 17, 49, 08 et LK 43.

### 4.4.2 Pouvoir lipolytique

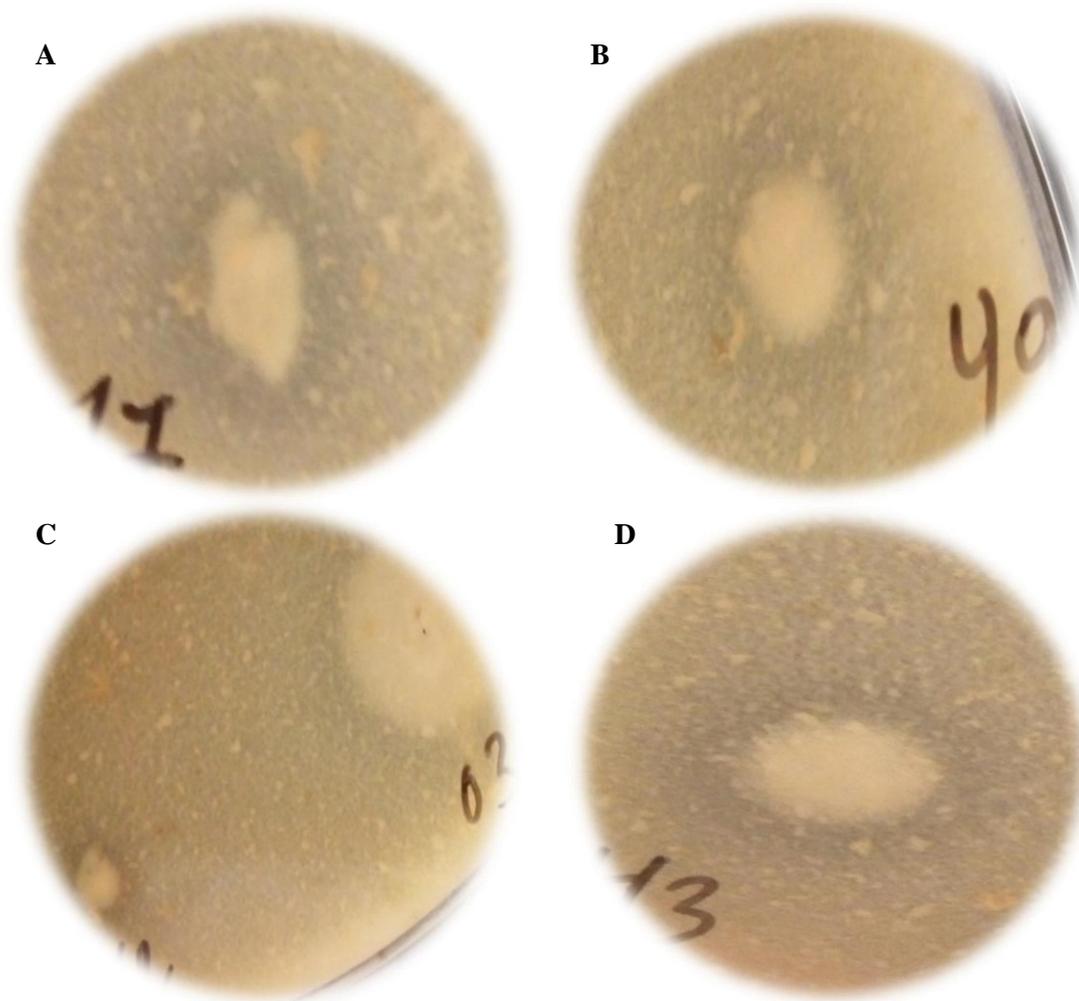
Les deux isolats LK 43 et LK 49 ont démontré un pouvoir lipolytique exprimé par la formation d'un halo opaque autour des spots. Cette activité était, comparativement, plus prononcée pour LK 43 que pour LK 49 (**Fig 4.16**).

### 4.4.3 Production des exopolysaccharides

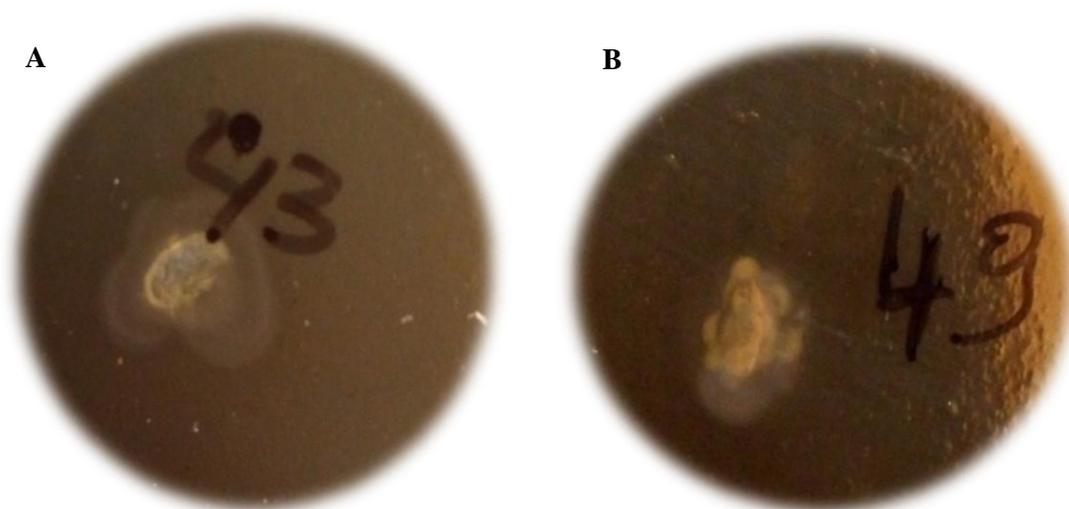
La production des exopolysaccharides dans un milieu hypersaccharosé se traduit par la formation de colonies volumineuses et gluantes. C'était le résultat constaté pour les isolats LK 06, 08, 11 et LK 12 (**Fig 4.17**).

### 4.4.4 Production d'acétoïne

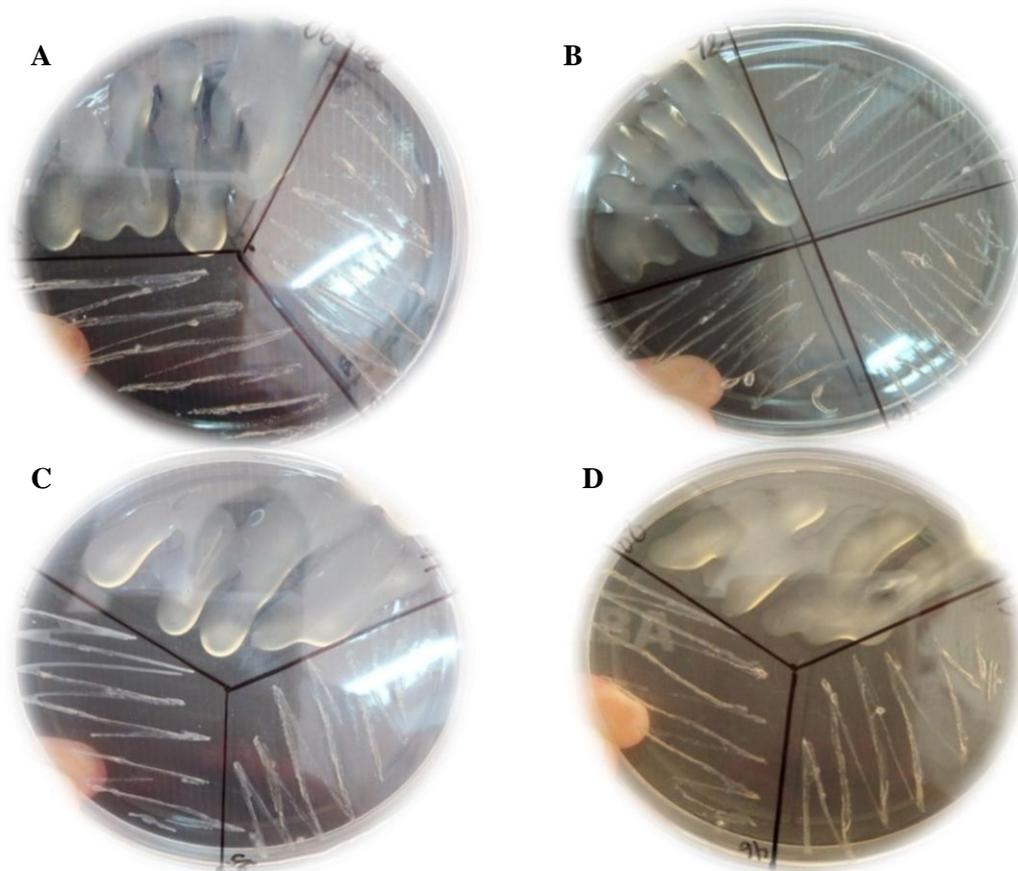
Après la vérification de la coagulation et l'addition des réactifs de Vogues Proskauer VPI et VPII, il apparaît que les quatre isolats : LK 43, 46, 47 et LK 49 arrivent à produire des arômes (acétoïne) dont l'anneau rouge le témoigne (**Fig 4.18**).



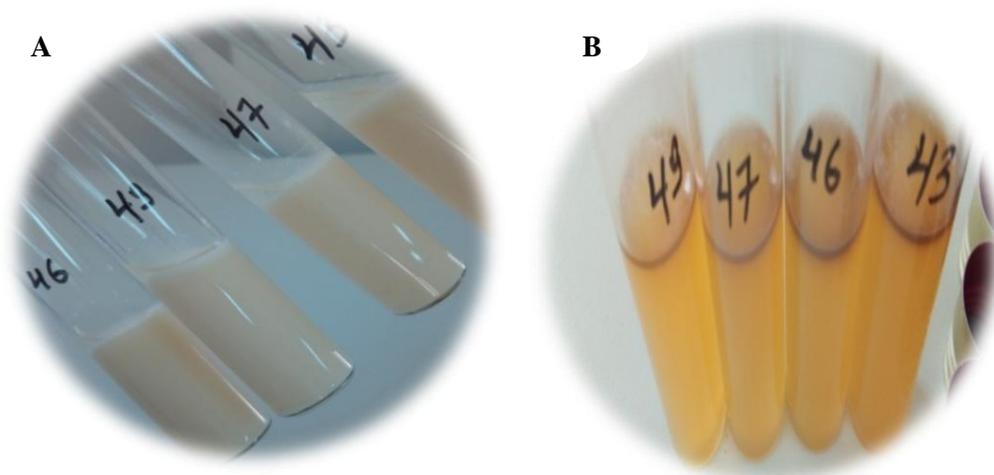
**Figure 4.15 :** (A, B, C et D) Résultats du pouvoir protéolytique sus le milieu MRS à 10 % du lait écrémé



**Figure 4.16:** (A et B) Résultats du pouvoir lipolytique sus le milieu MRS à 1 % et à 3 % du tween 80



**Figure 4.17 :** Production des exopolysaccharides (EPS) sur le milieu MRS hypersaccharosé ; (A) LK 12, (B) LK 06, (C) LK 08, (D) LK 11.Elle se constate par l'apparition des colonies gluantes et grosses



**Figure 4.18 :** Résultats de la recherche de production d'acétoine ; (A) coagulation (+), (B) anneau rouge après l'addition de VPI et VPII (annonceur de la production d'acétoine)

## 4.5 Résultats de l'étude des critères probiotiques

### 4.5.1 Résistance aux conditions gastriques simulées

Les isolats ont réagi différemment à l'épreuve de la résistance au jus gastrique artificiel. La croissance pour LK 43, 49, 46, 47 et LK 03 était carrément absente, alors qu'elle était luxuriante pour LK 11, 18, 40, 32, et LK 12. Pour le reste des isolats, la croissance allait de très faible ou faible à bonne (**Tab 4.8**).

### 4.5.2 Résistance aux sels biliaires

Ayant présenté une croissance très abondante, les isolats LK 03, 08, 50, 11, 18 et LK 12 ont prouvé leur tolérance à 0.3 % de sels biliaires durant les 24 h d'incubation au contraire des isolats LK 17, 25, 40 et qui n'ont pas pu survivre dans ces conditions (**Tab 4.8**). Les résultats de survie en conditions gastriques et ceux de survie en conditions intestinales simulées s'affichent en juxtaposition sur le tableau pour démontrer aisément les isolats à potentiel probiotique ; ceux surmontant à la fois les deux épreuves.

**Tableau 4.8** : Résultats de survie dans le suc gastrique artificiel et de résistance aux sels biliaires

LK	pH 3 + pepsine	Sels biliaires
43	-	+++
49	-	+
46	-	++
47	-	+++
03	-	++++
17	+	-
22	+	+
08	+	++++
20	++	++
16	++	++
06	+++	+++
50	+++	++++
25	+++	-
42	+++	+
11	++++	++++
18	++++	++++
40	++++	-
32	++++	-
12	++++	++++

Croissance : - : absente, + : très faible, ++ : faible, +++ : bonne, ++++ : luxuriante

## Chapitre 5

### Discussion

Cette étude de recherche est réalisée dans l'objectif de mettre en évidence et évaluer l'activité antagoniste du microbiote lactique de la viande salée et séchée (*Khliia*) pour démystifier le rôle que jouent les bactéries lactiques à réussir et perpétuer cette tradition ancestrale, d'une part, d'autre part, cela permettra de valoriser ce produit artisanal pour étudier certaines qualités d'ordre technologique et probiotique inhérentes à ces microorganismes. Ces derniers occupent aujourd'hui un rôle irremplaçable dans plusieurs domaines notamment dans l'alimentation, la nutrition et la santé (cultures bioprotectrices, starters, probiotiques ainsi que pour différentes cures).

Pour en faire, l'étape d'isolement a permis d'obtenir 50 isolats dont 41 isolats lactiques présomptifs ayant survécu à l'issue de la purification et les tests d'orientation. Ces isolats ont fait l'objet d'un screening de l'activité antagoniste (antibiose) vis-à-vis des microorganismes pathogènes et/ou d'altération de référence internationale Ceci a permis de sélectionner les isolats lactiques prouvant le plus grand pouvoir inhibiteur pour les identifier au stade du genre, au moins, et les soumettre, par la suite, à une étude de quelques propriétés technologiques afin de savoir à quel point peuvent-ils servir de probiotiques.

Le (*Guadid*, *Khaliia*, ou *Kadid*) est connu dans plusieurs pays d'Afrique du nord à l'instar de l'Algérie. C'est un produit carné salé et séché, préparé, jadis et actuellement, après la fête de l'Aïd-El-Adha, surtout, où il y a une disponibilité accrue de viande. Il est élaboré aussi bien à partir de viande d'agneau que de viande de bœuf. Cependant, suivant les régions, les méthodes de préparation divergent à savoir les ingrédients mis en œuvre, les techniques de salage ainsi que les utilisations finales du *Guadid* (**Bennani *et al.*, 1995 ; Draganski, 2012**).

Les produits carnés sont des produits dans lesquels les propriétés de la viande fraîche ont été modifiées par l'utilisation d'une ou de plusieurs opérations unitaires (**Crews, 2011; Mikami, 1990**) ; pour le salage, le sel de cuisine est inclus dans toutes les formules de salage de viande. Sa fonction principale est celle d'agent de saveur et il

a une action conservatrice (bactériostatique) (Nganguem, 2007 ; Aymerich *et al.*, 2000 ; Lozach, 2001) et quant au séchage, c'est un procédé qui provoque une forte diminution de l'activité de l'eau de la viande (Blackmer *et al.*, 1997; Gailani, 1986).Après le séchage, l'activité de l'eau (WA) atteinte détermine les caractéristiques du produit fini (texture, couleur et flaveur) et sa durée de vie (stabilité chimique et microbiologique) (Igene, 2008 ; Farouk, 1983).La microflore est souvent stabilisée dans la viande séchée (Zukál & Incze, 2010) et la plupart des altérations de ce type de produit proviennent d'une augmentation de l'humidité, ce qui induit un sêrissement dû au développement des bactéries lactiques ou des coliformes, ainsi que l'apparition de couleurs diverses sur le produit ou la formation de zones spongieuses sous l'action de *Bacillus* (Lonnecker *et al.*, 2010 ; Guiraud, 2003 ; Jay *et al.*, 2000).

Les bactéries lactiques (LAB) rassemblent un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres (Pilet *et al.*, 2005). Ces genres bactériens sont rencontrés dans une panoplie de niches comprenant surtout les produits laitiers fermentés, les végétaux et les produits canés. Les produits fermentés par les bactéries lactiques sont rendus plus adaptés à une longue préservation et possèdent des qualités de texture, de flaveur et de goût (El-Ghaish *et al.*, 2011). La principale action antimicrobienne exercée par LAB est due à la production de l'acide lactique et la réduction du pH (Çadirci *et al.*, 2005). En addition, les LAB produisent une variété de produits qui peuvent être classés comme des composés à faible poids moléculaire (*low-molecular-mass*: LMM) tels le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), le dioxyde de carbone(CO<sub>2</sub>), le diacétyl (2,3-butanedione), des composés non caractérisés et des composés à haut poids moléculaire (*high molecular-mass*: HMM) comme les bactériocines (Piard *et al.*, 1992 ; Jay *et al.*,1983 ). Chacun de ces composés peut antagoniser la croissance de certains microorganismes d'altération et pathogènes d'origine alimentaire (Ammor *et al.*, 2006). Les LAB sont des microorganismes sûrs pour la consommation humaine ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS « *Generally Recognized As Safe* » (Klaenhammer *et al.*, 2005) qui autorise officiellement leur usage pour des applications alimentaires et qui témoigne de leur parfaite innocuité.

La croissance de ces genres bactériens nécessite des milieux de culture riches et complexes à base d'extraits de levure ou de viande et des peptones animales (**Ashref & Shah, 2011**). Ceci est dû à leurs exigences polyauxotrophiques élevées au divers acides aminés, des peptides, des nucléotides, des vitamines et des acides gras en raison de leur capacité biosynthétique limitée (**Fitzpatrick & Keefe, 2001; Desmazeaud, 1983**) et sont, donc généralement cultivées sur des milieux complexes comme les milieux MRS et M17 qui ont été utilisés pour leurs dénombrement et isolement de différentes niches écologiques (**Gemelas et al., 2013**). Cependant, le choix du milieu est parfois motivé par le biotope initial ; pour les viandes, à titre d'exemple, et produits carnés, c'est le milieu MRS qui est souvent utilisé (**Reuter, 1985**). Il a été recommandé, de ce fait, par **Schillinger et al., (2003)** pour l'isolement du groupe « *LLPW* » (genres: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*) et d'autres genres secondaires avec, tel que les *Lactococcus* et *Streptococcus*.

Le cas de cette présente recherche, l'isolement des bactéries lactiques a été réalisé à partir de cinq (05) échantillons de *Khliia* de différents âges et différentes provenances (**Tab 3.1**). Les prises d'essai sont introduites dans un rapport 1 : 9 de TSE constituaient les DM (dilutions mères) ayant subi un enrichissement avant d'être ensemencées sur deux milieux gélosés MRS 1.5 % agar rendus sélectifs ; l'un par acidification (MRS-A au pH 5.2) et l'autre par addition de la vancomycine et du vert de bromocrésol (MRS-VA-VBC), Il est à signaler que le vert de bromocrésol, ici, n'étant pas un agent de sélection mais, plutôt, un indicateur de couleur, et cela à la base que l'MRS acide (MRS-A) avec l'incubation à l'anaérobiose à 30 °C est sélectif pour LAB (rendu sélectif des Gram+ par inhibition des germes à Gram-) et le MRS à la vancomycine et au vert de bromocrésol en semi-anaérobiose est sélectif pour *Lactobacillus spp.* (**Hartemink et al., 1997 ; Naimi M & KhaledM a, 2014**).

Par conséquent, au bout de 24 h d'incubation, un dénombrement a été effectué pour estimer la charge des différents échantillons en LAB, bien que ce dénombrement ne reflète pas effectivement le nombre réel des microorganismes que renfermait le produit avant l'analyse en raison de l'amplification (l'enrichissement). Cette amplification durait une nuit pour accroître autant plus la charge des bactéries lactiques et en optimiser leur prévalence à l'isolement. A ce titre, les échantillons K 1 et K 2 ont affiché la plus grande population des bactéries lactiques avec  $2.5 \cdot 10^6$  UFC/g

et  $2 \cdot 10^6$  UFC/g. Ces résultats sont similaires à ceux constatés par **Najjari et al., (2007)** dans la viande ovine séchée après enrichissement ( $2 \cdot 10^6$  UFC/g). Des densités de bactéries lactiques, aussi, similaires, de l'ordre de  $2 \cdot 10^6$  et de  $3 \cdot 10^6$  ont été enregistrées à partir des échantillons de la viande fraîche (**Naimi M & Khaled M a, 2014**). Il est à noter qu'aucune colonie bactérienne n'a été constatée pour l'échantillon K 5.

Sur le milieu MRS-A, en semi-anaérobiose, les colonies bactériennes ont présenté une couleur blanche et crème, lisse (type « S » pour *smooth*), et étaient de petite taille. Ces colonies affichent des caractéristiques typiques de bactéries lactiques (**Carr et al., 2002**). Parallèlement, sur le milieu MRS-VA-VBC, les colonies sont apparues sous différentes morphologies (*white and large colony, light green with green center, grey colony, dark green colony, white with green center, green colony, white colony*) dont plusieurs d'entre elles caractérisent les individus relevant de l'espèce *Lactobacillus sakei* (**Naimi M & Khaled M a, 2014 ; Najjari et al., 2007**). Cette diversité des caractéristiques perceptibles des colonies sur les milieux d'isolement a servi, en premier lieu, pour le repiquage des colonies morphologiquement différentes autant que faisable, et en deuxième occasion, pour constater la pureté de l'isolat par l'uniformité des aspects macroscopiques sur le milieu de purification.

L'ensemble des colonies, sur les deux milieux ont fait l'objet de trois repiquages successifs de cinquante (50) colonies couvrant les différentes caractéristiques observées sur le milieu MRS. Ceci en vue d'une purification pour l'étude et la conservation où la réalisation du troisième repiquage a fait l'occasion d'une tentative d'identification préliminaire en effectuant des tests d'orientation qui sont les premiers à réaliser dans ce sens, à savoir :

- (i) la coloration de Gram, coloration différentielle renseignant sur le type de la paroi cellulaire des bactéries lactiques qui est de type Gram+ ; elle occupant une place déterminante et d'importance en ordre dans l'identification des bactéries. Cette fameuse technique permet de diviser les bactéries en deux grands groupes : les bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif et cela selon leurs réactions interactives avec les solutions de Gram (violet de gentiane, lugol et la fuschine) ; une réaction dictée par la structure chimique de la paroi bactérienne. Pour les bactéries à type de paroi Gram positif, à l'image des bactéries lactiques, elles retiennent le

violet de gentiane et vont ainsi se teindre en pourpre (violet ou bleu). Par la même occasion, ce test permet le prélèvement des caractéristiques microscopiques perceptibles (la pureté de l'isolat, la forme des cellules et leur mode d'arrangement) ;

- (ii) le test de l'activité catalase, une enzyme clivant le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau et en oxygène, dont les bactéries lactiques ne possèdent pas essentiellement ;
- (iii) et le test de formation des spores ; effectué pour éliminer les non lactiques réagissant positifs à cette épreuve (**Guiraud *et al.*, 1980**).

Tous les isolats étaient Gram+, catalase- sauf un (LK 1) et asporogènes et les cellules des différents isolats ont affiché sous le microscope optique diverses formes ; coques : LK 02, 03, 04, 05, 10, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 44, 46, 47, 48, 49 et LK 50. bacilles : 06, 08, 11, 12, 26, 29 et LK 33 et des coccobacilles : 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 32, 34, 35, 38, 43 et LK 45. Les résultats sont ainsi parfaitement identiques aux caractéristiques des genres lactiques pour ces trois tests (**Doyle *et al.*, 2006 ; Axelsson, 2004**). L'entièreté des 45 isolats soumis aux tests d'orientation ont été tous Gram+ et catalase- et donc des LAB présumptifs hormis LK 1, dont 07 (15.9 %) des bacilles et 37 (84.09 %) des cocci, et un tel profil est très proche de celui trouvé par différents auteurs, notamment, par (**Mallesha *et al.*, 2010**) avec 62.5 % de cocci et 18.75 % de bacilles.

A l'issue de la purification et les tests d'orientation, quarante et un (41) isolats sont retenus et conservés à long et à court terme. Ces isolats vont subir un test de l'activité antagoniste à l'égard des bactéries indicatrices dont la référence et la codification sont : C1 : *B. cereus* ATCC 11778, C2 : *E. fecalis* ATCC 29212, C3 : *L. ivanovii* ATCC 19119, C4 : *St. aureus* ATCC 25923, C5 : *St. aureus* ATCC 43300 et C 6 : *St. aureus* spp.

Ce test comprend deux techniques variantes de deux grandes méthodes ; une directe et l'autre indirecte. Selon **Fleming *et al.*, (1975)** et **Schillinger, (1989)** ; la technique directe : *spot agar test*, consiste à cultiver les deux souches dans le même milieu (dite encore : screening primaire), cependant, selon **Barefoot *et al.*, (1983)** la technique indirecte : *well-diffusion-assay* (dite encore : screening secondaire) permet de mettre en contact le surnageant de la souche lactique productrice de substances

antimicrobiennes avec la souche indicatrice.

En adoptant la technique de **Fleming & Schillinger** avec de légères modifications pour évaluer l'activité inhibitrice du microbiote lactique représenté dans son ensemble par les 41 isolats vis-à-vis des six bactéries indicatrices, tous les isolats (100 %) testés ont exercé une activité inhibitrice sur au moins cinq (05) bactéries indicatrices, notant que huit isolats (LK 43, 49, 46, 12, 42, 18 et LK 36) ayant été sans effet (inhibition négative) contre *St. aureus spp.* (C6). Ce taux de 100 % est largement supérieur à celui trouvé dans l'étude de **Renata *etal.*, (2004)**, qui n'a repéré, d'un ensemble de 813 isolats, que 128 à action inhibitrice, ce qui fait, autrement, un pourcentage de 15.7 %, à souligner que ces 128 isolats étaient tous (100 %) Gram+, catalase -; ce qui est identique à la présente étude.

S'ajoute à cela, les autres isolats lactiques ont prouvé un effet inhibiteur exprimé avec des diamètres catégorisés en ; (+++) : diamètre d'inhibition de 10 mm et plus, (++) : diamètre d'inhibition de 5 à 10 mm (10 mm non inclus) et (+) : diamètre d'inhibition de 0 à 5mm (5mm inclus). Par conséquent, le taux d'inhibition, sur un total de 246 spots, était de l'ordre de 95 %, indépendamment de l'importance de la zone d'inhibition. Par contre, l'indifférence des bactéries indicatrices à l'effet inhibiteur était de 5 % de l'ensemble des contacts (246 spots) et n'a concerné particulièrement que *St. aureus spp.* (C6), et en deuxième lieu *St. aureus ATCC 43300*(C5).

Compte tenu à l'intensité de l'effet inhibiteur, 60 % des inhibitions ont été comprises dans l'intervalle (5-10mm) et de l'autre côté, les taux de sensibilité, son importance et la résistance des bactéries indicatrices étaient graphiquement illustrés où la bactérie indicatrice C4 : *St. aureus ATCC 25923* était la plus sensible, suivie, dans un ordre décroissant de C2 :*E. fecalis ATCC 29212*, C1 :*B. cereus ATCC 11778*, C3 : *L. ivanovii ATCC 19119*, C5 : *St. aureus ATCC 43300* et C6 : *St. aureus spp.*, alors qu'en terme de la résistance, C6 puis C5 étaient les plus résistantes.

L'ensemble des isolats lactiques L'ensemble des isolats lactiques a subi, ensuite, une méthode directe de criblage qui a été refaite mais cette fois-ci sur gélose MRS tamponnée dans le but de déterminer la nature des facteurs inhibiteurs. Elle se limite à l'élimination de l'effet acide lié à la production des acides organiques au cours du processus fermentaire de ces genres bactériens. L'acide lactique est le métabolite principal de la fermentation de ces bactéries lactiques ; où il est en équilibre avec ses

formes dissociées et non dissociées et l'ampleur de la dissociation dépend de la valeur de pH. A pH bas, une grande quantité d'acide lactique est sous la forme non dissociée, de plus elle est toxique pour beaucoup de bactéries, champignons et levures (**Podolak et al., 1996**). Dans les produits fermentés, la baisse du pH dépend de la concentration en substrats fermentescibles. Elle est limitée par le pouvoir tampon du milieu et par le pH minimum toléré par les ferments. Le pH atteint dans certains des produits (saucisson sec, pH 5.3 à 4.5) des valeurs qui suffisent à éliminer certains contaminants (**Huang et al., 1986**). Les bactéries hétérofermentaires produisent des quantités d'acide organique autre que l'acide lactique. Les *Leuconostocs*, et les *Lactobacilles* hétérofermentaires produisent autant d'acétate que de lactate (**Kandler, 1983**).

La quasi suppression de l'effet acide est obtenue par la préparation de l'MRS dans une solution tampon phosphate à pH 7.02, 0.1 M qui maintient le pH autour de la valeur de 7. Or, la conjugaison du tampon au milieu de culture, la technique reste la même que pour le test précédent ainsi que les résultats exprimés et traités avec le même principe. La constatation et la mesure des zones d'inhibition n'ont pas sensiblement changé en comparaison avec l'intensité et les diamètres obtenus sur la gélose MRS non tamponnée, avec même des diamètres frôlant les 12 mm quelquefois (diamètre de puits non inclus). Elles étaient plus sensibles, dans cet ordre, les bactéries indicatrices : *B. cereus* ATCC 11778, *E. fecalis* ATCC 29212, *St. aureus* ATCC 25923 puis *L. ivanovii* ATCC 19119. Ce qui est remarquable pour cette l'étude de recherche, c'est sa ressemblance avec celle de l'effet antimicrobien et probiotique de *L. Plantarum* (**Mami A, 2014**) qui a utilisé le MRS tamponné pour la recherche de l'activité antagoniste de *L. Plantarum* envers une souche de *Bacillus* et les deux mêmes souches de référence : *St. aureus* ATCC 25923 et *L. ivanovii* ATCC 19119. *L. Plantarum* a donné des zones d'inhibition de 22 mm, 13 mm et 07 mm de diamètre (puits inclus) contre *St. aureus* ATCC 25923, *Bacillus* et *L. ivanovii* ATCC 19119 respectivement. Cela partage avec les résultats de la présente étude l'ordre de sensibilité entre *St. aureus* ATCC 25923 qui est la plus sensible et *L. ivanovii* ATCC 19119. En plus, si on n'en considère que les LAB classés au genre *Lactobacillus*, nous constatons que *St. aureus* ATCC 25923 et *B. cereus* ATCC 11778 ont été plus sensibles envers chacun de LK 06, 08, 11 et LK 12 avec des zones d'inhibition de 10 mm ou plus (+++) alors que *L. ivanovii* ATCC 19119 a réagi de la même manière sauf avec LK12 où le diamètre de la zone d'inhibition n'a pas atteint 10 mm (++) . Les résultats que nous avons obtenus

sont beaucoup plus intéressants que ceux de **Christ et al., (2015)** qui ont utilisé le milieu tamponné (tampon phosphate de sodium) et la technique dite (de sandwich), gardant le même principe de la méthode directe pour la recherche des LAB de sources animales.

Ce screening a conclu que *L. monocytogenes* était la plus sensible avec des zones d'inhibition marquées (++++) avec un bon nombre de souches lactiques test caractérisées comme productrices de bactériocines, parmi eux, deux souches de *St. aureus* (*St. aureus* ATCC 12600 et *St. aureus* ISP 178) et *E. faecalis* ATCC 19433 ; dont cette dernière en était quasiment résistante avec des interactions négatives envers environ la moitié des souches lactiques(- ou +), tandis que, les Staphylocoques étaient très moins sensibles que *L. monocytogenes*. Donc, les isolats lactiques, le cas de présente étude, sont plus performants que leurs souches lactiques, et inversement à laquelle, les Staphylocoques suivis d'*E. faecalis* sont les plus résistants des bactéries indicatrices testées. D'ailleurs, l'action des bactériocines est, essentiellement, dirigée vers les bactéries phylogénétiquement proches de la bactérie productrice ; c'est le cas, ici, pour *Enterococcus* et *Staphylococcus*.

L'investigation de l'activité antibactérienne est ensuite investiguée ; pour une confirmation, par la méthode indirecte (*well-diffusion-assay*). Elle a mis en jeu tous les isolats précédemment sélectionnés et les six (06) bactéries indicatrices. Cependant, les résultats n'ont pas atteint la taille d'être clairement perceptibles ; il s'agissait, le cas échéant, des zones d'inhibition à l'ordre de 1 mm, présentées par quelques isolats tests surtout envers C2 : *E. faecalis* ATCC 29212.

**Schillinger & Lücke, (1989)** ont obtenu des résultats similaires, en choisissant *L. sakei*, où les tests d'activité étaient positifs avec le spot agar test mais négatifs avec la diffusion en puits ; sur un total de 19 souches, seulement six (06) ont démontré des zones d'inhibition par la méthode de diffusion en puits. **Lewus et al., (1991)** ont trouvé qu'un petit nombre des souches testées positives par la méthode des spots ont donné des résultats positifs par la diffusion en puits. Ils ont considéré que le fait de permettre plus de temps à la diffusion des bactériocines avant l'incubation, ou d'augmenter le diamètre des puits pour recevoir plus de volume du surnageant peuvent améliorer la sensibilité de la technique. Selon ces auteurs, l'agrégation, les bactériocines non diffusables, l'inactivation par des protéases et l'effet de la

concentration peuvent tous conduire à de faux résultats négatifs pour la technique de *well-diffusion assay*.

S'ajoute à cela, les résultats négatifs peuvent montrer que la production des bactériocines n'est pas hautement conservée par quelques souches, vue que certaines bactériocines étant des protéines à médiation plasmidiques (codées par des plasmides) (**Tagg et al., 1976**). Il peut arriver que ces microorganismes peuvent, possiblement, perdre leurs plasmides après les transferts et les cultures répétitives conséquentes à la purification et aux repiquages de conservation et de préparation des cultures jeunes. Donc, pour chacune de ces explications, il y a des raisons et des fondements, mais il reste aussi intéressant de faire un suivi cinétique de la production des bactériocines touchant différents point sur la courbe de croissance des bactéries lactiques ; une étape qu'il fallait entreprendre, constituant ainsi une des limites de cette étude, permettant de repérer l'intervalle idéal auquel s'intensifie l'effet inhibiteur en coïncidence avec une meilleure production des métabolites à effet antibactérien (bactériocines). Ainsi, les 19 isolats ont affiché un pouvoir inhibiteur important et étaient sujets à divers tests pour caractériser leurs propriétés physiologiques et biochimiques pour les classer au niveau du genre. Pour se faire, on se réfère à la classification au stade du genre reposant sur la clé de différenciation phénotypique des bactéries lactiques établie par **Orla-Jensen, (1919)** et celle établie par **Axelsson, (2004)** (**annexe.5 et 6**).

Ainsi, avec la première clé basée, essentiellement sur la forme des cellules, la catalase et le type fermentaire, les isolats LK 03, 17, 18, 43, 47, 46, 49, et LK 50 sont des cocci, catalase-, homofermentaires et en appartiennent aux anciens genres *Streptococcus* et *Tetracoccus* dont *Streptococcus* comprend les genres actuels *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Vagococcus*, alors que *Tetracoccus* comprend les genres actuels *Pediococcus* et *Tetragenococcus*. Cependant, les isolats de forme cocci : LK 16, 20, 22, 25, 32, 40 et LK 42 diffèrent des précédents par leur type fermentaire qui est hétérolactique (produisent le CO<sub>2</sub>) pour appartenir, selon toujours la même clé à l'ancien genre *Betacoccus* composé des genres actuels de *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*. Pour le reste des isolats: LK 06, 08, 11 et LK 12 ont les caractéristiques des anciens genres *Thermobacterium* et *Streptobacterium* dont le premier est présenté actuellement par un seul genre ; *Lactobacillus* et le deuxième par *Lactobacillus* et *Carnobacterium* (appelé aussi *Lactobacillus-like* ou encore *atypical meat lactics*); ces quatre

isolats sont des bacilles homolactiques, catalase -.

En complément et selon, cette fois-ci, la deuxième clé (celle de **Axelsson, (2004)** rassemblant avec les moyens phénotypiques utilisés par **Orla-Jensen**, d'autres paramètres tels que la formation de tétrades, la croissance à différentes conditions d'incubation (températures, concentrations en NaCl et pH). Dans ce sens, les isolats de bactéries lactiques peuvent être répartis sur les genres, comme suit :

- Pour les isolats à catalase-, homolactiques LK 17 et LK 18, formant des tétrades, poussant à 45 °C et tolérant le pH 4.4 mais non pas le pH 9.6, dont LK 18 supporte une concentration en NaCl 6.5 % et LK 17 croit à 10 °C, ces deux isolats se conforment avec le genre *Pediococcus*. Tandis que, les isolats LK43 et LK 49 partagent avec LK 3 les caractéristiques de former des diplocoques et des tétrades et de pouvoir pousser à 10 et à 45 °C et ils tolèrent, en plus, 6.5 % de NaCl et non pas le pH 4.4 que LK 3 peut tolérer ;ces cinq isolats s'affilient, donc, soit au genre *Tetragenococcus* ou au *Aeorococcus*.
- Concernant les deux isolats LK 47 et 50 qui sont des coques en chainettes, ne formant pas de tétrades, homofermentaires, catalase-, poussant à 10 et à 45°C, supportant le pH 4.4 et 9.6 et la concentration 6.5 % de NaCl ; ils peuvent être agencés au genre *Enterococcus*. Alors que, l'isolat LK 46, de forme cocci, ne forme pas de tétrades, pousse à 10 et à 45 °C, homofermentaire, catalase-, ne supporte pas le pH 4.4 ni 6.5 % NaCl ; il s'attribue au genre *Streptococcus*.
- Quant aux isolats LK 16, 20, 22, 25, 32, 40 et LK 42, qui sont des coques, hétérofermentaires, catalase-, ne formant pas de tétrades, prospèrent au pH 4.4, ne poussant pas à 45 °C, au pH 9.6 mais aussi pas à 6.5 % de NaCl à l'exception de LK 32 et LK 42 ; ils s'attribuent aux genres suivants : *Leuconostoc*, *Oenococcus* ou *Weissella*.
- En ce qui concerne les isolats LK 6, 8, 11 et LK 12, qui sont des bacilles en mode d'association en palissades, catalase-, homofermentaires, ne se développent pas à 10 ni à 45 °C (faible croissance pour LK11) mais ils le font, par contre, au pH 4.4,notant que LK 6 et LK12 ne croissent pas à 6.5 % de NaCl (une concentration en NaCl que supportent LK 8 et LK 11) ; l'ensemble peut être groupé dans le genre *Lactobacillus*.

Et de cette manière (en suivant les deux clés), les isolats lactiques peuvent se répartir sur les genres lactiques à l'ordre de : 4 isolats, 21 %, (LK17, 18, 43 et LK 49) du genre *Pediococcus* ; 1 isolat, 6 %, (LK 3) du *Tetragenococcus*; 2 isolats, 11 %, (LK 47 et LK 50) au genre *Enterococcus*; 1 isolat, 6 %, LK 46 au genre *Streptococcus*; 4 isolats, 21 %, (LK 6, 8, 11 et LK 12) du genre *Lactobacillus* ; 7 isolats, 37 %, (LK 16, 40, 20, 25, 32, 22 et LK 42) entre *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*. D'autres études ont trouvé d'autres proportions à titre d'exemple celle de **Naimi M & Khaled M a, (2014)** avec 23 % *Pediococcus*, 4% *Streptococcus*, 53% *Lactobacillus* ou *Lactobacillus-like* et 20% *Lactococcus* ou *Vagococcus*.

L'identification au stade espèce pratiquée par une galerie miniaturisée, dont les puits (équivalents des cupules) sur gélose blanche (équivalente d'une microplaque), a donné des résultats caractérisés (+) pour une assimilation positive du sucre, (-) pour la non assimilation et (+/-) pour une faible assimilation du sucre. Ainsi, LK 17 et LK 18 LK 43 et LK 49 considérés apparentant à l'ancien genre *Tetracoccus* dont le nouveau genre *Pediococcus*, selon les deux clés de départ des clés dichotomiques (**Bergans T., 1999**), LK 18 montre le même profil de fermentation des sucres à l'exception du maltose que *Pediococcus acidilactici*.

Pour les isolats relevant du reste des genres, les tests d'assimilation et /ou de production réalisés n'ont pas été en mesure d'arriver à une comparaison fructueuse avec des profils d'identification des bactéries lactiques consultés dans la littérature (**Carr F, 2002 ; Bergans T., 1999 ; Samelis J., 1994 ; Morishita., 1986**) et les efforts effectués dans cette piste ont été entravés par l'insuffisance des paramètres entretenus dans la mesure du possible et dont certains sont déterminants pour conclure une des conclusion significatives à propos du rang taxinomique espèce. Donc, sont restés identifiés au niveau d'un genre ou plus, comme ci-après, les isolats: LK3 (*Tetragenococcus sp*), LK 47 et LK 50 (*Enterococcuspp.*), LK 6 et LK 8 (*Streptobacterium Lactobacillus* et *Carnobacterium spp.*), LK11 et 12 (*Lactobacilluspp.*), LK 46 (*Streptococcus sp*) et LK 16, 20, 22, 25, 32, 40 et LK 42 (*Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella spp.*)

La dernière partie de cette recherche a concerné les isolats les plus performants (les 19 isolats) par une étude des propriétés technologiques à savoir deux pouvoirs (protéolytique et lipolytique) et la production de deux substances (EPS et

acétoïne). Ces derniers peuvent être utilisés comme agents d'amélioration de la texture et du goût, et par une étude des propriétés probiotiques à savoir la résistance aux conditions gastriques simulées et aux sels biliaires.

S'agissant de pouvoir protéolytique réalisé *in vitro* sur gélose MRS additionnée de lait écrémé à raison d'une concentration massique de 10 g par % ; Chacun des isolats appartenant au genre *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc spp.*, *Oenococcus spp.*, *Weissella spp.*, et *Tetragenococcus spp.* ont exprimé un pouvoir protéolytique par l'apparition d'un halo clair autour des spots, dont les plus importantes plages de lyse ont été démontrées, essentiellement, par l'isolat LK 17 (*Pediococcus*), LK 49 et LK 43 (*Tetragenococcus spp.*), LK 8 (*Lactobacillus spp.*). Quant au pouvoir lipolytique seuls les deux isolats LK 49 et LK 43 (*Tetragenococcus spp.*) ont démontré un pouvoir lipolytique, constaté par une formation des dépôts autour des spots de croissance ; une activité qui a été, plus importante pour LK 43. De cette manière, l'ensemble des isolats lactiques ont démontré une activité lipolytique négative sauf pour les deux individus du genre *Tetragenococcus spp.* qui sont été révélés positifs. Ces résultats ressemblent, pour *Lactobacillus spp.* aux résultats obtenus par **Crow et al., (1994)** qui ont montré que les Lactocoques possèdent une faible activité lipolytique. Cependant, pour le pouvoir aromatisant révélé par la production d'acétoïne, il a été constaté que quatre isolats représentant trois genres : LK 49 et LK 43 (*Tetragenococcus spp.*) LK 46 (*Streptococcus spp.*), LK 47 (*Enterococcus spp.*) sont arrivés à le produire avec des intensités comparables. Tandis que **Van K et al., (2002)** ont y rapporté que les bactéries lactiques possèdent, souvent, une activité protéolytique et/ou lipolytique, et elles sont aptes d'élaborer des composants aromatiques à partir des acides aminés.

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des EPS joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés (**Welman & Maddox, 2003 ; Ruas-Madiedo et al., 2002**). Ces composés polymères sont généralement considérés comme des agents épaississants naturels en industrie alimentaire. La production, *in vitro*, des EPS dans un milieu richement saccharosé a dévoilé que seulement les isolats (LK 6, 8, 11 et LK 12) du genre *Lactobacillus spp.* ont un pouvoir remarquable de production des EPS remarquable ; Il est rapporté, dans ce sens, que les *L. delbrueckii ssp. Bulgaricus* produisant des EPS sont utilisés en tant que starters

fonctionnels dans la fabrication afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis (**Durlu-Özkaya et al., 2007 ; Amatayakul et al., 2006**).

La tolérance à l'acidité et à la bile sont deux qualités requises pour les microorganismes probiotiques comme ils doivent survivre lors du passage dans le tube gastro-intestinal. Le bas pH et l'action de la pepsine tuent les microorganismes entrant dans l'estomac après l'ingestion. Les acides biliaires dans l'intestin grêle, ont une fonction semblable au détergent et sont, ainsi, critiques pour les microorganismes qui ont des membranes composées de lipides et des acides gras. La concentration de la bile varie de 1.5 à 2.0 % dans la première heure de la digestion, avant de décroître à environ 0.3 % (**Noriega et al., 2004**). La survie des microorganismes probiotiques sous des conditions simulées de du tube digestif humain est testée pour évaluer leurs capacités à agir *in vivo* et exercer leurs effets bénéfiques (**Holzappel W et al., 1998 ; Klaenhammer T et al., 1999**). Approximativement, 2.5 L de jus gastrique et 1 L de bile sont sécrétés dans la lumière digestive humaine chaque jour. Pour cela, il est essentiel pour la bactérie d'avoir un système de protection pour persister dans un pH acide, dans l'estomac et avec les enzymes digestives et la bile dans l'intestin grêle.

Ces deux tests réalisés *in vitro*, ont donné pour la résistance aux conditions gastriques simulées une croissance abondante pour les : 2 isolats de genre *Lactobacillus spp.* (LK 11 et LK 12) ; 1 isolat de LK 18 de genre *Pediococcus*, et 2 isolats (LK 40 et 32,) de genre *Leuconostoc*, *Oenooccus* et *Weissella spp.*, contrairement aux isolats ayant un pouvoir de production d'acétoïne. Quant à la résistance aux sels biliaires, les isolats ayant une croissance très abondante, les isolats *Lactobacillus* (LK 11, 08 et LK 12), (*Pediococcus*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus spp.*) respectivement LK 18, 50 et LK 03.

Une étude conduite par **Vizoso P et al., (2006)** sur 35 souches de *Lactobacillus sp.*, a révélé la tolérance de 07 souches au stimulus stomaco-duodéal avec une survie qui varie entre 11% et 93% et cela peut se comparer, relativement, aux quatre isolats *Lactobacillus spp.* (LK 11, 12, 8 et LK 6) dont seulement LK8 était précaire à tolérer l'effet acide simulé de l'estomac, quand les LK 11, 12 et LK 6 ont montré une bonne tolérance aux deux stimuli (acidité et bile), parallèlement, et pour certaines espèces de ce genre, des résultats obtenus par **Burns et al. (2008)** montrent que la

majorité des souches de *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* sont sensibles aux sels biliaires. **Zago et al. (2011)** ont constaté des moyennes de survie entourant les 40% chez des Lactobacilles isolés d'un biotope différent (lait et fromage)

En terme de cette discussion, six isolats (LK 8, 11 et LK 12 ; LK 18 ; LK 43 et LK 49) (*Lactobacillus* spp.; *Pediococcus acidilactici*, *Tetragenococcus* spp.) à grand potentiel antibactérien notamment contre *St. aureus* ATCC 25923, *E. fecalis* ATCC 29212, *B. cereus* ATCC 11778 et *L. ivanovii* ATCC 19119 ; avec des diamètres atteignant les 12 mm (diamètre des puits non inclus) et jouissent, en plus, des qualités technologiques et probiotiques, ont été isolés, identifiés à titre présomptif et conservés dans une intention d'exploiter les prérogatives qu'ils viennent de prouver.

---

## Conclusion

Cette étude des LAB, de la viande salée et séchée (*Khliiaa*), a été effectuée dans le but d'évaluer leur éventuelle capacité antibiotique qui peut définir leur vocation à la bio-conservation des produits carnés, notamment, avec, au même coup, la réalisation de quelques épreuves technologiques et probiotiques. L'isolement a été réalisé en utilisant le MRS acidifié (pH 5.2) et le MRS à la vancomycine (MRS-VA-VBC), tandis que, l'étude de la capacité antimicrobienne s'est inspirée des deux méthodes *spot gar test* et *well-diffusion-assay*. Ainsi, 50 isolats ont été obtenus et soumis à une identification préliminaire avant d'être testés contre six bactéries indicatrices où *St. aureus ATCC 25923* était la plus sensible, suivie, dans cet ordre, d'*E. fecalis ATCC 29212*, *B. cereus ATCC 11778* et *L. ivanovii ATCC 19119* avec des diamètres d'inhibition arrivant au 10 mm et plus. Dès lors, ce criblage a permis de choisir 19 isolats; les plus performants pour les identifier à la base des caractéristiques morphologiques des colonies et de cellules ainsi que des tests physiologiques et biochimiques suivis d'une étude des propriétés technologiques et probiotiques.

Par conséquent six isolats (LK 8, 11 et LK 12 ; LK 18 ; LK 43 et LK 49) (*Lactobacillus spp.*; *Pediococcus acidilactici*; *Tetragenococcus spp.*) dont seul LK 18 a été identifié au stade de l'espèce, ont affiché des propriétés technologiques et ont répondu très favorablement aux tests primaires de l'effet probiotique.

En ce qui concerne l'activité antimicrobienne enregistrée dans cette expérimentation, il reste préoccupant que le test soit effectué dans un sens qu'il soit occasionné avec le pic de la production des bactériocines voire même avec une optimisation pour une meilleure fonctionnalité à la bioprotection. Occasionnellement, et à propos de l'étude des caractéristiques probiotiques, la qualification (probiotique) n'est considérée qu'après une identification phylogénétique et/ou moléculaire parfaite en se recourant, par exemple, à l'analyse de l'ARN ribosomique 16s et l'hybridation de l'ADN, etc. En plus, il est indispensable de réaliser un antibiogramme pour proscrire toute possibilité d'antibiorésistance; encore, des épreuves *in vitro*, entre autres restent pertinentes à faire pour continuer un tel travail de recherche et elles-mêmes se parfaire par une étude toxicologique et des essais *in vivo* pour un usage serein de ces microorganismes.

## Références bibliographiques

- Abee T., Krockel L. & Hill C., 1995.** Bacteriocins: modes of action and potentials in food. *Int J Food Microbiol* 28: 169- 185.
- Adams M.R. & Marteau P., 1995.** On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int J Food Microbiol* 27 : 263-264.
- Adams M. & Mitchell R., 2002.** Fermentation and pathogen control: a risk assessment approach. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 75e83.
- Aguirre M. & Collins M.D., 1993.** Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol* 75 : 95-107.
- Alander M., Satokari R., Korpela R., Saxelin M., Vilpponen-Salmela T., Mattila-Sandholm T., et al., 1999.** Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1), 351-354.
- Alaoui I M., Guilal J., Hamama A., Saidi B. & Zahar M., 2016.** Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc. *The International Journal of Multi-disciplinary Sciences*, 81 : 81-94
- Amatayakul T., Halmos A.L., Sherkat F. & Shah N.P., 2006.** Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*. Vol. 16, 40-51.
- Ammor S., Grégoire T., Dufour E. & Chevallier I., 2006.** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small- scale facility . 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17 : 454-461 .
- Andrea M., Leandro B Rodríguez-Aparicio., Nicolás N., 2012.** In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of functional foods*.
- Ashraf R. & Shah N. P., 2011.** Selective and differential enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt- a review. *International Journal of Food Microbiology* 149:194-208.
- Atte von W., Graciela V., 2016.** Screening and characterization of potential probiotic and starter bacteria for plant fermentations. *ResearchGate*.
- Axelsson L., 2004.** *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* .3e. Édité par S Salsinen, A.V Wright, & A. Ouwehand. Vol. 633. New York, USA: Marcel Dekker.
- Axelsson L., 2004.** Classification and physiology In: *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*. Salsinen S., Wright A.V., Ouwehand A. 3e Ed. New York, Marcel Dekker, Inc, vol. 633, 1 - 66.
- Axelsson L., 1998.** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen S et Von Wright A. (ed.). *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1-72.

- Ayr-hartinag A., Hedges A. J., Berkeley R. C. W., 1972.** Methods for Studying Bacteriocins. In: Norris J. R., Ribbons D.W., Methods in Microbiology Volume 7A, Academic Press, London, 315-422.
- Aymerich T., Garriga M., Monford J.M., Nes I.F. & Hugas M., 2000.** Bacteriocin producing lactobacilli in Spanish - style fermented sausages: Characterization of bacteriocins .Food Microbiology 17: 33 – 45.
- Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., M Kihal. & R Ouzrout., 2005.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle. *Sci. Technol* 23: 30-37.
- Balgir P. P., Kaur B., Kaur T., Daroch N. & Kaur G., 2013.** In vitro and in vivo survival and colonic adhesion of *Pediococcus acidilactici* MTCC5101 in human gut. *BioMed research international*, 2013, 583850.
- Balon T.W. & Yerneni K., 2001.** Redox regulation of skeletal muscle glucose transport. *Medicine and Science in Sports and Exercise*33: 382 – 385.
- Belfiore C., Castellano P. & Vignolo G., 2007.** Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators. *Food Microbiology*, 24(3), 223e229.
- Barefoot S.T. & Klaenhammer T.R., 1983.** Detection and activity of lactacin B. a bacteriocin produced by *Lactococcus acidophilus*. *App.Envoron.. Microbial*.45: 1808-1815.
- Belkheir K., 2017.** Caractérisation technologique de nouvelles souches de bactéries lactiques isolées du lait de chamelle d'Algérie. Réalisation de ferments lactiques. Thèse de Doctorat. Département de Biotechnologie. Faculté des Sciences. Université d'Oran: 54p, 59p.
- Belyagoubi L., 2014.** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. 170p.
- Bergans T., 1999.** factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins, *International Journal of Food Microbiology* 46 (1999) 207-217.
- Bhattacharya S. & Das A., 2010.** Study of Physical and Cultural Parameters on Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Indian Fermented Foods. *American Journal of Food Technology*, 5, 111-120.
- Bennani L., Zenati Y., Faid M. & Ettayebi M., 1995.** Physicochemical and microbiological characteristics of kaddid, a traditional salted/dried meat product in Morocco. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20, 528-32.
- Benkerroum N. & Tamime A.Y., 2004.** Technology transfer of some Moroccan: a review. *Food Microbiol* 21 : 399–413.

- Blackmer D.S., Mandigo R.W., Eilert S.J., Calkins C.R. & Osburn W.N., 1997.** Effect of spray dried beef broth on the sensory, textural and cooking characteristics of grilled or broiled low fat ground beef patties. *Journal of Muscle Foods* 8, 465–479.
- Boccard R. & Valin C., 1984.** Les viandes, *Information Techniques des services Vétérinaires* .p 93-96.
- Boudechicha H R., 2014.** Khliaa Ezir, un produit carné traditionnel Algérien : préparation, caractérisation microbiologique, physico-chimique et sensorielle. Mester thesis. Constantine, Algeria. P156. Available as a hard copy at Université Mentouri Constantine 1.
- Bourgeois C.M. & Larpent J.P., 1996.** Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 432-704.
- Brenner D. J., Krieg N. R., Garrity G. M. & Staley J. T., 2005.** *Bergey's manual of systematic bacteriology: The proteobacteria* Springer.
- Brewer S., 2010.** Technological Quality of Meat for Processing. In handbook of processing meat. Edition a John Wiley & Sons, Inc., Publication, p 26, 32.
- Burns P., Vinderola G., Binetti A., Quiberoni A., de los Reyes-Gavilan C.G. & Reinheimer J., 2008.** Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *Int. Dairy J.* 18 :377-385.
- Butel M-J., (cité 13 mars 2014).** Les probiotiques et leur place en médecine humaine. *J Anti-Infect* (Internet). Disponible sur:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210654514000118>
- Çadirci B.H. & S Çitak., 2005.** A Comparison of Two Methods Used for Measuring Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(4): 237-241.
- Carr F. J., Chill D. & Maida N., 2002.** The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 281E370.
- Caplice E., Fitzgerald G.F., 1999.** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol*50: 131–149.
- Casadei G., Grilli E. & Piva A., 2009.** Pediocin A Modulates Intestinal Microflora Metabolism in Swine in Vitro Intestinal Fermentations. *Journal of Animal Science*, 87, 2020-2028.
- Casalta E., Vassal Y., Desmazeaud M.J. & Casabianca F., 1995.** Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus lactis* isolated from Corsican goat milk and cheese. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft& Technology* 28, 291- 299.
- Centeno J. A., Cepeda A. & Rodriguez-Otero J. L., 1996.** Lactic Acid Bacteria Isolated from Arzua Cows' Milk Cheese. *Int. Dairy Journal*, 6 : 65-78
- Chavarri E.J., Nunez J.A. & Nunez M., 1983.** Behavior of *Streptococcus lactis* in heat treated (80 °C for 30 min) or sterilized cow's or ewe's milk. *Journal of Dairy Research*, 50, 357-363.

- Cholet O., 2006.** Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.16.
- Chou L.S. & Weimer B., 1999.** Isolation and Characterization of Acid and Bile-Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82, 23-31.
- Chris H et al., 2015.** Isolation and Taxonomic Identity of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Retail Foods and Animal Sources. ISSN 2076-2607. [www.mdpi.com/journal/microorganisms](http://www.mdpi.com/journal/microorganisms).
- Clarke G., Cryan J.F., Dinan T.G. & Quigley E.M., 2012.** Probiotics for the Treatment of Irritable Bowel Syndrome—Focus on Lactic Acid Bacteria. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 35, 403-413.
- Coelho L. F., de Lima C. J. B., Rodovalho C. M., Bernardo M. P. & Contiero J., 2011.** Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 Grown in molasses: Optimization of medium Composition. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(01): 27 - 36.
- Coeuret V., Dubernet S., Bernardeau M., Gueguen M. & Vernoux J., 2003.** Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*, 83 (4): 269-306.
- Coibion L., 2008.** Acquisition des qualités organoleptiques de la viande bovine. Adaptation à la demande du consommateur, p 7-25.
- Comelade E., 1995.** Technologie des aliments et hygiène alimentaire 2eme cahier. 5eme edition. Edition Jaques LANOR, p 227-239.
- Corsetti A., De Angelis M., Dellaglio F., Paparella A., Fox P.F., Settanni L. & Gobbetti M., 2003.** Characterization of sourdough lactic acid bacteria based on genotypic and cell-wall protein analyses. *Journal of Applied Microbiology*, 94 :641-654
- Cortez Sawitz M. & Fiorentini Â. M., 2007.** *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented sausages and their technological properties for application as starter cultures. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(2): 340-345
- Cotter PD., O'Connor PM., Draper LA., Lawton EM., Deegan LH., Hill C et al., 2005.** Posttranslational conversion of L-serines to D-alanines is vital for optimal production and activity of the lantibiotic lactacin 3147. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18584-18589.
- Craplet C., 1966.** La viande de bovins .Tome I .Ed Vignot frère, Paris, p 74-86.
- Crews J., 2011.** Unveiling ideas. New food products highlight quality, convenience and flexibility. *Meat & Poultry*. April, pp. 105-107.
- Dal Bello, F., Hertel, C., 2006.** Oral cavity as natural reservoir for intestinal lactobacilli. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 69-76.

- Daoudi A, Frenzt J.C., Martin J.L. & Mekhtiche L., 2006.** Les produits charcuteries halal: Charcuterie et préparations bouchères. Conflandey: MAE-ERTI. P 492.
- Daurmaun D., 1990.** La viande et besoins protéiques chez l'homme sain. Dans viande et alimentation de l'homme savoir, raison et harmonie P21.
- Dawood A.A., 1995.** Physical and sensory characteristics of Najdi-Camel meat. *Meat Science* 39, 59- 69.
- Debiton E., 1994.** Viande facteurs biologiques impliqué. Thèse présentée pour l'obtention du diplôme d'étude approfondie, science des aliments. Université Blaise Pascal .34p.
- de Ambrosini V.M., S Gonzalez., G Perdigon., A.P de Ruiz Holgado. & G Oliver., 1996.** Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. *Chem Pharm Bull* 44: 2263-2267.
- De Angelis M., Corsetti A., Tosti N., Rossi J., Corbo M. R & Gobbetti M., 2001.** Characterization of Non-Starter Lactic Acid Bacteria from Italian Ewe Cheeses Based on Phenotypic, Genotypic, and Cell Wall Protein Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67( 5): 2011-2020
- De Champs C., Maroncle N., Balestrino D., Rich C. & Forestier C., 2003.** Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus* Lcr35, after oral consumption. *Journal of clinical microbiology*, 41(3), 1270-1273.
- De Man J. C., Rogosa M., Sharpe M., Elisabeth., 1960.** A medium for the cultivation of lactobacilli, *J. appl.Bact.* 23 (1) 130-135.
- de Martinis E. C. P., Santarosa P. R. & Freitas F. Z., 2003.** Caracterização preliminar de bacteriocina produzidas por seis cepas de bactérias lácticas soladas de produtos cárneo sembalados a vácuo. *Ciência&Tecnologia de Alimentos*, 23,195e199.
- De Rossart H.B. & Luquet F.M., 1994.** Bactéries lactiques, I, II", Loriga Chemin saint Georges, F-38410 France.
- Desmazeaud M., 1983.** L'état de connaissance en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le lait.* p 271, 286-290.
- Dicks L.M.T. & Endo A., 2009.** Taxonomic Status of Lactic Acid Bacteria in Wine and Key Characteristics to Differentiate Species. *S. Afr. J. Enol Vitic.*, 30, (1):72-90.
- Diep D.B. & Nes I.F., 2002.** Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram+ bacteria. *Curr. DrugTargets*, 3, 107-122.
- Domínguez M., Carmen., DE LA Rosa M., Borobio M. & Victoria., 2001.** Application of a spectrophotometric method for the determination of post-antibiotic effect and comparison with viable counts agar, *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 47: 391-398.
- Donkor O.N., HeNriksson A., Vasiljevic T. & Shaha N.P., 2007.** Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *INRA, EDP Sciences*. 86: 21-38.

- Dortu C. & P Thonart., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques . *Biotechnol.Agron. Soc. Environ* 13: 143-154.
- Dover S.E., Aroutcheva A.A., Faro S. & Chikindas M.L., 2008.** Natural Antimicrobials and Their Role in Vaginal Health: A Short Review. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 3, 219-230.
- Doyle M.P., Meng J., 2006.** Bacteria in Food and Beverage Production. In : Dworkin ., Falkow Stanley., Rosenberg Eugene., Schleifer Karl-Heinz, Stackebrandt Erko. *The Prokaryotes*, Third Edition, Springer : 797-811.
- Draganski A., 2012.** Inventor; Highland Park, NJ, US, assignee. Jan 19. Dried meat snack and process of preparation thereof.US Patent 20,120,015,074.
- Drider J. & H Prevost., 2009.** *Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles.* Paris: Economica.
- Dumont R.L. & Valin C., 1982.** Bases biochimiques de l'hétérogénéité du tissu musculaire et des viandes. Ed INRA .Paris .p77.
- Durlu-Ozkaya F., Xanthopoulos V. ,Tunail N. & Litopoulou-zanetaki E., 2001.** Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 861-870
- Durlu-Özkaya F., Aslim B. & Taha Ozkaya M., 2007.** Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria. *LWT -Food Science and Technology*. Vol. 40, 564-568.
- El-ghaish S., Ahmadova A., Hadji-sfaxi I., El mecherfi K.E., Bazukyane I., Choiset Y., Rabesona H., Sitohy M., Popov Y.G., A. Kuliev A., Mozzi F., Chobert J.M. & Haertlé T., 2011.** Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Tre. Food Sci. Technol.* 1-8.
- Ehrmann M. A., Freiding S. & Vogel R. F., 2009.** *Leuconostocpalma* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from palm wine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 59: 943-947
- El-Ghaish S., A. Ahmadova I. Hadji Sfaxi K., El Mecherfi I., Bazukyan Y., Choiset H., Rabesona M., Sitohy Y., Popov A., Kuliev F., Mozzi J., Chobert & T. Haertle., 2011.** Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Science & Technology*, 22: 509-516.
- Elrammouz R., 2005.** Etude des changements biochimiques post mortem dans le muscle des volailles .Contribution au déterminisme de l'amplitude de la diminution du pH, p 3-4.
- Essid I., Ben Ismail H., Ahmed S., Ghedamsi R., El Malti J. & Hassouna M., 2007.** Technological properties and characterization of *Staphylococcus xylosus* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science* 77, 204-212.

- European Food Safety Authority (EFSA), 2006.** Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the Commission related to the use of nisin (E 234) as a food additive. *EFSA J* 314:1–16.
- Facklam R. & Elliott J. A., 1995.** Identification, Classification, and Clinical Relevance of Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci, Excluding the Streptococci and Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 479–495.
- FAO/WHO., 2002.** Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Ontario, Canada, 1-11.
- FAO., 2000.** Abattage, découpe de la viande et traitement ultérieur. *FAO.Rome P23-44*.
- FAO/WHO., 2002.** Guidelines for the evaluation of probiotics in foods, Report of a JointFAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, World Health Organization, Geneva, Switzerland
- Farkye N.Y., Madkor S.A. & Atkins H.G., 1995.** Proteolytic abilities of some lactic acid bacteria in a model cheese system. *Int Dairy J* 5: 715–725.
- Farouk M.M., 1983.** Production of Kilishi. BSc Thesis. University of Maiduguri, Maiduguri, Nigeria.
- Felis G. E. & Dellaglio F., 2015.** Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.*, 8: 44-61.
- Fitzpatrick J. J. & Keeffe U. O., 2001.** Influence of whey protein hydrolyzate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. *Proc. Biochem* 37: 183–186.
- Fleming H. P., Etchells J. L., Costilow R. N., 1975.** Microbial Inhibition by an Isolate of *Pediococcus* from Cucumber Brines, *Applied Microbiology*. Vol 30 N°6: 1040-1042.
- Foligné B., Daniel C., Pot B., 2013.** Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Curr Opin Microbiol.*;16(3):284–92.
- Fosse J.A.S., 2003.** Les dangers pour l'homme liés à la consommation des viandes. Evaluation de l'utilisation des moyens de maîtrise en abattoir. Thèse de l'Ecole nationale vétérinaire de NANTES. p24-46.
- Fournier V., 2003.** La conservation des aliments. Cours de microbiologie générale, Université Laval. p 12.
- Franciosi E., Settanni L., Cavazza A. & Poznanski E., 2009.** Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*, 19 :3-11
- Frayse J.L. & Darre A., 1990.** Composition et structure du muscle évolution post mortem qualité des viandes volume 1. Lavoisier technique et documentation. Paris. p374.
- Gailani M.B., 1986.** Water activity in relation to microbiology during processing and storage of Sudanese dried beef (Sharmoot). *Dissertation Abstracts International*, B 46, 2513–2514.

- Galvez A, H Abriouel., R.L Lopez. & N Ben Omar., 2007.** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation . *Int J Food Microbiol*120 ( ): 51–70.
- Garneau S., Martin N.I. & Vederas J.C., 2002.**Two peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochemistry*, 84, 577-592.
- Geay Y., Bauchart D., Hocquette J-F. & Culioll J., 2002.** Valeur diététique et qualités sensorielles des viandes des ruminants .Incidence de l'alimentation des animaux .INRA Prod, Anim, p 15.
- Gemelas L., Rigobello V., Ly-Chatain M.H. & Demarigny Y., 2013.** Selective *lactococcus* Enumeration in Raw Milk. *Food and Nutrition science*, 4 :49-58.
- Gemelas J.I., Rodreguez-Aonso P. & Centeno J.A., 2008.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cow's milk cheeses currently produced in Calicia ( NW Spain). *LWT-Food sci.Techo.*, 41(8): 1452-1449.
- Gerrit S., Bart A.S. & Wim J.M.E., 2005.** Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS.Microbiol. Rev.* 29 : 591-610.
- Ghraiiri T. & Hani K., 2013.** Enhanced bactericidal effect of enterocin A in combination with thyme essential oils against *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7. *Journal of Food Science and Technology*, 1e9.
- Gilarová R., Voldrich M., Demnerová K., Cerovský M. & J Dobiás., 1994.** Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria.
- Gondret F., Elrammouz R., Fernandez X. & Combes S., 2004.** Influence de l'exercice physique au cours de l'engraissement sur le métabolisme musculaire chez le lapin .viande et Production 10eme journée, science du muscle et technologies des viandes 25-26 octobre 2004. 35-36.
- Goulet O., 1990.** Le fer dans l'organisme humain. Dans viande et alimentation de l'homme savoir, raison et harmonie P49.
- Guessas & Kihel., 2004.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goat's arid zone .*Afr.J.biotechnol.* Vol 3.(6), pp.339-342.
- Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food (Internet). (cité 6 déc 2015).**  
Disponible sur: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>
- Guillem M., Genot C. & Hocquette J.F., 2009.** La maîtrise de la tendreté de la viande bovine : identification de marqueurs biologiques. p 331, 334.
- Guiraud J.P., 2003.** Microbiologie alimentaire. Dunod – RIA. p696, 144.
- Guiraud J.P., 1998.** Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agro-alimentaire, Eds. Dunod Paris, 652 p.
- Guiraud J.P & Galzy. P., 1980.** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Les éditions de l'usine nouvelle. P 239.
- Guiraud J., Galzy P., 1980.** L'analyse Microbiologique dans les industries alimentaires.L'usine. P235.

- H. Musikasang., Sohsomboon N., Tani A., Maneerat S., 2012.** Bacteriocin-producing lactic acid bacteria as a probiotic potential from Thai indigenous chickens, *Czech J. Anim. Sci.*, 57, 2012 (3): 137–149
- Hancock R.E. & Chapple D.S., 1999.** Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 1317-1323.
- Hardie J.M. & R.A. Whiley., 1997.** Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Appl Microbiol Symposium Supplement* 83 (): 1-11.
- Harris L. J., Daeschel M. A., Stiles M. E., Klaenhammer T. R., 1989.** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*, *Journal of food protection*. vol 52 () 384-387.
- Hart T., Shears P., 1997.** Atlas de poche de Microbiologie. Flammarion, Paris. P314.
- Hartemink R; Domenech VR. & Rombouts FM., 1997.** LAMVAB - a new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiology Methods* 29: 77-84.
- Heikal H.A., El-Dashlouty M.S. & Saied S.Z., 1972.** Biochemical, histological and technological changes occurring during the production of sausage from camel meat and beans. *Agricultural Research Review* 50, 243–252.
- Heinz G. & Hautzinger P., 2007.** Meat Processing Technology for Small-to Medium-Scale Producers. RAP Publication 2007/20. FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand.
- Hemme D. & Foucaud-Scheunemann C., 2004.** *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14 : 467-494
- Henry D., 1992.** Alimentation et nutrition humaines. ESF. Paris.
- Ho Thi Nguyet T., 2008.** Etude de la flore lactique du nem chua, produit carne fermente cru traditionnel du sud Vietnam et maitrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit. Thèse de Docteur Sciences N°3738. Université bordeaux 1 France.182P.
- Ho T.N.T., N. Tuan N., Deschamps A. & Caubet R., 2007.** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology*. 134-142.
- Holzapfel W. H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. & Schillinger U., 2001.** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*,73(suppl):365S-373S.
- Holzapfel W.H., Haberer P., Snel V J., Schillinger J. Huisin't Veld., 1998.** Overview of gut flora and probiotics, *International Journal of Food Microbiology* 41 (1998) 85-101.

- Hondrodinou O., Kourkoutas Y. & Panagou E., 2011.** Efficacy of natamycin to control fungal growth in natural black olive fermentation. *Food Microbiology*, 28(3), 621e627.
- Hossein N., Hossein T., Karim M., Seyed M R R., Ali E. & Payman Z., 2013.** Validation of drop plate technique for bacterial enumeration byparametric and nonparametric tests. *Veterinary Research Forum*. 2013; 4 (3) 179 – 183.
- Huang L., Forsberg C.W. & Gibbins L.N., 1986.** Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutylicum* intracellular pH and cellular distribution of fermented products. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1230-1234.
- Huff-Lonergan E. & Lonergan S.M., 2005.** Mechanisms of water - holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science* 71: 194 -204.
- ICMR:** Indian Council of Medical Research Task Force; Co-ordinating Unit; Co-ordinating Unit DBT (2011) ICMRDBT guidelines for evaluation of probiotics in food. *Indian Journal of Medical Research*, 134, 22-25.
- Igene J.O., Farouk M.M. & Akanbi C.T., 1990.** Preliminary study on the traditional processing of Kilishi. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 50, 89–98.
- Igene J.O., 2008.** Traditional African Meat Products for Food Security. *Traditional African Meat Products for Food Security and Agro-Industrialization: Development Challenges*. Lambert AcademicPublishing, Theodor-Heuss-Ring, Köln, Germany.
- Interbew., 2005.** Le point sur l'alimentation des bovins et ovins et la qualité des viandes. Institut de l'Élevage (I. MOËVI). p 80, 98, 99,101.
- ISO 9000 : 2015.** Système de management de la qualité ; principes essentiels et vocabulaires.
- Jacobsen C., Nielsen V., Hayford A., Moller P., Michaelsen K., Paerregaard A et al., 1999.** Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4949-4956.
- Janz J., Morel P., Purchas R., Corrigan V., Cumarasamy S., Wilkinson B. & Hendriks W., 2008.** The influence of diets supplemented with conjugated linoleic acid, selenium, and vitamin E, with or without animal protein, on the quality of pork from female pigs. *Journal of Animal Science* 86 (6): 1402-1409.
- Jay J. M., 1982.** Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl Environ Microbiol.*, 44(3): 525- 532.
- Jay J.M., Loessner M.J. & Golden D.A., 2000.** Modern food microbiology. Food science text series. Springer Science & Buniss Media, Inc. 6e Ed. 637.
- Joanisse D.R., 2004.** Skeletal muscle metabolism and plasticity. In *Functional Metabolism, Regulation and Adaptation*, K. B. Storey (ed.), pp. 295 – 318. Hoboken, N.J.: Wiley - Liss.

- Jones Rhys J., Hussein H M., Zagorec M., Brightwell G., Tagg J R., 2008.** Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat, *Food Microbiology*. 25: 228–234.
- K Suresh B N., Jamila K Adam. & Patrick G., 2012.** The use of probiotics and safety concerns: A review. *African Journal of Microbiology Research* Vol.6(41), pp. 6871-6877, 27 October,.
- Kalilou S. & Zakhia N., 1999.** Traditional methods of processing meat in Niger. *Tropical Science* 39, 18–22.
- Kanza et al., 2012.** Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Nature & Technologie*
- Kerry J., Kerry J. & Ledward D., 2002.** Meat processing Improving quality: Defining meat quality. P 10, 20.
- Khalisami et al., 2012.** Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw meat. *Elixir Bio Tech*. 46 (2012) 8065-8066.
- Kieran Jordan et al., 2014.** Microbes versus microbes: control of pathogens in the food chain. (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.6735.
- Klaenhammer T.R., Kullen M.J., 1999.** Selection and design of probiotics, *International Journal of Food Microbiology* 50 (1999) 45-57.
- Klaenhammer T.R., 1988.** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70 : 337-349.
- Klaenhammer T.R., R Barrangou B B. & M.A Azcarate-Peril., 2005.** Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev* 29: 393-409.
- Klein G., Pack A., Bonaparte C. & Reuter G., 1998.** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 41: 103–125.
- König H. & J Fröhlich., 2009.** *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine.* Édité par SpringerVerlag. Berlin Heidelberg,.
- Labadie J., 2006.** les écosystèmes microbiens dans les produits carnes., NRA. 11ieme JSMTV, 147-152.
- Iaconelli C, Lemetais G, Kechaou N, Chain F, Bermúdez-Humarán LG, Langella P, et al., 2015.** Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. *J Biotechnol.*;214:17-26.
- Lafarge V., Ogier J.C., Girard V., Maladen V., Leveau J.Y., Gruss A. & Delacroix-Buchet A., 2004.** Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 5644-5650.
- Lameloise P., Roussel-Ciquard N. & Rosset R., 1984.** Evolution des qualités organoleptiques. Les viandes, informations Techniques des Services Vétérinaires.
- Lane C.N. & Fox P.F., 1996.** Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*.6, 7, 715-728.

- Larpent-Gourgaud M *et al.*, 1997.** Les ferments lactiques et bactéries apparentées in: Microbiologie alimentaire, technique de laboratoire, Lavoisier, paris : 199-255.
- Larpent J.P., 1997.** Microbiologie alimentaire, Technique de laboratoire. Editions Lavoisier, p 860-870.
- Larpent j.P., 1997.** Microbiologie alimentaire. Tec & doc, Lavoisier. Paris. 10-72.
- Larpent J. P., 1997.** Microbiologie des viandes. In : LARPENT J. P.K, Microbiologie alimentaire, technique de laboratoire, Lavoisier, paris () : 860-870.
- Law J. & Haandrikman A., 1997.** Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 7: 1-11.
- Lawrie R.A., 1998A.** *Lawrie's Meat Science*, 6th Ed. Suffolk: Edition sbury Press.
- Lawrie R.A., 1998B.** Chemical and Biochemical Constitution of Muscle, Pages 58-94.
- Lechardeur D *et al.*, 2011.** Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Curr Op in Biotechnol* 22 : 143-9.
- Leistner In: M., Shafiur R, (Ed.), 1999.** Handbook of Food Preservation, Marcel Dekker, New York, , pp. 457-485
- Leroy F. & de Vuyst L., 2004.** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science and Technology, 15,67e78
- Letort C., Nardi M., Garault P., Monnet V. & Juillard V., 2002.** Casein Utilization by Streptococcus thermophilus Results in a Diauxic Growth in Milk. Applied and Environmental Microbiology, 68: 3162-3165.
- Leveau J.Y., Boiux M. & De Roissart H.B., 1991.** La florelactique : technique d'analyse et de contrôledans les industries agro- alimentaires. 2ème Ed., Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3: 2-40.
- Lewus C.B., Kaiser A., Montville T.J., 1991.** Inhibition of food-borne pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol., 57(6): 1683-1688,.
- Lonnecker S.M., Boyle E.A.E., Getty J.K., Buege S.R., Ingham S.C., Searl G. & Harper N.M., 2010.** Production methods and product characteristics of jerky produced by small and very small meat processing businesses. Journal of Muscle Foods 21, 826-833.
- López-Cuellar, Adriana-Inés R-H. & Norberto Chavarría-Hernández., 2016.** LAB bacteriocin applications in the last decade.,.
- Lozach E., 2001.** Le sel et les microorganismes. École nationale vétérinaire de maison ALFORT. *Thèse de Doctorat*. Pp 6 -112.
- Lynch C.M., MC Sweeney P.L.H., Fox P.F., Cogan T.M. & Drinan F.D., 1997.** Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. Lait 77, 441-459.

- L., Leistner In: M., Shafiur R, (Ed.), 1999.** Handbook of Food Preservation, Marcel Dekker, New York., pp. 457-485.
- Makhloufi k.M., 2011.** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Biochimie. Université Pierre et Marie Curie-Paris 6. France. 200p.
- Macleod G., 1994.** The flavor of beef. In *Flavor of Meat and Meat Products*, edited by F. Shahidi. London: Blackie Academic and Professional.
- Mahaut M., Jeantet R. & Brule G., 2000.** Initiation à la technologie fromagère. Tec & Doc Lavoisier. 194p.
- Mallesha R. Shylaja D. Selvakumar. & J. H. Jagannath1., 2010.** Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw and fermented products and their antibacterial activity. *Recent Research in Science and Technology* 2010, 2(6): 42-46
- Mami A., Kerfouf A db. & Kihal., 2014.** Mebrouk Study of the Antimicrobial and Probiotic Effect of *Lactobacillus Plantarum* Isolated from Raw Goat's Milk from the Region of Western Algeria. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)*. ISSN 2307-4531
- Mami A., 2012.** Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée. Option : Microbiologie Appliquée. Thèse de Doctorat .Département de Biologie. Faculté des Sciences. Université d'Oran: 68P
- Manca de Nadra O., 2007.** Nitrogen metabolism in lactic acid bacteria from fruits: a review María Cristina. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. A. Méndez-Vilas (Ed.), Formatex, 500-510.
- Mansour N.K., 1996.** La valeur nutritionnelle des viandes dans la santé, 1ère édition. Université Omar El Mokhtar Libye. pp 357.p1832.
- Marco M.L., Pavan, S. & Kleerebezem, M., 2006.** Towards Understanding Molecular Modes of Probiotic Action. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 204-210.
- Maqueda M et al., 2004.** Peptide AS-48: prototype of new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 5(5), 399-416.
- Martín R., Miquel S., Ulmer J., Kechaou N., Langella P. & Bermúdez-Humarán L.G., 2013.** Role of Commensal and Probiotic Bacteria in Human Health: A Focus on Inflammatory Bowel Disease. *Microbial Cell Factories*, 12, 71.
- Martin-Visscher L. A., Van Bleulikum M. J. & Vederas J. C., 2011.** Class IIc or circular bacteriocins. In D. Drider, & S. Rebuffat (Eds.), *Prokaryotic antimicrobial peptides* (pp. 213e236). France: Springer.

- Mäyrä-Mäkinen A. and Bigret M., 2004.** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 73-102.
- McLeod A., O.L Nyquist., L Snipen., K Naterstad. & L Axelsson., 2008.** Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Syst Appl Microbiol* 31: 393-403.
- Mekri M et al., 2015.** Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Raw Goat's Milk against Spoilage and Pathogenic Bacteria. *Global Veterinaria* 15 (5): 485-492, 2015
- Merzouk Y et al., 2013.** Physico-chemical and Microbiological Analysis of Algerian Raw Camel's Milk and Identification of Predominating Thermophilic Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Science and Engineering* 3 (2013) 55-63
- Ménard S., Candalh C., Bambou J.C., Terpend K., Cerf-Bensussan N. & Heyman M., 2004.** Lactic Acid Bacteria Secrete Metabolites Retaining Anti-Inflammatory Properties after Intestinal Transport. *Gut*, 53, 821-828.
- Mgbemere V.N., Akpapunam M.A. & Igene J.O., 2011.** Effect of groundnut flour substitution on yield, quality and storage stability of Kilishi – A Nigerian indigenous dried meat product. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development* 11, 4718– 4738.
- Mikami M., 1990.** Meat processing and meat preservation. Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan, pp 74-85.
- Millette M., Le Tien C., Somoragiewicz W., Lacroix M., 2007.** Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control* 18, 878-884.
- Mobaarez A.M. & Doust R.H., Sattari M. & Manthegi N., 2008.** Antimicrobial Effects of Bacteriocins like Substances Produced by *L. acidophilus* from Traditional Yoghurt on *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *Journal of Biological sciences*, 8, 221-224.
- Monnet V., Latrille E., Beal C. & Corrieu G., 2008.** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 512-592.
- Monin G. & Ouali A., 1991.** Muscle differentiations and meat quality. *Meat science* 5, 89-157.
- Moraes M.P., Perin L.M., Ortolani M.B.T., Yamazi A.K., Viçosa G.N. & Nero L.A., 2010.** Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic. *Food Sci. Technol* 43 :1320-1324.
- Morisetti M., 1971.** Public health aspect of food processing. In : Hygiène et technologie de la viande fraîche, Edition du CNRS. p 105 -108.

- Morishita Y., Shiromizu K., 1986.** Characterization of lactobacilli isolated from meats and meat products, *International Journal of Food Microbiology*. 3 (1986) 19-29.
- Mkrtchyan H., Gibbons S., Heidelberger S., Zloh M., limaki H.K., 2010.** Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v.Er 317/402 strain narine. *Int.J. Antimicrobial Agents*, 35: 255-260.
- Muller C., Busignies V., Mazel V., Forestier C., Nivoliez A. & Tchoreloff P., 2013.** Mechanistic approach to stability studies as a tool for the optimization and development of new products based on *L. rhamnosus* Lcr35 (R) in compliance with current regulations. *Plos One*, 8(11), e79041.
- Naidoo K. & Lindsay D., 2010.** Survival of *Listeria monocytogenes*, and enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pasteurii*, during two types of biltong manufacturing processes. *Food Control* 21, 1042-1050.
- Naidu K.S.B., Adam J.K. & Govender P., 2012.** The use of probiotics and safety concerns: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 6(41), 6871-6877.
- Nganguem M., 2007.** Approche physico-chimique du pouvoir conservateur du sel: Cas du salage de *Pseudolithus senegalensis*. Université d'Abomey. Maîtrise Professionnelle de Biotechnologie dans les IAA. Mémoire. Pp 11.
- Najjari A., Hadda O., Abdellatif B. & Monique Z., 2007.** Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products. *International Journal of Food Microbiology* 121 (2008) 342-351
- Nigatu A., 2000.** Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lact. fermentum*, *Lact. rhamnosus*, *Lact. sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from kocho and tef. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 969- 978.
- Nummer B.A., Harrison J.A., Harrison M.A., Kendall P., Sofos J.N. & Andress E.L., 2004.** Effects of preparation methods on the microbiological safety of home-dried meat jerky *J Food Prot* 67:2337-41.
- Nutsch A.L., Phebus R.K., Riemann M. J., Schafer D. E., Boyer J.R., Wilson R.C., Leising J.D. & Kastner C.L., 1997.** Evaluation of a steam pasteurization process in a commercial beef processing facility. *Journal of Food Protection* 60 (5): 485 - 492.
- Olmos-Dichara A., Ampe F., Uribelarrea J.-L., Pareilleux A. & Goma G., 1997.** Growth and lactic acid production by *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* in batch and membrane bioreactor: influence of yeast extract and Tryptone enrichment. *Biotechnology Letters*, 19( 8): 709-714
- Oozeer R., Leplingard A., Mater D. D. G., Mogenet A., Michelin R., Seksek I., et al., 2006.** Survival of *Lactobacillus casei* in the human digestive tract after consumption of fermented milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5615-5617.

- Ouali A., 1991.** Conséquences des traitements technologiques sur la qualité de la viande .INRA prod. Anim 1991 p 196-197.
- Ouali A., 1990.a.** La maturation des viandes facteurs biologiques et technologiques de variation. Viande et produits carnés, 11.281-290.
- Ouali A., 1990.b.** Meattenderisation: possible causes and mécanismes. J.Musclefoods 1,129-165.
- Papadimitriou K., Zoumpoulou G., Foligne B., Alexandraki V., Kazou M., Pot B., et al., 2015.** Discovering pro biotic microorganisms: In vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Frontiers in Microbiology*, 6.58.
- Paredes-Paredes M., Flores-Figueroa J. & DuPont H.L., 2011.** Advances in the Treatment of Travelers' Diarrhea. *Current Gastroenterology Reports*, 13, 402-407.
- Pearson A.M. & Gillett T.A., 1999.** *Processed Meats*, 3rd edn. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland.
- Perraut A., 2015.** Séchage des probiotiques : un procédé innovant, simple et efficace (Internet). (cité 7 déc 2015). Disponible sur: <http://www.inra.fr/Entreprises-Mondeagricole/Resultats-innovation-transfert/Toutes-les-actualites/Sechage-des-probiotiques>
- Petit T., Caro Y., Petit A. S., Santchurn S. J. & Collignan A., 2013.** Physicochemical and microbiological characteristics of biltong, a traditional salted dried meat of South Africa. *Meat Sci*, 96 (3), 1313-1317.
- Pfeiler E.A. & RKlaenhammer T., 2007.** The genomic of lactic acid bacteria. *Trends Microbiol* 15: 546-553
- Piard J.C., Desmazeaud M., 1991.** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. *Lait* 71: 525 - 541.
- Piard J.C., Desmazeaud M., 1992.** Inhibiting potential factors produced by lactic acid bacteria: 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, 72: 113-142.
- Pilet M.F., Magras C., Federighi M., 2005.** Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.
- Podolak P.K., Zayas J.F., Kastner C.L. & Fung D.Y.C., 1996.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot.* 59: 370-373.
- Quiberoni A., L Rezaiki., M El Karoui, I Biswas., P Tailliez & A Gruss., 2001.** Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism, *Lactococcus lactis*. " *Res Microbiol* 152: 131-139
- Raynaud S., 2006.** Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse doctorat. INSA, Toulouse. 310p.
- Reid G., 2005.** The Importance of Guidelines in the Development and Application of Probiotics. *Curr Pharm Des*;11(1):11-6.

- Reid G., 2006.** FAO/WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of powder milk with live lactic acid bacteria. Regulatory and clinical aspects of dairy probiotics.
- Renata B; Izildinha M; Cíntia L Z; Roberta R D; Josiane de Oliveira., 2004.** Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Brazilian Journal of Microbiology* (2004) 35:137-144
- Renerre R., 1997.** La couleur acteur de qualité .Mesure de la couleur dela viande. *RencRech.Ruminants*.p 10-89.
- Reuter G., 1985.** Elective and selective media for lactic acid bacteria *International, Journal of Food Microbiology*. 2. 55 -68.
- Rijkers G. T., Bengmark S., Enck P., Haller D., Herz U., Kalliomaki M., et al., 2010.** Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: Current status and recommendations for future research. *Journal of Nutrition*, 140(3), 671S-676S.
- Robbins K., Jensen J., Ryan K., Homco - Ryan C., McKeith F. & Brewer S., 2003.** Consumer attitudes towards beef and acceptability of enhanced beef .*MeatScience* 65 (2):721 – 729.
- Roe-Carpenter D E., 2007.** Anaerobe antimicrobial susceptibility testing. In: Richard Schwalbe., Lynn Steele-Moore., Avery C. Goodwin. *Antimicrobial susceptibility testing protocols*, CRC Press: 139-171.
- Rosenvold K., Petersen J.S., Laerke H. N., Jensen S. K., Therkildsen M., Karlsson A.H., Moller H. S. & Andersen H. J., 2001.** Muscle glycogen stores and meat quality asaffected by strategic finishing feeding of slaughter pigs .*Journal of Animal Science* 79 (2):382 –391.
- Rosset R., Roussel N. & Ciquard., 1984,** Composition chimique du muscle. Les viandes, *Informations Techniques des Services Vétérinaires*. p 97-102.
- Ross P. R., Morgan S. & Hill C., 2002.** Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3e16.
- Ross R.P., S Morgan & C Hill., 2002.** Preservation and fermentation: past, present and. *Int J Food Microbiol* 79: 3-16.
- Rosset R., Roussel N. & Ciquard., 1984.** Composition chimique du muscle. Les viandes, *Informations Techniques des Services Vétérinaires*. p 97-102.
- Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. & Karam N.E., 2009.** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. *European. J. Sci. Res.* 34 (2): 218-227.
- Ruas-Madiedo P., Alting A.C. & Zoon P., 2005.** Effect of exopolysaccharides and proteolytic activity of *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* strains on the viscosity and structure of fermented milks.*International Dairy Journal*. Vol. 15, 155-164.
- Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J. & Zoon P., 2002.** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria.*International Dairy Journal*. Vol. 12, 163-171.

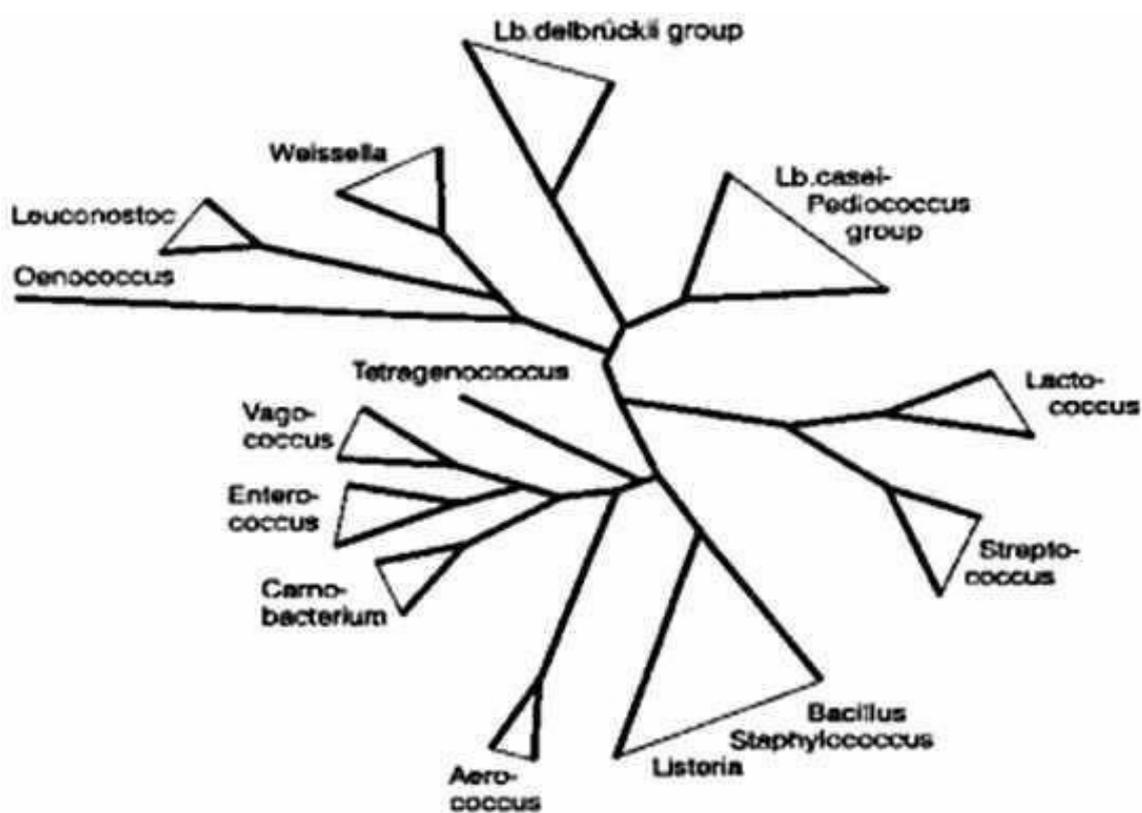
- Rullier B., 1999.** Hygiène alimentaire. Edition Nathan. Paris. P160.40.
- Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T., 2000.** Probiotic bacteria:safety, functional and technological properties. J BiotechnOL.;84(3):197-215.
- Saito S., Kobayashi M., Kimoto-Nira H., Aoki R., Mizumachi K., Miyata S., Yamamoto K., Kitagawa Y., et Suzuki C., 2011.** Intraspecies discrimination of *Lactobacillus paraplantarum* by PCR. FEMS Microbiol Lett, 316 :70-76
- Samelis J., Maurogenakis F., Metaxopoulos J., 1994.** Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami, *International Journal of Food Microbiology*. 23 (1994) 179-196
- Sathyabama S., Vijayabharathi R., Devi P. B., Kumar M. R. & Priyadarisini V. B., 2012.** Screening for probiotic properties of strains isolated from feces of various human groups. *Journal of Microbiology*, 50(4), 603-612.
- Savic I., 2002.** Prehistory and history of sausage making. Sausage Casings. Vienna, Austria: VICTUS Le bensmittel industrie bedarfVertriebsgesellschaftm.b.H.
- Sayah H., 2000.** Approvisionnement d'une grande ville en viande rouge : cas de la ville d'Alger. Thèse de magister. INA. Alger. pp30-36. Agri-food systems, 7 p.
- Schillinger U., Holzapfelw H., 2003.** Culture media for lactic acid bacteria Chapter 8. In: Handbook of Culture Media for Food Microbiology, Corry J.E.L. et al. (Eds.).
- Schillinger U., Lücke F-K., 1987.** Identification of lactobacilli from meat and meat products, *Food Microbiology*. 4 199-208.
- Schillinger U., Lücke F-K., 1989.** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(8): 1901-1906.
- Schleifer K. H. & Ludwig W., 1995.** Chapitre : Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria p. 7-18. In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.), *The lactic acid bacteria*, vol.2: The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- Schone F., Kirchheim U. & Kinast C., 2006.** Quality of the meat of bullocks: 1. Physically-chemical characteristics depending on breed, meat cut and storage. *Fleischwirtschaft*86 (11): 101 – 107.
- Serg N., 2005.** Hystologie.PCEM 1. Facult2 Lyon Nord
- Settanni L. & A Corsetti., 2008.** Application of bacteriocins in vegetable food."Int J Food Microbiol 121: 123-138.
- Singh S., Goswami P., Singh R. & Heller K. J., 2009.** Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 42 : 448-457.
- Sloan A.E., 2009.** 10 top food trends. *Food Technology*, April, pp. 22-40.
- Sofos J.N., 2013.** Meat and meat products. In: Motarjemi, Y., Moy, G., Todd, E. (Eds.), *Encyclopedia of Food Safety*, Elsevier.

- Soltner D., 1979.** La production de la viande bovine .8Eme Edition .Collection Sciences et Techniques agricole Angers .France. p 319.
- Staron T., 1979.** La viande dans l'alimentation humaine. APRIA .Paris. pp01-05.p110.
- Starton T., 1982.** Viande et alimentation humaine .Ed. Apria, Paris. P110.
- Stiles M.E., 1996.** Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuw* 70 : 331-340.
- Stiles M E., Wilhelm H., Holzapfel B., 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, *International Journal of Food Microbiology*. 36 1-29.
- Starton T., 1982.** Viande et alimentation humaine .Ed. Apria, Paris. P110.
- Stetzer A., Tucker E., McKeith F. & Brewer S., 2006.** Quality changes in various beef muscles enhanced prior to aging. II. *Complexus, Serratus ventralis, Vastuslateralis, Vastusmedialis* sand *Longissimusdorsi* muscles. *Journal of Food Science* 73 ( 1 ): S6 – S10 .
- Stiles M.E. & W.H Holzapfel., 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy." *Int J Food Microbiol* 36 : 1–29.
- Sutton A., 2008.** Product Development of Probiotics as Biological Drugs. *Clin Infect Dis.* 2 2008;46(Supplement 2):S128-32.
- Szajewska H., Ruszczynski M. & Radzikowski A., 2006.** Probiotics in the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Children: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *The Journal of Pediatrics*, 149, 367-372.
- Tagg J.R.; Dajani A.S.; Wannamaker, L.W., 1976.** Bacteriocins of grampositive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40: 722-756.
- Tamime A.Y., 1990.** Microbiology of starter cultures. In: Robinson, R. K. (Ed), *Dairy Microbiology*, vol. 2. Elsevier, London. pp. 131- 201.
- Terzic-Vidojevic A., Veljovic K. ,Tolinacki M., Nikolic M., Ostojic M., et Topisirovic L., 2009.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Zlata cheese produced et two geographical location. *Genetika*, 41(1):117-136,
- Thomas M.L., Brown J.r. & Kellogg D.W., 2008.** Fatty acids and meat characteristics of different biological types of beef cattle developed under a management - intensive grazing system. *Journal of Food Quality* 31 ( 2 ): 189 – 204 .
- Toldrá F., 2010.** Chemistry and Biochemistry of Meat. In handbook of processing meat. Edition a John Wiley & Sons, Inc., Publication, p 6, 12
- Touraille C., 1994.** Incidences des caractéristiques musculaires sur les qualités organoleptiques des viandes. *RencRech. Ruminant's* .p 169, 176.
- Trias, R., 2008.** Lactic acid bacteria as bioprotective agents against foodborne pathogens and spoilage microorganisms in fresh fruits and vegetables. PhD thesis, University of Girona.

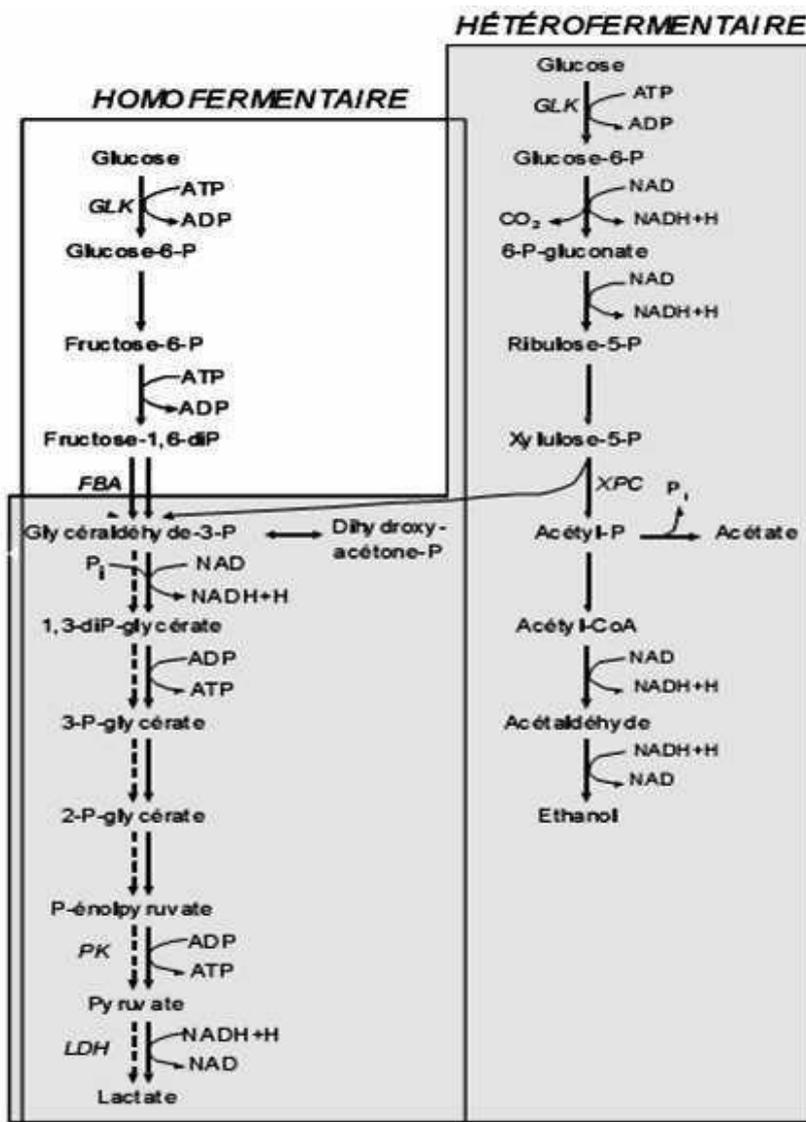
- Truchot E., 1979.** Principales sources de protéines alimentaires et procédés d'obtention n°23. Ed APRIA. Paris. P194.
- Tuma S., Kučerová K. & Plocková M., 2008.** Isolation of Anticlostridially Active Lactobacilli from Semi-hard Cheese. *Czech J. Food Sci.*, 26 (5): 324-332.
- Tuomola E., Crittenden R., Playne M., Isolauri E. & Salminen S., 2001.** Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 393S-398S.
- Uehara S., Monden K., Nomoto k., Seno Y., Kariyama R. & Kumon H., 2006.** A pilot study evaluating the safety and effectiveness of Lactobacillus vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *Int. J. Antimicrobial Agents*, 28: 30-34.
- Van K R., Kleerebezem M., Van Hylekama V J., Ursing B. M., Boekhorst J., Smit B. A., Ayad E. H. E., Smit G., & Siezen R. J. 2002.** Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal* 12: 111-121.
- Vandamme P., B Pot., Gillis M., de Vos P., Kersters K. & Swings J., 1996.** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60: 407-438.
- Vescovo M., Torriani S., Orsi C., Macchiarolo F. & Scolari G., 1996.** Application of antimicrobial producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables. *Journal of Applied Bacteriology* 81: 113-119.
- Veuillemand J.C., 1986.** Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3 : 1-65.
- Vieira A.V., Teixeira M.M. & Martins F.S., 2013.** The Role of Probiotics and Prebiotics in Inducing Gut Immunity. *Frontiers in Immunology*, 4, 445.
- Vierling E., 2003.** Les viandes dans l'alimentation . CRDP. France. pp58-78. p170..
- Vignola C.L., 2002.** Science et technologie du lait, transformation du lait. Presses internationales polytechnique, Québec; 608P.
- Vinderola G., Binetti A., Burns P. & Reinheimer J., 2011.** Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 2, 70.
- Vizioli J. & Salzet M., 2002.** Antimicrobial Peptides versus Parasitic Infections? *Trends in parasitology*, 18, 475- 476.
- Vos P et al., 2009.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2e. Vol. 3. New York, NY: Springer-Verlag.
- Warfield B. & Tume L., 2000.** Marketing analysis and plan for the camel industry. Areport for the Rural Research and Development Corporation (RIRDC). RIRDC Publication No 00/9. RIRDC, Barton, Australia.

- Welman A.D. & Maddox I.S., 2003.** Exopolysaccharides from lactic acid bacteria, perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*. Vol. 21, 269-274.
- WGO., 2008.** World Gastroenterology Organisation Practice Guideline. Probiotics and prebiotics.
- Williams P.G., 2007.** Nutritional composition of red meat. *Nutrition and Dietetics* 64 (supplement 4): S113 – S119.
- Yerlikaya O., 2014.** Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. *Food Science and Technology*, 34(2), 221-229.
- Yetim H. & Cankaya H., 2001.** The effects of CaCl<sub>2</sub> and curing technique on the tenderness of Pastirma, a Turkish dry meat product. *Gida* 26, 203-207.
- Youling L. Xiong S. & Mikel W.B., 2001.** Chapter 15: Meat and Meat Products, Meat science and Applications, Marcel Dekker, Inc.
- Zago M., Fornasari M.E., Carminati D., Burns P., Suárez V., Vinderola G., Reinheimer J. & Giraffa G., 2011.** Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol.* 28 : 1033-1040.
- Zukál E. & Incze K., 2010.** Drying. In: Toldra, F. (ed.) *Handbook of Meat Processing*. Wiley- Blackwell, Ames, Iowa, pp. 219-229.

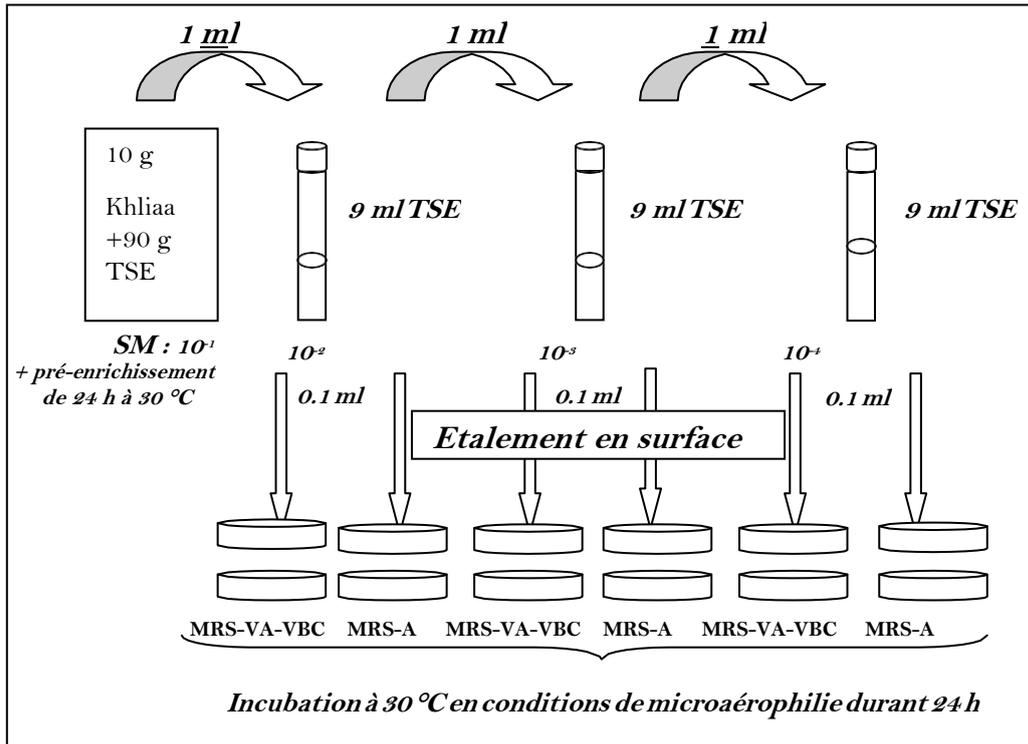
## Annexes



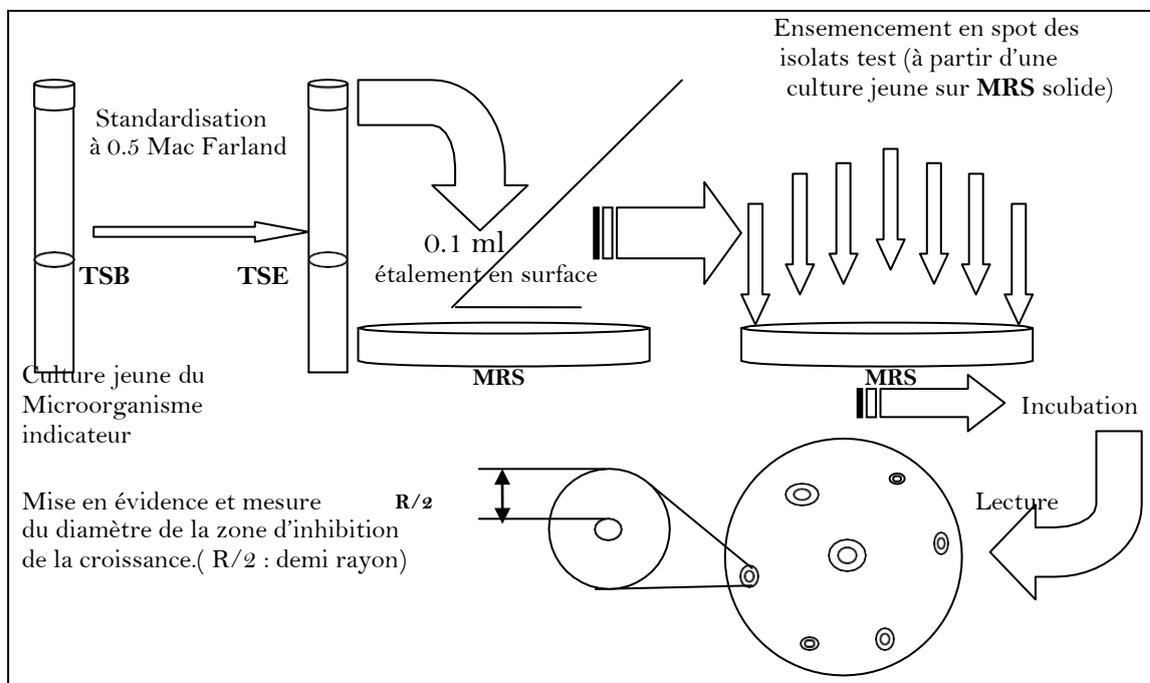
**Annexe 1 :** Arbre phylogénétique des bactéries lactiques/ comparaison avec les genres *Aerococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus* et *Bacillus* (AxeIsson ,1998)



Annexe 2 : Voies homo-fermentaire et hétéro-fermentaire de la dégradation du glucose (Raynaud, 2006).



**Annexe 3 :** Schéma de la procédure adoptée pour l'isolement comprenant la préparation de la solution-dilutions, et la mise en culture sur deux milieux



**Annexe 4 :** Schéma démonstratif de la méthode directe du screening (spot agar test)

	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i>
Morphologie	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C
Tétrades	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Croissance à 10°C	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+	-	+
Croissance à 45°C	-	+/-	-	+	-	-	+/-	+/-	-	-
Croissance à pH 4,4	nd	+/-	-	+	+/-	+/-	+	-	-	+/-
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Croissance à 6,5% NaCl	nd	+/-	+	+	-	+/-	+	-	+	+/-
Croissance à 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Production de CO <sub>2</sub>	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	+
Production d'acide lactique	L	D, L, DL	L	L	L	D	L, DL	L	L	+/-

B : bacilles ; C : coques ; nd : non déterminé ; +/- : variables selon les espèces

#### Annexe 5 : Principales caractéristiques biologiques et métaboliques des bactéries lactiques. (AxeIsson,2004)

##### Notes :

+ : positif ; - : négatif ; ± : réponse variable selon les espèces ; nd : non déterminé.

- Weissella peuvent être également sous forme de bacille.
- Type de fermentation du glucose: homofermentaire (-) ou hétérofermentaire(+).
- Faible quantité de CO<sub>2</sub> produite selon le milieu
- Peuvent ne pas se développer dans 8 % NaCl.
- Production d'acide lactique **D, L, ou DL** acide variable selon les espèces

Genres	Formes	Cat	Réduction NO <sub>2</sub>	Fermentation CO <sub>2</sub>	Genre actuel
*Betabacterioun	Bacilles			Hétéro	*Lactobacillus * Weissella
*Thermobacterium *Streptobactrerium	Bacilles	- -		Homo Homo	*Lactobacillus *Lactobacillus Carnobacterium Lactococcus
*Streptococcus	Coccis	-		Homo	*Streptococcus Vagococcus Enterococcus
*Betacoccus	Coccis		-	Hetero	*Leuconostoc Oenococcus Weissella
*Microbacterium *Tetracoccus	Bacilles coccis	+ +	+ +	Homo Homo	*Brocothrix * Pediococcus Tetragenococcus

Annexe.7 : Clés de différenciation des bactéries lactiques ( Orla-Jensen,1919)